



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"
CIENCIAS MÉDICAS

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CCR2 Y CCR5 EN MONOCITOS Y
LINFOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE NIÑOS CON OBESIDAD Y
ENFERMEDAD POR HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
MARÍA JOSÉ GARCÉS HERNÁNDEZ

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. JUAN GARDUÑO ESPINOSA
HOSPITAL INFANTIL FEDERICO GÓMEZ
DRA. GABRIELA GUTIERREZ REYES
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2022

Juan E. Grupo 7
VoBo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen	1
Introducción	4
Planteamiento del problema	7
Pregunta de Investigación	7
Justificación	7
Hipótesis	7
Objetivo principal	8
Objetivos secundarios.....	8
Material y Métodos	
Diseño del estudio.....	8
Tamaño de muestra.....	9
Grupo de población y lugar.....	11
Criterios de elegibilidad	11
Mediciones antropométricas	11
Mediciones por ultrasonido.....	12
Mediciones de elastografía transitoria	14
Técnica de separación de leucocitos	15
Citometría de flujo.....	16
Variables del estudio	18
Aspectos éticos	20
Análisis estadístico	20
Resultados	21
Discusión	38
Limitaciones del estudio	41
Conclusión	41
Referencias	42

Evaluación de la expresión de CCR2 y CCR5 en monocitos y linfocitos en sangre periférica de niños con obesidad y enfermedad por hígado graso no alcohólico

Resumen

Antecedentes

La obesidad se asocia a un incremento en el riesgo cardiometabólico como la enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA). Muchos de los niños con EHGNA pueden evolucionar esteatohepatitis (NASH), un grado más severo de daño hepático. Niños con NASH presentan un infiltrado hepático de macrófagos y linfocitos. La unión entre quimiocina y quimiorreceptor favorece la migración e infiltrado de estas células inmunológicas. El objetivo de este estudio es evaluar la expresión de ciertos quimiorreceptores involucrados en EHGNA como el receptor de quimiocina C-C2 (CCR2) en monocitos circulantes y del receptor de quimiocina C-C5 (CCR5) en linfocitos circulantes en niños con obesidad con y sin EHGNA.

Métodos

Estudio transversal y exploratorio. Se reclutaron niños de la clínica de obesidad infantil del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga entre 2017 a 2019. Se evaluaron medidas antropométricas, bioquímicas, esteatosis hepática y rigidez hepática mediante elastografía transitoria y espesor de íntima media carotídea (EIM) mediante ultrasonido hepático. Monocitos y linfocitos circulantes se analizaron utilizando citometría de flujo.

Resultados

Se reclutaron un total de 38 niños con obesidad con una media de 10.85 ± 2.10 años de edad, se analizaron los datos entre niños con EHGNA y niños sin EHGNA. Posteriormente se realizó un subanálisis de células inflamatorias con sus respectivos receptores CCR2 y CCR5 en 3 grupos dependiendo el grado de severidad de EHGNA. Niños con obesidad presentan incremento en la expresión de CCR2 de monocitos clásicos e intermedios conforme incrementa el grado de severidad de lesión hepática. Los monocitos no-clásicos presentan la mayor asociación con variables cardiometabólicas, particularmente en varones. Los linfocitos CD4⁺ CCR5⁺ presentaron una asociación positiva con el tejido adiposo visceral y la hemoglobina glicosilada.

Conclusiones

Los monocitos inflamatorios presentan un incremento en la expresión de CCR2⁺ conforme aumenta la severidad de lesión hepática, por lo que podrían estar incrementando el flujo al sitio de lesión. Los monocitos no-clásicos se encuentran asociados a riesgo cardiometabólico y EHGNA en niños con obesidad. Existe un dimorfismo sexual en la asociación de monocitos circulantes CCR2⁺ y variables de riesgo cardiometabólico, donde los hombres con obesidad presentaron mayor riesgo. Se requieren de otros estudios con mayor tamaño de muestra para poder confirmar estos datos.

Introducción

La enfermedad por hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la causa más común de enfermedad hepática crónica en la niñez (Clemente et al., 2016). Se caracteriza por un acúmulo de grasa en forma de triacilglicérolos en más del 5% de los hepatocitos, en ausencia de consumo de alcohol, enfermedad viral, enfermedad genética o consumo de medicamentos hepatotóxicos (Liu et al., 2016). Su patogénesis es multifactorial, aunque está íntimamente ligada a la obesidad y a la resistencia a la insulina (Temple et al., 2016).

La EHGNA abarca desde una esteatosis simple hasta una esteatohepatitis (Nonalcoholic esteatohepatitis- NASH) que puede llevar a cirrosis y a cáncer. Se estima que hasta un 25% de niños con esteatosis simple pueden evolucionar a una esteatohepatitis, este riesgo se incrementa si padecen obesidad (Betancourt-garcia et al., 2017). La esteatohepatitis es una condición dinámica que puede revertirse a una esteatosis simple o progresar a una enfermedad hepática más severa. La presencia de fibrosis es considerada una forma severa de la enfermedad incluso en ausencia de esteatohepatitis (Smith & Perito, 2018).

Recientemente un panel de expertos a nivel internacional establecieron un consenso para modificar el nombre de EHGNA a enfermedad por hígado graso asociado a disfunción metabólica (MAFLD) (Eslam et al., 2020; Fouad et al., 2020). Los pacientes con MAFLD puede fluctuar entre esteatosis y esteatohepatitis durante periodos cortos de tiempo, y la esteatohepatitis puede progresar rápidamente o lentamente hacia un estado de fibrosis, el cual puede presentar también una regresión espontánea (Tilg & Effenberger, 2020).

La entrada excesiva de ácidos grasos al tejido hepático y una resistencia a la insulina, son dos factores importantes para la presencia de esteatosis hepática. Este acúmulo excesivo de grasa genera estrés oxidativo, lipotoxicidad y daño en los hepatocitos, que a su vez desencadena una respuesta inflamatoria promoviendo el desarrollo de un estado más severo de enfermedad como lo es la esteatohepatitis (Liu et al., 2016). Los hepatocitos, las células estelares y las células de Kupffer juegan un papel importante en la patogénesis de NASH. Los macrófagos residentes (células de Kupffer) inician la cascada de inflamación al secretar diferentes citocinas proinflamatorias y quimiocinas (CCL2, CCL5) que atraen a otras células inflamatorias como los monocitos y linfocitos circulantes (Marra & Tacke, 2014). Uno de los mecanismos que se ha identificado como favorecedor de fibrosis hepática es la acumulación de macrófagos fibrogénicos en el hígado. Los macrófagos hepáticos consisten en células de Kupffer y monocitos derivados de macrófagos, quienes son reclutados desde la circulación y juegan un papel importante en la progresión a NASH (Narayanan et al., 2016).

Tanto las células de Kupffer como los monocitos derivados de la médula ósea son las principales células productoras de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β) en NASH. Estos mediadores inflamatorios estimulan posteriormente a los hepatocitos y a las células estelares para producir esteatosis y fibrosis (Miura et al., 2012). En el 2012 De

Vito y col. estudiaron el infiltrado celular de niños con esteatosis simple y NASH, observando un incremento en el infiltrado de macrófagos (De Vito et al., 2012).

Los monocitos circulantes se pueden clasificar en tres subpoblaciones dependiendo la expresión del receptor de superficie CD16 (receptor FcγRIII) y CD14 (receptor lipopolisacárido); los monocitos clásicos CD14⁺⁺ CD16⁻, intermedios CD14⁺⁺ CD16⁺ y los no-clásicos CD14⁺ CD16⁺⁺.

Los monocitos clásicos representan a la población más grande y tienen una función fagocítica importante. Los monocitos intermedios se asocian a condiciones autoinmunes e inflamatorias como sepsis, artritis reumatoide, enfermedad hepática entre otras. Estos monocitos intermedios producen más factor de necrosis tumoral α (TNFα) e interleucina 1β (IL-1β) que las demás subpoblaciones y son altamente fagocíticos y profibrogénicos (Heymann & Tacke, 2016). Los monocitos no-clásicos también se consideran proinflamatorios por su gran capacidad migratoria hacia el sitio de lesión y su capacidad productora de citocinas, aunque presentan poca capacidad fagocítica.

En general los monocitos CD16⁺ (intermedios y no-clásicos) tienen características proinflamatorias, debido a su capacidad de movilización durante estados inflamatorios. Los monocitos intermedios se expanden inicialmente en sangre periférica seguidos posteriormente por los monocitos no-clásicos (Stansfield & Ingram, 2015) (Stansfield & Ingram, 2015). Recientemente Zhang y col. observaron un incremento en sangre periférica de monocitos intermedios en sujetos con EHGNA, y señalaron a los monocitos intermedios como un factor de riesgo independiente para desarrollar la enfermedad (Zhang et al., 2018a).

Las células de Kupffer, los hepatocitos dañados, y las células estelares secretan CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), quimiocina que promueve la acumulación hepática de monocitos desde la médula ósea hasta el sitio de lesión mediante la unión al receptor de superficie CCR2. Los monocitos pasan de la médula ósea a sangre periférica, para su posterior infiltración en el hígado (Marra & Tacke, 2014). Haukeland y col. observaron que sujetos con NASH presentaban mayores niveles de CCL2 en sangre periférica, que sujetos con esteatosis simple (Haukeland et al., 2006). En población pediátrica se observó que niños con EHGNA y fibrosis severa, presentaban mayores niveles de MCP-1 (Fitzpatrick et al., 2012). Además, se ha observado que en ausencia de CCL2 o CCR2, la acumulación de macrófagos en tejido hepático disminuye hasta en un 80% y en tejido adiposo hasta un 40% (Obstfeld et al., 2010).

Por otro lado, el sistema CCL2-CCR2 se ha observado también en tejido adiposo. La acumulación de células inflamatorias en tejido adiposo juega un papel importante en la inflamación crónica en sujetos con obesidad, contribuyendo al desarrollo de resistencia a la insulina, EHGNA, y aterosclerosis (Engin & Engin, 2017; Moroni et al., 2019). Devèvre y col. observaron un incremento en la expresión de CCR2 en monocitos clásicos e intermedios de sujetos con obesidad (Devèvre et al., 2015).

La resistencia a la insulina en tejido adiposo genera la producción de quimiocinas como CCL2, las cuales promueven el reclutamiento de monocitos circulantes y activan macrófagos proinflamatorios (Shimobayashi et al., 2018). La inflamación generada por la resistencia a la insulina en tejido adiposo contribuye al desarrollo de EHGNA. Adicionalmente, esta inflamación subclínica contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. Sujetos con EHGNA tienen mayor riesgo de presentar un evento cardiovascular hasta 10 años antes que sujetos sanos (Wójcik-Cichy et al., 2018). Se ha demostrado que la principal causa de muerte en pacientes con EHGNA son las enfermedades cardiovasculares (Lefere et al., 2020). Estudios en población pediátrica también han encontrado una asociación positiva entre la presencia de EHGNA y un incremento del espesor de intima media carotídea (Madan et al., 2015).

A pesar de que la respuesta inmune innata predomina durante la inflamación asociada al desarrollo de EHGNA, la respuesta adaptativa juega también un papel importante durante el daño hepático crónico. Wolf y col. demostraron que tanto las natural killers (NK) y los linfocitos CD8⁺ promueven el desarrollo de NASH (Wolf et al., 2014). De igual manera, Bhattacharjee y col. observaron un incremento de linfocitos CD8⁺ en el infiltrado hepático de adultos con NASH en comparación con controles (Bhattacharjee et al., 2017).

Ferreyra y col. observaron que niños con NASH presentaban un infiltrado hepático de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) con predominio en el infiltrado de linfocitos citotóxicos (CD8⁺), además de un incremento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ secretores de interferón γ (INF γ) en sangre periférica (Ferreyra-Solari et al., 2012). Este incremento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica, nos podría sugerir que estas células se están dirigiendo hacia el tejido hepático para su posterior infiltración. Actualmente se conoce que los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ expresan en su superficie el receptor CCR5, este se une a las quimiocinas CCL5, CCL3, y CCL4. La quimiocina CCL5 (también conocida como RANTES) se ha visto involucrada en la progresión a fibrosis hepática y a la formación de esteatosis hepática e inflamación (Braunersreuther et al., 2012; Byeong Moo et al., 2018).

Los niños con NASH en su mayoría presentan inflamación y fibrosis portal, a diferencia de la población adulta en donde las lesiones son a nivel sinusoidal (Takahashi & Fukusato, 2014). Esto es importante, ya que se ha observado que los linfocitos que se reclutan alrededor del endotelio portal son mediados por las citocinas CCL3- 5 y se unen al receptor CCR5; por lo que podemos sospechar que se pudiera tratar de linfocitos T CCR5⁺ (Oo et al., 2010).

Las quimiocinas y sus respectivos quimiorreceptores juegan un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias en la obesidad y en el desarrollo de comorbilidades asociadas como es la EHGNA. Recientemente se ha evaluado el uso de inhibidores de receptores CCR2/5 para mejorar la progresión de enfermedades cardiometabólicas como EHGNA y aterosclerosis, encontrando resultados prometedores (Georgakis et al., 2022; Lefere et al., 2020). De tal manera que estudiar estos receptores en nuestra población pediátrica podría resultar de utilidad para el manejo y crear estrategias terapéuticas para frenar la progresión de estas enfermedades y prevenir desenlaces

aversos en la edad adulta. Actualmente no existen estudios que comprueben la presencia de monocitos circulantes CCR2⁺ y linfocitos CCR5⁺ en niños con obesidad y EHGNA.

Planteamiento del problema

Durante la progresión del daño hepático en la EHGNA, las células de Kupffer activadas inician una cascada inflamatoria secretando quimiocinas CCL2 y CCL5, favoreciendo la migración e infiltración de células inflamatorias. La quimiocina CCL2 se une al receptor CCR2 de monocitos circulantes, mientras que el CCL5 se une al receptor CCR5 de linfocitos en sangre periférica. Recientemente se han estudiado inhibidores de CCR2/5, los cuales han demostrado ser eficaces en frenar la progresión de la enfermedad.

Actualmente se sabe que niños con EHGNA presentan infiltrado celular de macrófagos y linfocitos en tejido hepático. En niños con EHGNA existe incremento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica que probablemente estén migrando al sitio de lesión para su reclutamiento, pero no se ha estudiado si estos linfocitos presentan mayor expresión de CCR5. Además, se desconoce si existe incremento de monocitos que expresan CCR2 en sangre periférica en niños con EHGNA.

Pregunta de investigación

¿Los monocitos y linfocitos en sangre periférica de niños con obesidad y EHGNA presentan mayor expresión de CCR2 y CCR5 que niños con obesidad sin EHGNA?

Justificación

EHGNA es la causa más común de lesión hepática crónica en la niñez y está relacionada a la obesidad. México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil, aumentando el riesgo de padecer complicaciones cardiometabólicas, como EHGNA y aterosclerosis. Hasta un 25% de sujetos con EHGNA pueden progresar a NASH, causando daño severo al hígado. Es necesario entender y conocer la fisiopatología de la progresión de la enfermedad en población pediátrica, con el fin de crear herramientas de prevención y medidas terapéuticas para evitar daño irreversible en estos pacientes.

Hipótesis

Si las quimiocinas CCL2 y CCL5 son factores asociados al reclutamiento de macrófagos y linfocitos en tejido hepático de niños con EHGNA, entonces se observará un incremento de expresión de CCR2 y CCR5 en monocitos y linfocitos de sangre periférica en comparación con niños sin EHGNA con un tamaño de efecto asociado d-Cohen > 0.5 (efecto moderado).

Objetivo principal

- Evaluar la expresión de CCR2 en monocitos y CCR5 en linfocitos de sangre periférica de niños con obesidad y EHGNA para definir si participan en la cadena causal del proceso. De esta forma se puede evaluar mediante nuevos estudios, la posibilidad de utilizar estos receptores de forma terapéutica para frenar la progresión de la enfermedad en población infantil.

Objetivos secundarios

- Evaluar la frecuencia de monocitos CCR2⁺ y linfocitos CCR5⁺ en sangre periférica de niños con EHGNA.
- Evaluar si existen diferencias en la frecuencia y expresión de monocitos CCR2⁺ y linfocitos CCR5⁺ entre niños con obesidad sin EHGNA y niños con diferentes grados de daño hepático.
- Evaluar la correlación entre las células inflamatorias y las variables de daño cardiometabólico, y determinar si existen diferencias entre sexo.

Material y Métodos

Diseño del estudio

Clasificación:

Se trata de un estudio exploratorio, observacional, transversal, prolectivo y analítico.

Exploratorio: ya que no se cuenta con estudios previos sobre la expresión de receptores CCR2 y CCR5 en niños con obesidad y EHGNA.

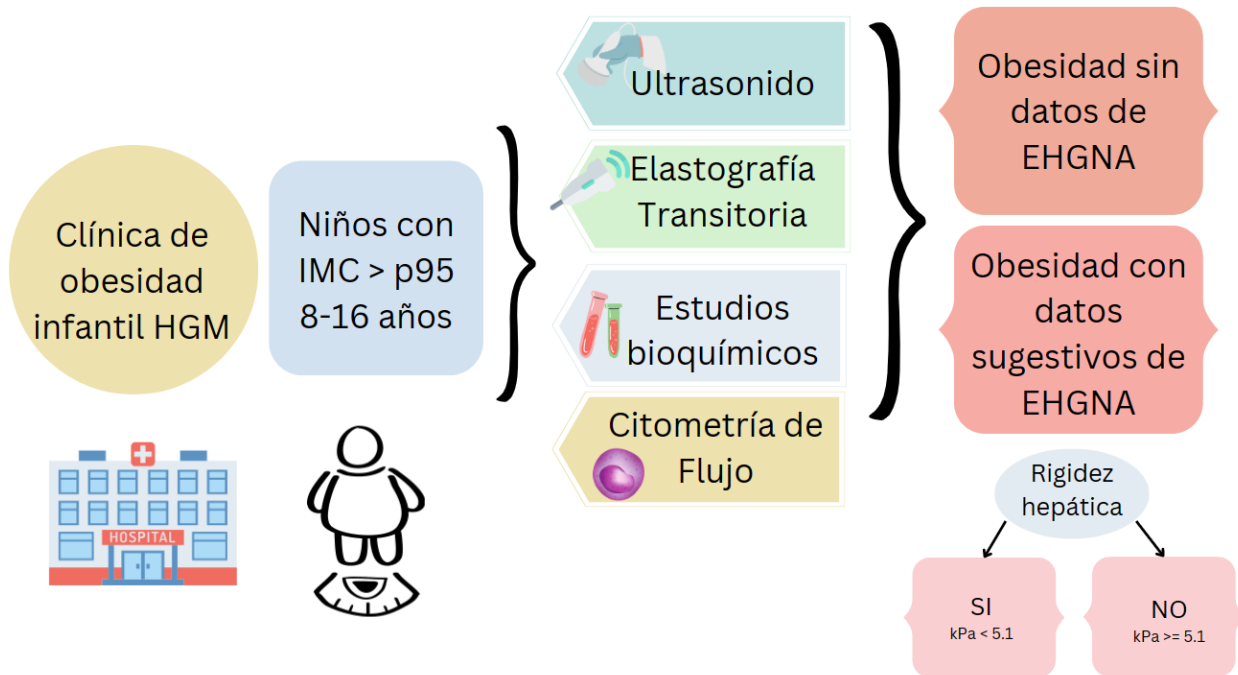
Observacional: ya que no se realizará ninguna intervención, únicamente se observarán las características del sujeto.

Transversal: ya que se estudiará a los participantes en un sólo momento, y no se valorará a los sujetos durante un periodo de tiempo.

Prolectivo: la obtención de la información se realizará simultáneamente con los resultados obtenidos durante el estudio.

Analítico: se valorará la asociación entre variables.

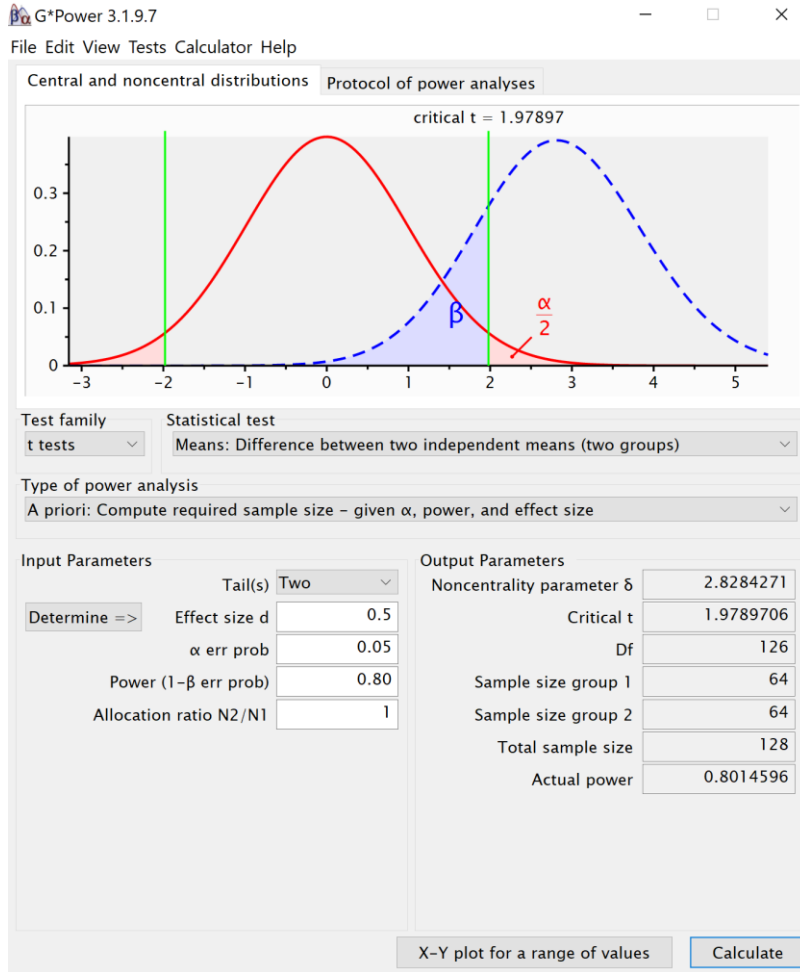
Diseño:



Tamaño de muestra

Al ser un estudio exploratorio y al no contar con un estudio previo en población pediátrica que tenga valores de IMF para CCR2 y CCR5 en monocitos y linfocitos, no se requiere de un tamaño de muestra definitivo. Haciendo el ejercicio de encontrar un tamaño de muestra para una diferencia de medias con un tamaño del efecto de 0.5, error alfa de 0.05 y un poder del 80%, utilizamos el programa Gpower y obtuvimos un tamaño de muestra por grupo de 64 sujetos.

Realizaremos un recalcule del tamaño de muestra con los valores obtenidos en este estudio exploratorio.



Ejercicio: tamaño de la muestra por diferencia de medias, a dos colas. Con un tamaño del efecto de D de Cohen = 0.5, error alfa de 0.05, poder el 80%.

Programa utilizado: Gpower 3.1

Grupo población

Se estudiaron a niños de 8 a 16 años de edad. Invitados de la clínica de obesidad infantil del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Lugar donde se está realizando el estudio

Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”.

Dr. Balmis # 148
Col. Doctores
Del. Cuauhtémoc
Cp. 06726 Ciudad de México

Criterios de elegibilidad:

Criterios de inclusión

Niños y niñas 8 a 16 años de edad
IMC >p95
Sin antecedentes de consumo de medicamentos que interfieran con los estudios metabólicos y hepáticos
Consentimiento y asentimiento informado
Cuestionario AUDIT en zona I (Cuestionario para descartar consumo de alcohol)

Criterios de exclusión

Diagnóstico de diabetes mellitus, hepatitis infecciosa o autoinmune, hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia familiar
Obesidad mórbida

Criterios de eliminación

Retiro voluntario de niño o padre
Datos de Infección al momento del estudio

Mediciones antropométricas

El peso de cada sujeto se obtuvo mediante la báscula del analizador de composición corporal iOi 353, con el niño o niña con ropa ligera y sin zapatos (escala de medición 0.1 kg). La estatura se midió con estadiómetro colocado sobre la pared, con el niño o niña sin zapatos (escala de medición 0.1 cm). Mediante estas mediciones se calculó el índice de masa corporal (IMC) mediante la siguiente fórmula: $\text{peso} / (\text{talla})^2$, en donde el peso fue en kg y la talla en m. Se calculó el z score de IMC mediante una calculadora online específica para población pediátrica, obtenida de la siguiente plataforma:

<http://www.quesgen.com/BMIPedsCalc.php> Los valores de peso, talla, y z score de IMC de esta calculadora, están basados en referencias pediátricas por sexo y edad de la CDC.

Se tomaron signos vitales como frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, y presión arterial. La presión arterial se tomó con esfigmomanómetro ajustado a población pediátrica.

Medición de Bioimpedanciometría

Se valoró el porcentaje de grasa corporal y el porcentaje de adiposidad mediante el analizador de composición corporal iOi 353. Previamente medida la talla del participante, se solicitó colocar ambos pies descalzos sobre la báscula de la bioimpedanciometría.

Medición de resistencia a la insulina

El HOMA-IR se calculó mediante la siguiente ecuación: (insulina en ayuno mU/L x glucosa en ayuno mg/dl) /405. El punto de corte de 3.4 se consideró como resistencia a la insulina (Lentferink et al., 2017; Van Der Aa et al., 2014).

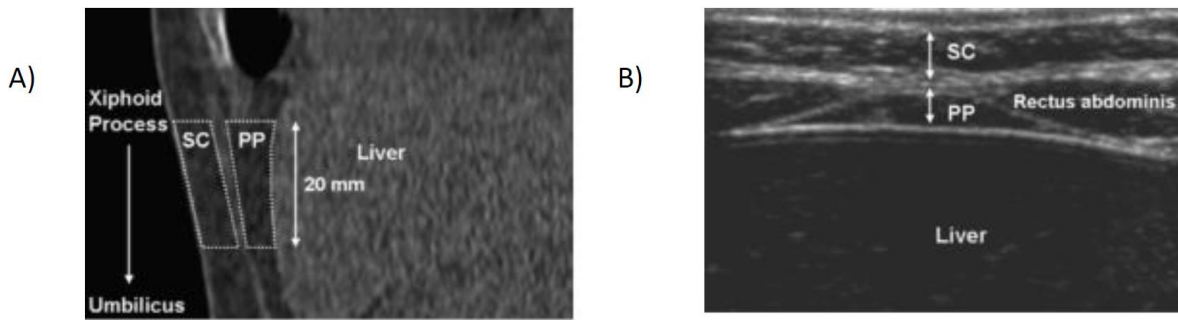
Imágenes por ultrasonido

Las mediciones de ultrasonido se realizaron con un equipo Siemens Accuson 2000 de alta resolución (2 and 12 MHz). Todas las imágenes por ultrasonido se realizaron por el mismo médico encargado para reducir el sesgo.

Medición de tejido adiposo preperitoneal

Se realizó una valoración del tejido adiposo visceral por medio de ultrasonido al detectar el área de tejido adiposo preperitoneal (APP), utilizando la técnica descrita por Mook-Kanamori y col, la cual es un método adecuado para la valoración de la distribución de grasa en niños (Mook-Kanamori et al., 2009).

Se coloca un transductor perpendicular en la piel en la parte superior del abdomen a nivel del proceso xifoideo y se mueve longitudinalmente con dirección caudal hacia la cicatriz umbilical (20 mm) sobre la línea media para obtener el máximo grosor de grasa preperitoneal (Imagen A). El área de tejido adiposo preperitoneal se determina al observar una forma triangular en la imagen transversal (Imagen B).

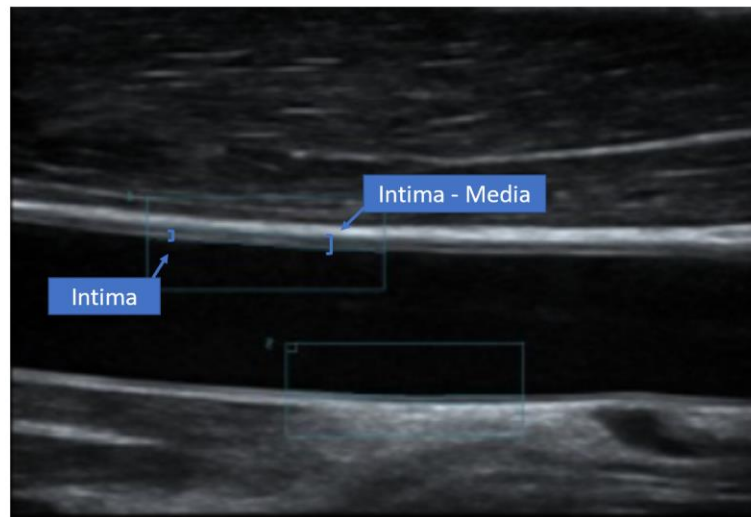


Medición de espesor de íntima media carotídea

Para la valoración de riesgo cardiovascular se utilizó la medición de la estructura vascular mediante el espesor de íntima media carotídeo. El paciente se colocó en posición supina, con el cuello extendido y se colocó el transductor en posición antero-lateral. Se obtuvieron dos mediciones principales sobre el plano longitudinal a un centímetro del bulbo carotídeo, una sobre la arteria carótida común izquierda y sobre la arteria carótida interna izquierda (Iglesias Del Sol et al., 2002). Un valor por encima del percentil 75 para edad y sexo se considerará como un EIM de riesgo (Böhm et al., 2009).

Imágenes de la medición del espesor de íntima media carotídea:

- **ACC**
 - Grosor de íntima
 - Grosor de íntima-media
- **ACI**
 - Grosor de íntima
 - Grosor de íntima-media



Medición de esteatosis y fibrosis hepática

La medición de esteatosis y fibrosis hepática se realizó utilizando la elastografía transitoria ((Fibroscan® Echosens, Paris France) del departamento de gastroenterología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Las medidas del Parámetro de Atenuación controlado (CAP dB/m) se utilizaron para detección de la acumulación de grasa en tejido hepático. Los kilopascales se obtienen al calcular la velocidad de la onda elástica transmitida por el transductor, entre mayor es la velocidad de transmisión, mayor la rigidez hepática.

Los participantes se coloraron en posición supina, el transductor se colocó sobre la piel, entre los espacios intercostales a nivel del lóbulo hepático derecho. Se colocó la sonda “M” 3.5 MHz (diámetro 7 mm) o la sonda “XL” 2.5 MHz (diámetro 10 mm) si se observaba un tejido adiposo muy grueso.

Los puntos de corte utilizados para valorar los diferentes grados de esteatosis fueron: sin esteatosis <225 dB/m, esteatosis leve/mod 225-300 dB/m, esteatosis severa ≥ 300 dB/m, según lo propuesto por Desai y col. (Desai et al., 2016).

El punto de corte utilizado para valorar rigidez hepática (riesgo de fibrosis) en población pediátrica fue de 5.1 kPa sugerido por Nobili y col. para población pediátrica (Nobili et al., 2008).

Las mediciones reportadas de CAP (dB/m) y de kPa son la media de 10 mediciones obtenidas por un mismo médico investigador, solamente resultados en un rango intercuartil menor de 30% fueron considerados válidos.

Imágenes de Elastografía transitoria



Separación de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica de lisis de eritrocitos

Para la obtención de leucocitos de sangre periférica, se obtuvieron 5 ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA. Se realizó centrifugación por densidad de gradientes durante 10 minutos a 3000 rpm para visualizar el anillo leucocitario. Con una micropipeta de 500 uL se tomaron muestras de suero para congelar a -80°C y colocaron en tubos eppendorf de 0.6 ml. Se recolectó el anillo leucocitario con micropipeta y se colocó una cantidad de 500 mcl en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se obtuvieron las células polimorfonucleares (PBMCs) utilizando 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos ACK y colocándolo durante 7 minutos a temperatura mínima de 4 °C.

Transcurridos 7 minutos se centrifugó la muestra a 2000 rpm a 4°C por 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante permaneciendo los leucocitos dentro del tubo eppendorf. El proceso con ACK se repetía nuevamente ante la presencia de glóbulos rojos botón leucocitario. Una vez obtenido el botón leucocitario se realizaba un lavado con PBS al 1x (phosphate buffer saline) y se centrifugaba a 2000 rpm a 4°C por 5 minutos.

El botón leucocitario restante se transfería a un tubo Eppendorf limpio y se realizaba el conteo de células de manera manual, para la valoración de la viabilidad celular se aplicaba tinción con azul de tripano. (Dagur & McCoy, 2015) Se calculó bajo microscopio el volumen necesario para la obtención de 2 millones de células, se tomó dicha cantidad de la solución de leucocitos para tres tubos Eppendorf y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Por último, se colocaron los anticuerpos en cada muestra y se dejó incubar por 20 min aislados de la luz solar y bajo hielo.

Fórmula para buffer de lisis (ACK) para realizar la técnica de lisis de eritrocitos y la solución de PBS:

Buffer de Lisis (ACK)

- 25 ml de Cloruro de Amonio (16.58g/dl)
- 5 ml de EDTA (0.146g/L)
- 10 ml de Bicarbonato de Na (7.056g/L)
- Aforar con agua destilada a 50 ml

PBS 10x

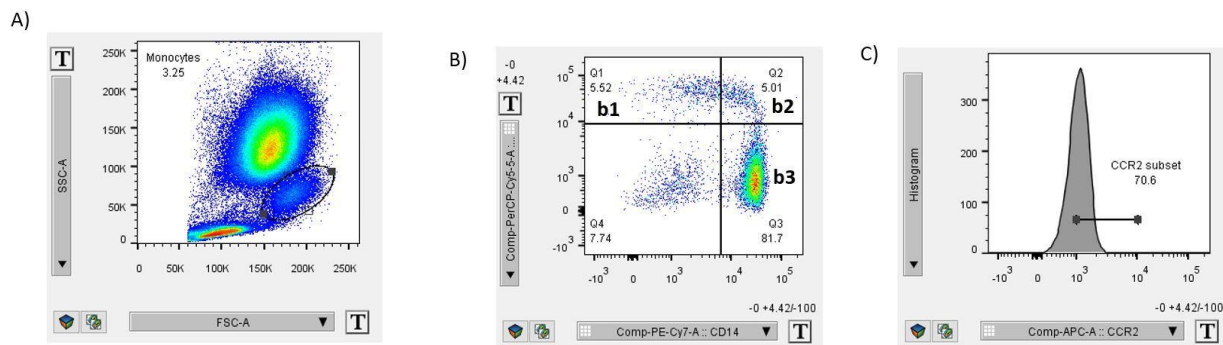
- 80g de NaCl
- 2g de KCl
- 14.4g de Na₂HPO₄
- 2.4g de KH₂PO₄
- Agua filtrada para 1 Litro

Citometría de Flujo

Se realizó la valoración de las células inflamatorias mediante el citómetro FACS Canto II del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se separaron las células en tres tubos diferentes para la colocación de anticuerpos. En el primer tubo se valoraron las características de los linfocitos CD4 con los anticuerpos antiCD4 y fluorescencia con PECy7, anticuerpos antiCD3 con fluorescencia FITC y antiCCR5 con fluorescencia Alexa Fluor 647. En el tubo dos se valoraron las características para linfocitos CD8 utilizando los siguientes anticuerpos: antiCD8 con PECy7, antiCD3 con FITC y antiCCR5 con Alexa Fluor 647. Para los monocitos se valoraron mediante los anticuerpos antiCD14 con PECy7, antiCD16 con APC, y antiCCR2 con Alexa Fluor 647.

Por cada paciente se adquirieron 10000 eventos de monocitos circulantes. Los subtipos de monocitos se clasificaron dependiendo su expresión de CD14 y C16 de la siguiente manera: CD14⁺⁺CD16⁻ monocitos clásicos, CD14⁺CD16⁺ monocitos intermedios y CD14⁺CD16⁺⁺ monocitos no-clásicos. Las células se analizaron posteriormente con el software The cells FlowJo versión 10.0.

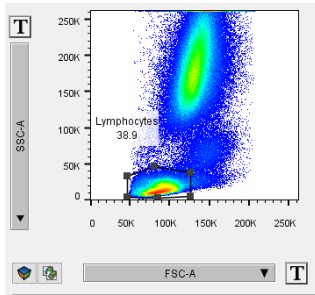
Análisis de las Subpoblaciones de Monocitos mediante programa FLOW JO:



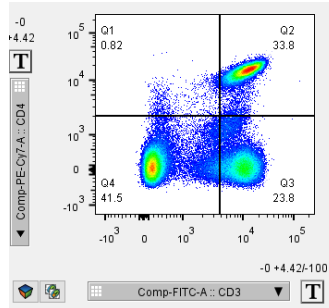
A- Localización de monocitos; B- clasificación de monocitos por expresión de CD14 y CD16, b1: monocitos no-clásicos, b2: monocitos intermedios, b3: monocitos clásicos; C- detección de CCR2

Linfocitos CD4 CCR5

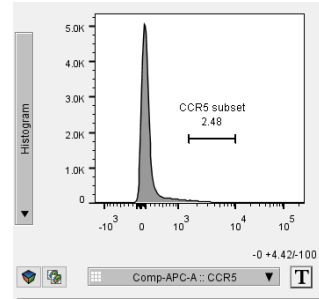
A)



B)



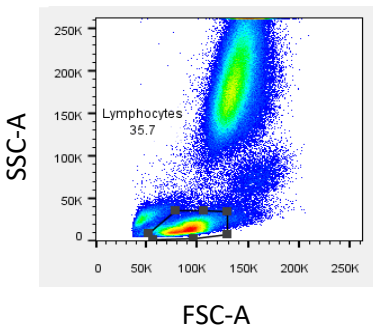
C)



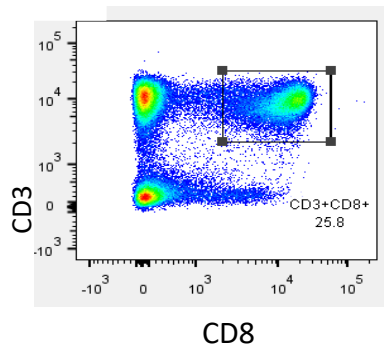
A- Localización de linfocitos; B- clasificación de linfocitos por expresión de CD3 y CD4, C- detección de CCR5

Linfocitos CD8 CCR5

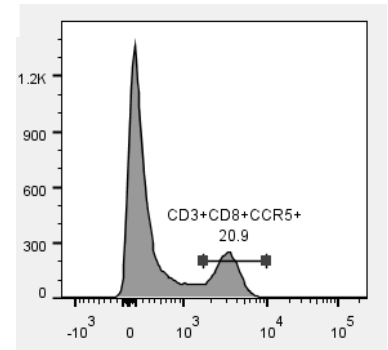
A)



B)



C)



A- Localización de linfocitos; B- clasificación de linfocitos por expresión de CD3 y CD8, C- detección de CCR5

VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLES CELULARES:

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medición	Análisis estadístico
Linfocitos T CD4 CD3 CD4 CCR5	Cuantitativa, Continua, dependiente	Citometría de Flujo	Porcentaje de células positivas, Intensidad Media de Fluorescencia IMF	ANOVA, correlación de Pearson, tamaño del efecto
Linfocitos T CD8 CD3 CD8 CCR5	Cuantitativa, Continua, dependiente	Citometría de Flujo	Porcentaje de células positivas, Intensidad Media de Fluorescencia IMF	ANOVA, correlación de Pearson, tamaño del efecto
Monocitos CD14 CD16 CCR2	Cuantitativa, continua, dependiente	Citometría de Flujo	Porcentaje de células positivas, Intensidad Media de Fluorescencia IMF	ANOVA, correlación de Pearson, tamaño del efecto, regresión lineal

VARIABLES BIOQUÍMICAS:

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medición	Análisis estadístico
ALT	Independiente, cuantitativa, continua	Cuantificación en sangre periférica	U/L	T student, correlación
GGT	Independiente, cuantitativa, continua	Cuantificación en sangre periférica	U/L	T student, correlación
Glucosa	Independiente, cuantitativa, continua	Cuantificación en sangre periférica	mg/dl	T student, correlación
Insulina	Independiente, cuantitativa, continua	Cuantificación en sangre periférica	mg/dl	T student, correlación
HbA1c	Independiente, cuantitativa, continua	Cuantificación en sangre periférica	%	T student, correlación, regresión lineal

Variables de tejido adiposo, alteraciones metabólicas y hepáticas:

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medición	Análisis estadístico
Porcentaje de Grasa Corporal	Independiente, cuantitativa	Bioimpedanciometría	%	T student, correlación
Adiposidad	Independiente, cuantitativa	Bioimpedanciometría	%	T student, correlación, regresión lineal
IMC	Independiente, cuantitativa, continua	Peso / Estatura al cuadrado	Kg/m ²	T student, correlación
APP Área de tejido adiposo preperitoneal	Cuantitativa, continua, independiente	US de alta resolución. Transductor colocado a nivel de proceso xifoides en dirección caudal a cicatriz umbilical (20 mm)	cm ²	T student, correlación
HOMA	Cuantitativa, continua, independiente	índice para cuantificar resistencia a la insulina. Cálculo: $(\text{Glucosa} \times \text{Insulina}) / 405$		T Student, correlación, análisis de interacción, regresión lineal
Esteatosis Hepática	Cualitativa, ordinal, independiente	CAP : >225 esteatosis leve/mod CAP: >300 esteatosis severa	dB/m	ANOVA, Correlación Pearson
Fibrosis Hepática	Cualitativa, independiente	kPa: > 5.1	kPa	ANOVA, correlación Pearson

Variables de riesgo cardiovascular:

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medición	Análisis estadístico
LDL	Cuantitativa, continua, independiente	Cuantificación en sangre periférica	mg/dl	T student, correlación
HDL	Cuantitativa, continua, independiente	Cuantificación en sangre periférica	mg/dl	T student, correlación
Colesterol Total	Cuantitativa, continua, independiente	Cuantificación en sangre periférica	mg/dl	T student, correlación
EIM ACC	Cuantitativa, continua, independiente	US de alta resolución. Medición sobre arteria carótida común, a 1 cm de bifurcación	mm	T student, correlación

		Valor > p75 = riesgo cardiovascular		
EIM ACI	Cuantitativa, continua, independiente	US de alta resolución. Medición sobre arteria carótida interna, a 1 cm de bifurcación Valor > p75 = riesgo cardiovascular	mm	T student, correlación

Aspectos éticos

El protocolo ha sido aceptado por parte del comité de investigación y ética como una rama del protocolo titulado “Efectos de un programa de intervención multicomponente con ejercicio estructurado sobre parámetros antropométricos, metabólicos, de aptitud física y de daño cardiovascular temprano en niños y adolescentes con obesidad” con la clave de registro **DI/17/311/03/028**.

A todos los participantes se les pidió leer y firmar un asentimiento informado, y a los padres y tutores se les pidió hacerlo también con el consentimiento informado. El documento fue firmado por dos testigos ajenos al equipo de investigación y por el responsable de la obtención del consentimiento. Ningún procedimiento se realizó previo a la firma de consentimiento y asentimiento informados. Se anexa carta de consentimiento y asentimiento informado.

Los participantes se identificaron únicamente mediante códigos generados con sus iniciales y número de identificación. Todos los datos recolectados son confidenciales. La información se guardó en los expedientes clínicos de cada paciente, teniendo acceso a ellos únicamente el personal involucrado en el estudio.

Todos los procedimientos y actividades durante el desarrollo del estudio, se realizaron en total apego a las disposiciones legales nacionales, contenidas en la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en apego a las Buenas Prácticas Clínicas y en conformidad con los principios éticos para la investigación médica en seres humanos detallados en la última revisión de la declaración de Helsinki y de la Conferencia Internacional de Armonización.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for Social Sciences Software (SPSS v. 22). Se realizó un análisis univariado para evaluar las variables demográficas y obtener frecuencia, medias y desviación estándar. Se utilizó análisis por T Student para la comparación de medias entre grupos. Para las variables con distribución anormal, se realizaron transformaciones mediante normalización por

cuantiles. Se calcularon los tamaños del efecto con D de Cohen. Se realizaron correlaciones de Pearson entre las células inflamatorias y las variables de daño metabólico. Las variables con mayor correlación se tomaron en cuenta para un subanálisis con regresión lineal e interacción. Un valor alfa < 0.05 se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

Se reclutaron un total de 38 niños con media de edad de 10.7 ± 2.10 años de edad con características similares (Tabla 1). En el grupo con rigidez hepática se observa una tendencia a presentar mayores niveles de glucosa, insulina, LDL, ácido úrico, y HOMA; sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

No se observaron diferencias significativas en los valores de las enzimas hepáticas alanino aminotransferasa (ALT) y gama glutamil transferasa (GGT) entre grupos, aunque a mayor severidad de la enfermedad hepática se observaban mayores niveles de enzimas hepáticas con un fuerte tamaño del efecto (d de Cohen = 0.55,0.57).

Los tres grupos de obesidad presentaban características similares en cuanto a la cantidad de tejido adiposo visceral, porcentaje de grasa corporal y área de tejido adiposo preperitoneal.

Tabla 1. Características demográficas

N = 38 (n)	Obesidad sin EHGNA (8)	Obesidad con EHGNA (30)	p
Edad (años)	10.2 ± 1.3	11.0 ± 2.2	0.404
Sexo Masculino % (n)	75% (6)	36.7% (11)	0.062 ^{&}
Peso (kg)	52.9 ± 12.5	58.8 ± 15.2	0.321
Talla (cm)	144.6 ± 8.2	147.2 ± 11.1	0.543
IMC (kg/m ²)	24.9 ± 3.1	26.5 ± 3.2	0.425
IMC p (%)	96.7 ± 1.2	97.4 ± 1.1	0.119
Cintura (cm)	83.05 ± 11.0	85.9 ± 10.0	0.475
TA sist (mmHg)	101.1 ± 11.0	103.7 ± 9.3	0.508
TA diast (mmHg)	67.0 ± 9.4	68.5 ± 8.2	0.653
Estadio Tanner			
Tanner I	62.5 %	46.4 %	
Tanner (II-V)	37.5 %	53.6 %	0.345 ^{&}
Glucosa (mg/dl)	89.5 ± 2.5	88.8 ± 9.3	0.845
HbA1c	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.1	0.708
Ácido úrico (mg/dl)	5.0 ± 1.4	5.9 ± 0.8	0.034
Colesterol (mg/dl)	163.2 ± 29.4	162.4 ± 19.7	0.929
HDL (mg/dl)	39.0 ± 4.3	39.0 ± 8.6	0.999
LDL (mg/dl)	103.7 ± 24.5	107.2 ± 17.2	0.649
TG (mg/dl)	135.6 ± 67.3	138.2 ± 49.9	0.904
ALT (UI/LI)	18.3 ± 5.6	27.9 ± 15.0	0.089
AST (UI/L)	25.0 ± 3.5	29.5 ± 8.8	0.167
GGT (UI/L)	15.7 ± 5.8	17.3 ± 7.0	0.556
Insulina (mg/dl)	16.0 ± 9.2	15.8 ± 8.1	0.958
HOMA	3.5 ± 1.9	3.8 ± 1.9	0.661
APP (cm ²)	4.1 ± 3.0	4.4 ± 1.1	0.787
Grasa corporal (%)	27.8 ± 6.5	31.7 ± 4.3	0.052
VFA (cm ³)	84.8 ± 30.7	84.2 ± 34.7	0.964
MRH (kPa)	4.0 ± 0.1	4.5 ± 1.3	0.416
CAP (dB/m)	200.2 ± 17.8	274.0 ± 33.8	<0.001
EIM ACC (mm)	0.53 ± 0.1	0.61 ± 0.0	0.251
EIM ACI (mm)	0.56 ± 0.1	0.57 ± 0.0	0.907

IMC – Índice de Masa Corporal, HbA1c – hemoglobina glucosilada, HDL – Lipoproteína de alta densidad, LDL- lipoproteína de baja densidad, TG – triglicéridos, ALT – alanino aminotransferasa, AST – Aspartato aminotransferasa, GGT – gamaglutamil transferasa, HOMA – Homeostasis Model Assessment, APP – Área de tejido adiposo preperitoneal, VFA – Tejido adiposo visceral, MRH – Medición de rigidez hepática, CAP – Parámetro de atenuación controlada, EIM – Espesor de íntima media, ACC – Arteria carótida común, ACI– Arteria carótida interna

Los valores están expresados como medias ± desviación estándar, análisis por T de student, & análisis por Chi cuadrada. a<b

Valores de p < 0.05 marcados con negritas

Análisis de la expresión y frecuencia de CCR2 y CCR5 en monocitos y linfocitos circulantes

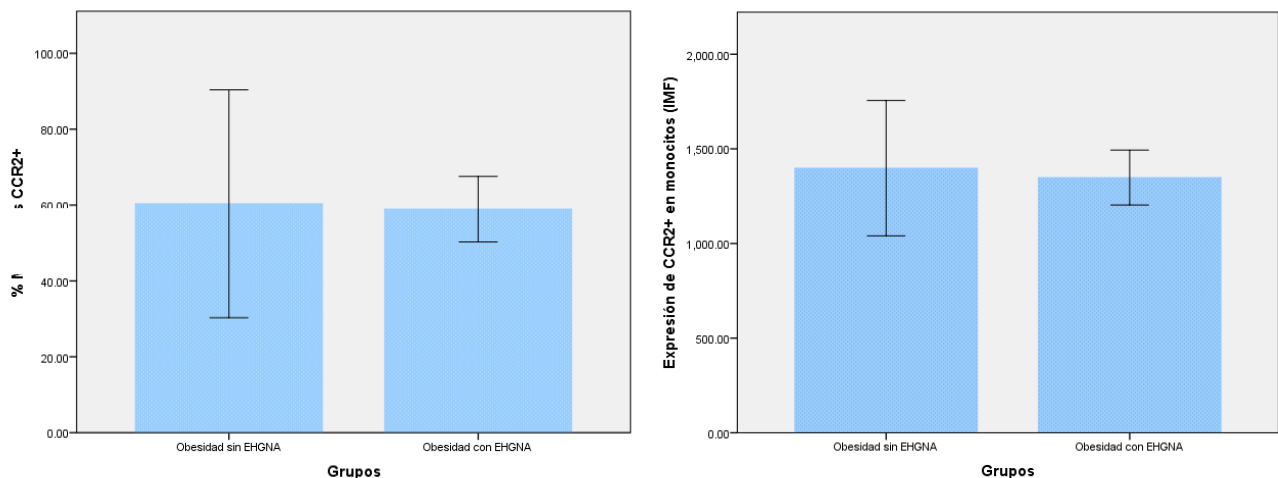
Monocitos CCR2⁺

Se realizó análisis de T Student y ANOVA para evaluar las diferencias en la frecuencia y expresión de CCR2 y CCR5 en monocitos y linfocitos circulantes entre sujetos con obesidad y diferentes grados de lesión hepática.

Niños con obesidad con y sin EHGNA presentan concentraciones similares de monocitos CCR2⁺ circulantes, así como de la expresión de su receptor CCR2 (*Figura 1A*). Se realizó un subanálisis para evaluar diferencias entre grupos sin EHGNA y diferente grado de severidad de lesión hepática (*Figura 1B*). No se observaron diferencias en la frecuencia y expresión de CCR2 en monocitos circulantes entre los 3 grupos. Los tres grupos de niños con obesidad presentan valores similares de monocitos circulantes que expresan CCR2.

No obstante, al evaluar las subpoblaciones de monocitos observamos una tendencia a presentar mayor expresión de CCR2 en monocitos clásicos e intermedios cuanto mayor era la severidad de lesión hepática (*Figura 2*, D de Cohen 0.61 y 0.79).

Figura 1. Monocitos CCR2⁺ en sangre periférica entre grupos

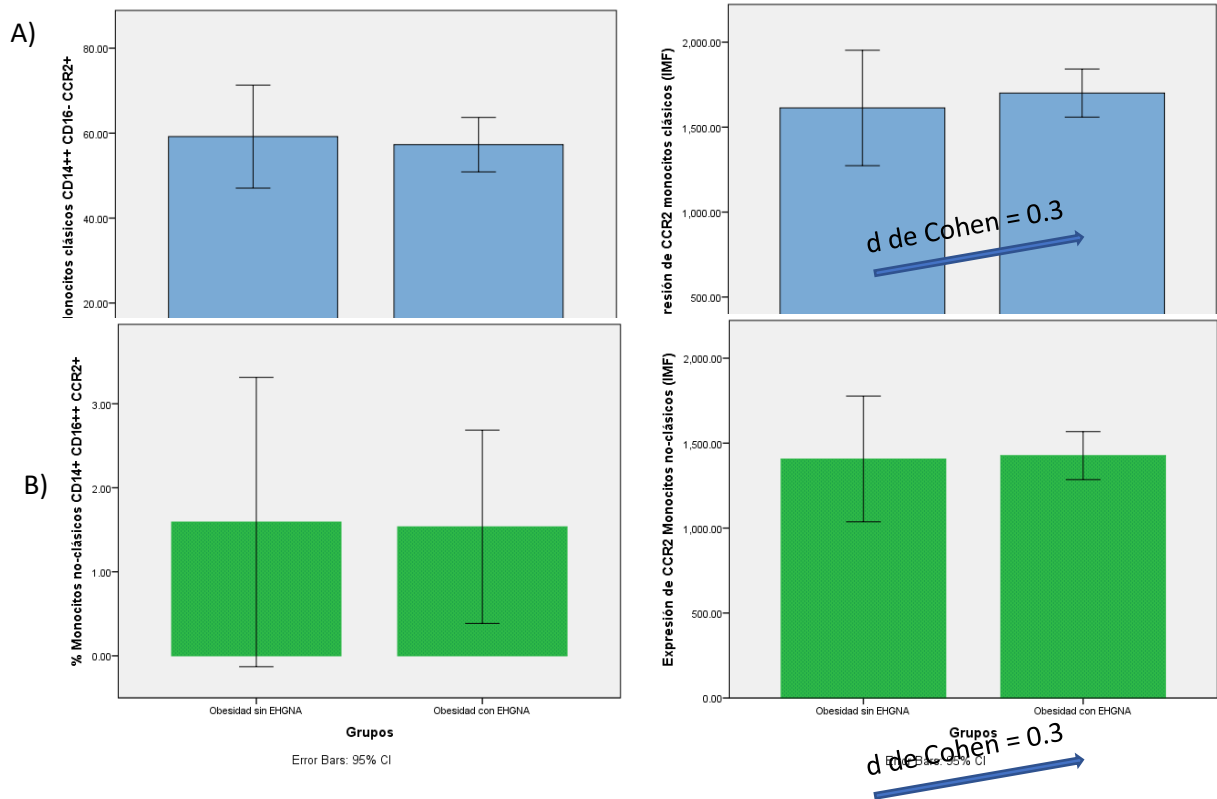


Monocitos CCR2+ en sangre periférica. A) Comparación entre niños con obesidad sin EHGNA y con EHGNA, análisis T Student B) Comparación entre niños sin EHGNA y diferente grado de severidad de EHGNA, análisis ANOVA de una vía. Las barras representan el 95% intervalo de confianza.

Posteriormente se evaluó si existen diferencias entre grupos de obesidad con los valores de las subpoblaciones de monocitos CCR2⁺. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ entre grupos con y sin EHGNA (*Figura 2*), pero se observó que a mayor daño hepático la expresión de CCR2 en monocitos clásicos e intermedios incrementaba en comparación con niños sin presencia de EHGNA (D de Cohen 0.61 y 0.76 respectivamente) (*Figura 3*).

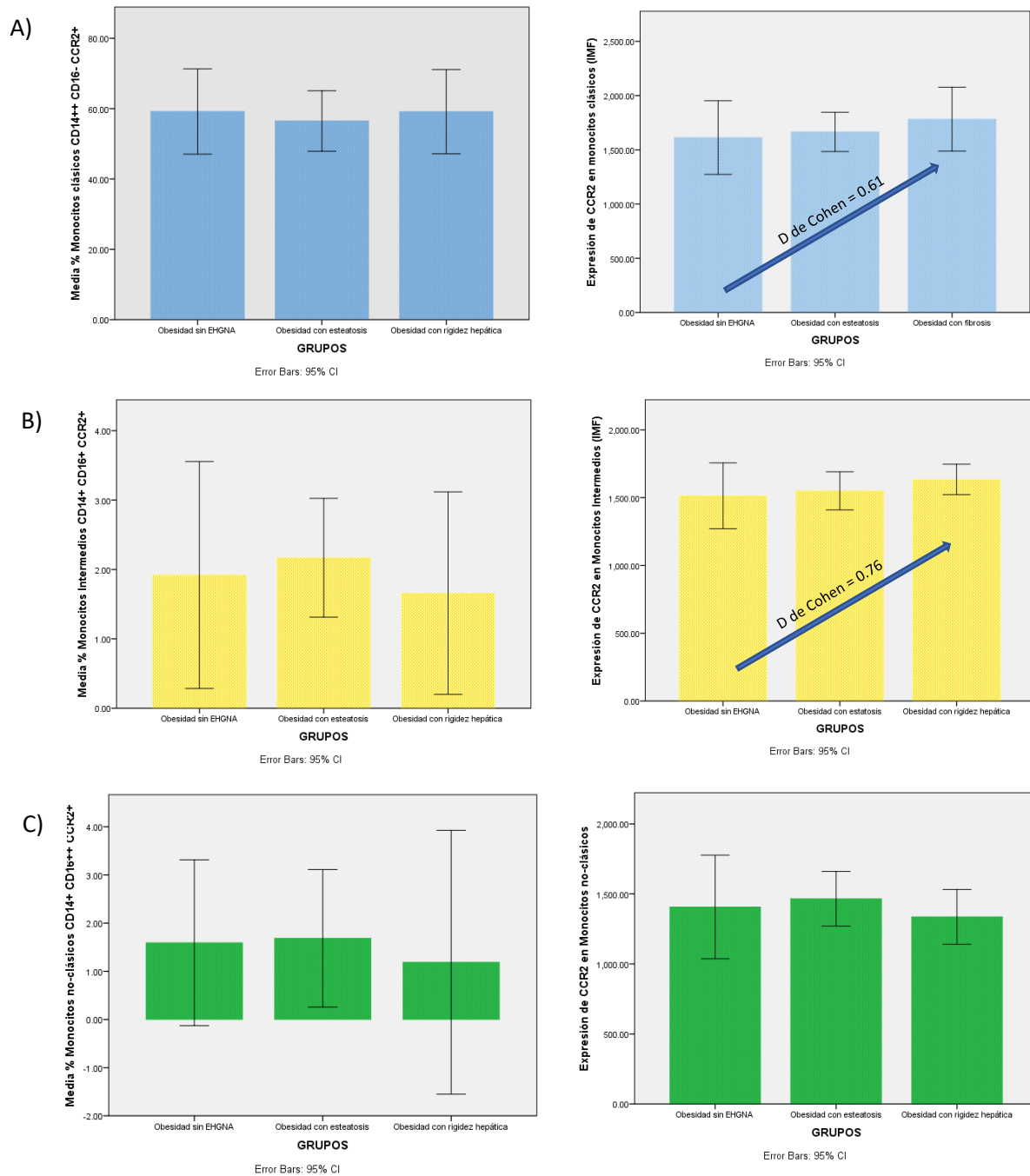
Se realizó un análisis de severidad de esteatosis hepática y la frecuencia de subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ en sangre periférica. Se observó que a mayor severidad de esteatosis, mayor presencia de monocitos intermedios y no-clásicos CCR2⁺ (*Figura 4*).

Figura 2. Frecuencia y expresión de CCR2 en monocitos clásicos, intermedios, y no-clásicos CCR2+ entre grupos de Obesidad con y sin EHGNA



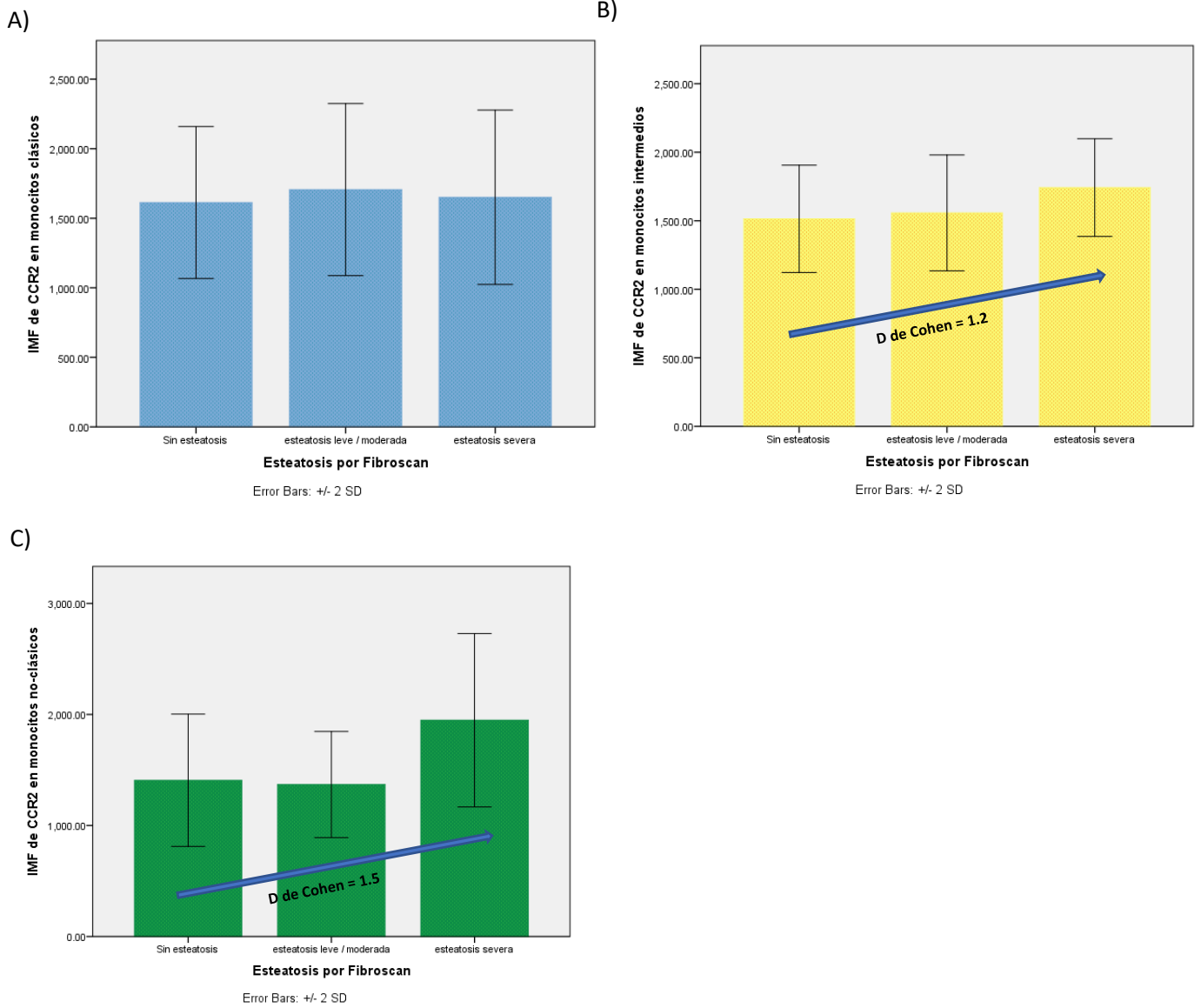
A) Monocitos clásicos B) Monocitos intermedios C) Monocitos no-clásicos
 T Student, análisis del tamaño del efecto por D de Cohen

Figura 3. Frecuencia y expresión de CCR2 en monocitos clásicos, intermedios, y no-clásicos CCR2+ entre grupos de Obesidad con y diferentes grados de severidad de lesión hepática.



B) Monocitos clásicos B) Monocitos intermedios C) Monocitos no-clásicos
 ANOVA de una vía, análisis del tamaño del efecto por D de Cohen

Figura 4. Expresión de CCR2 en subpoblaciones de monocitos en presencia de esteatosis hepática



A) Monocitos clásicos B) Monocitos intermedios C) Monocitos no-clásicos
 Tamaño del efecto por D de Cohen

Correlación de monocitos CCR2⁺ con variables metabólicas

Para analizar la asociación entre variables metabólicas y monocitos circulantes, se realizó un análisis de correlación de Pearson, el cual se muestra en la *tabla 2* y *3*. Se encontró una correlación positiva entre el tejido adiposo visceral, la circunferencia de cintura con la frecuencia de los monocitos CCR2⁺ circulantes. La expresión de CCR2 en monocitos circulantes presentó una asociación positiva con enzimas hepáticas (*Tabla 2*).

Los monocitos clásicos CCR2⁺ no presentaron asociaciones con las variables cardiometabólicas, mientras que la expresión de CCR2 en monocitos intermedios presentó una asociación positiva con GGT y la relación ALT/AST. En cuanto a los monocitos no-clásicos CCR2⁺ se observó una correlación positiva con ALT, la relación ALT/AST, IMC, CC, HgA1c y con el espesor de intima media carotídea (*Tabla 3*).

Tabla 2. Asociación de monocitos CCR2⁺ con variables metabólicas

	% Monocitos CCR2 ⁺	IMF de CCR2 en Monocitos circulantes
VFA cm3	0.29	0.40*
CC cm	0.25	0.38*
ALT U/L	0.36*	0.16
GGT U/L	0.42*	0.15

VFA: Visceral Fat Adiposity, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa; CC: circunferencia de cintura

Correlación de Pearson

*p< 0.05, **p<0.001

Tabla 3. Asociación de subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ con variables metabólicas

	MC CCR2 ⁺ (%)	IMF CCR2 en MC	MI CCR2 ⁺ (%)	IMF CCR2 en MI	MNC CCR2 ⁺ (%)	IMF CCR2 en MNC
IMC	0.27	0.24	0.23	0.25	0.41*	0.44*
CC	0.28	0.29	0.29	0.33	0.51**	0.45*
HbA1c	0.01	0.16	0.24	0.12	0.50*	0.42*
ALT (UI/L)	0.24	0.20	0.35	0.38	0.58**	0.27
GGT (UI/L)	0.33	0.37	0.13	0.57**	0.27	0.24
ALT/AST	0.27	0.27	0.38	0.53**	0.68**	0.57**
EIM ACC (mm)	0.10	0.13	0.29	0.11	0.23	0.43**

IMC: índice de masa corporal; CC: circunferencia de cintura ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa, EIM ACC: espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Común, HgA1c: hemoglobina glucosilada

Correlación de Pearson

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Debido a que en los últimos años se ha encontrado dimorfismo sexual en niños con EHGA, realizamos un análisis comparando ambos sexos. Se observó que los niños con obesidad presentaban mayor cantidad de tejido adiposo visceral en comparación con las niñas con obesidad, quienes presentaban mayor porcentaje de grasa corporal (Tabla 4).

Interesantemente, observamos que los monocitos CCR2⁺ correlacionan con diferentes variables metabólicas en varones que en mujeres (Tabla 5). En varones la frecuencia de monocitos CCR2⁺ circulantes se encuentra positivamente relacionada con GGT y EIM ACI, mientras que la expresión de CCR2 se asocia a mayor cantidad de tejido adiposo del área preperitoneal. En las mujeres con obesidad los monocitos circulantes CCR2⁺ se correlacionan positivamente con los niveles de glucosa y la relación ALT/AST.

En el análisis de las subpoblaciones de monocitos circulantes observamos mayores contrastes de la relación entre variables metabólicas entre niños y niñas.

En los varones observamos que todas las subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ presentan una fuerte asociación con el tejido adiposo preperitoneal y el espesor de intima media. Los monocitos intermedios además se correlacionan con variables de adiposidad (IMC, VFA, % grasa corporal), GGT y glucosa. Los monocitos no-clásicos presentaron la mayor cantidad de asociaciones con variables cardiometabólicas en varones. Se observó

una correlación positiva entre los monocitos no-clásicos CCR2⁺ y variables de adiposidad (IMC, CC, APP, VFA), enzimas hepáticas, resistencia a la insulina, hemoglobina glicosilada, y espesor de intima media carotídea (*Tabla 6*).

Tabla 4. Diferencias demográficas entre niños y niñas con obesidad

	<i>Masculino (17)</i>	<i>Femenino (21)</i>	<i>Valor p</i>
<i>Peso (kg)</i>	56.3 ± 14.8	59.1 ± 14.8	0.556
<i>Talla (cm)</i>	144.4 ± 11.2	149.4 ± 9.2	0.151
<i>IMC (kg/cm²)</i>	26.5 ± 2.9	25.9 ± 3.6	0.638
<i>CC (cm)</i>	83.3 ± 8.4	87.9 ± 11.7	0.167
<i>VFA cm³</i>	103.1 ± 35.8	69.2 ± 22.7	0.001**
<i>APP cm²</i>	4.1 ± 1.5	4.4 ± 1.8	0.606
<i>% Grasa Corporal</i>	28.2 ± 5.2	33.0 ± 3.7	0.002**
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	89.7 ± 8.7	88.0 ± 8.11	0.553
<i>ALT UI/L</i>	25.4 ± 13.0	26.3 ± 15.2	0.844
<i>GGT UI/L</i>	16.5 ± 7.4	17.5 ± 6.0	0.652
<i>HOMA</i>	3.2 ± 2.1	4.1 ± 1.7	0.153
<i>HgA1c</i>	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.1	0.161
<i>CAP dB/m</i>	252.2 ± 30.5	270.9 ± 30.5	0.195
<i>kPa</i>	4.5 ± 1.8	4.4 ± 0.8	0.589
<i>EIM ACC mm</i>	0.59 ± 0.1	0.59 ± 0.1	0.923
<i>EIM ACI mm</i>	0.55 ± 0.1	0.58 ± 0.1	0.435
<i>Esteatosis (%)</i>	78.6	85.7	0.456
<i>Rigidez hepática (%)</i>	14.3	23.8	0.406

VFA: Visceral Fat Adiposity, APP: área de tejido adiposo preperitoneal, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa, CAP: Parámetro de atenuación controlado, EIM ACC: espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Común, EIM ACI: Espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Interna. HgA1c: hemoglobina glicosilada

p*< 0.05, *p*<0.001

Tabla 5. Diferencias en asociaciones metabólicas y monocitos CCR2⁺ circulantes entre niños y niñas con obesidad

	% Monocitos CCR2 ⁺ Hombres (14)	IMF de CCR2 en Monocitos circulantes	% Monocitos CCR2 ⁺ Mujeres (19)	IMF de CCR2 en Monocitos Circulantes
IMC	0.46	0.49	-0.13	0.08
CC cm	0.43	0.39	-0.07	0.26
VFA cm3	0.43	0.38	-0.09	0.17
APP cm2	0.48	0.72**	-0.02	-0.32
% Grasa Corporal	0.42	0.42	-0.091	0.18
Glucosa mg/dl	0.10	0.43	0.57*	0.36
ALT UI/L	0.25	0.09	0.44	0.13
ALT/AST	0.46	0.29	0.48*	0.27
GGT UI/L	0.57*	0.36	0.15	-0.34
Insulina	0.39	0.08	0.05	-0.21
HOMA	0.40	0.13	0.19	-0.16
HgA1c %	0.39	-0.09	0.21	-0.06
EIM ACI >p75 mm	0.66**	0.48	-0.12	0.08

VFA: Visceral Fat Adiposity, APP: área de tejido adiposo preperitoneal, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa, CAP: Parámetro de atenuación controlado, EIM ACC: espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Común, EIM ACI: Espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Interna. HgA1c: hemoglobina glucosilada

*p< 0.05, **p<0.001

En niñas con obesidad solamente se observó una asociación entre monocitos clásicos CCR2⁺ con glucosa sérica, y de monocitos intermedios CCR2⁺ con glucosa, ALT y la relación ALT/AST (Tabla 7).

Para observar el efecto que pudiera presentarse en los monocitos no clásicos, realizamos análisis de regresión lineal con interacción con sexo entre las variables de riesgo. Observamos que la interacción del sexo con HOMA, HgA1c, el % de grasa corporal y el tejido adiposo visceral tienen una gran influencia en la expresión de CCR2 en monocitos no-clásicos (Tabla 8).

Tabla 6. Asociaciones entre variables metabólicas y subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ circulantes en niños con obesidad

	<i>M. Clásicos CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en M. Clásicos</i>	<i>M. Intermedios CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en M. Intermedios</i>	<i>M. No-clásicos CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en Monocitos No-clásicos</i>
<i>IMC</i>	0.44	0.49	0.67**	0.43	0.79**	0.77**
<i>CC (cm)</i>	0.33	0.37	0.53	0.38	0.75**	0.77**
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	0.27	0.35	0.21	0.72**	0.30	0.37
<i>ALT (UI/L)</i>	0.10	0.06	0.41	0.23	0.76**	0.37
<i>ALT/AST</i>	0.29	0.21	0.39	0.49	0.83**	0.68**
<i>GGT (UI/L)</i>	0.41	0.44	0.29	0.69**	0.59**	0.53
<i>Grasa corporal (%)</i>	0.40	0.44	0.65**	0.38	0.78**	0.79**
<i>VFA (cm3)</i>	0.38	0.38	0.64**	0.34	0.84**	0.81**
<i>HgA1c (%)</i>	0.11	-0.06	0.34	0.05	0.89**	0.67**
<i>Insulina (mg/dl)</i>	0.26	0.15	0.34	0.35	0.75**	0.66**
<i>HOMA</i>	0.29	0.21	0.36	0.41	0.75**	0.65**
<i>APP (cm2)</i>	0.80**	0.69**	0.55	0.69**	0.32	0.59*
<i>EIM ACI > p75</i>	0.60**	0.62**	0.59**	0.58**	0.57	0.66**

VFA: Visceral Fat Adiposity, APP: área de tejido adiposo preperitoneal, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa, CAP: Parámetro de atenuación controlado, EIM ACC: espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Común, EIM ACI: Espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Interna. HgA1c: hemoglobina glucosilada

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Tabla 7. Asociaciones entre variables metabólicas y subpoblaciones de monocitos CCR2⁺ circulantes en niñas con obesidad

	<i>M. Clásicos CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en M. Clásicos</i>	<i>M. Intermedios CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en M. Intermedios</i>	<i>M. No-clásicos CCR2⁺ (%)</i>	<i>IMF CCR2 en Monocitos No-clásicos</i>
<i>IMC</i>	-0.00	-0.12	-0.15	-0.07	-0.01	0.10
<i>CC (cm)</i>	0.08	0.00	-0.05	0.08	0.25	0.17
<i>Glucosa (mg/dl)</i>	0.59*	0.51	0.48	0.74**	0.39	0.24
<i>ALT (UI/L)</i>	0.45	0.33	0.24	0.62*	0.40	0.24
<i>ALT/AST</i>	0.23	0.38	0.39	0.62*	0.52	0.48
<i>GGT (UI/L)</i>	-0.06	-0.12	-0.50	-0.10	-0.45	-0.18
<i>Grasa corporal (%)</i>	0.11	-0.09	-0.25	-0.17	-0.11	-0.72
<i>VFA (cm3)</i>	0.10	-0.11	-0.23	-0.13	-0.13	-0.06
<i>HgA1c (%)</i>	-0.05	0.11	0.08	0.11	0.11	0.23
<i>Insulina (mg/dl)</i>	-0.07	-0.18	-0.01	0.02	-0.41	-0.14
<i>HOMA</i>	0.09	-0.07	0.05	0.12	-0.34	-0.15
<i>APP (cm2)</i>	-0.27	-0.50	-0.06	-0.25	-0.23	-0.20
<i>EIM ACI > p75</i>	-0.18	0.01	0.21	-0.13	0.02	-0.27

VFA: Tejido Adiposo Visceral, APP: área de tejido adiposo preperitoneal, ALT: alanina aminotransferasa, GGT: Gammaglutamil transferasa, CAP: Parámetro de atenuación controlado, EIM ACC: espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Común, EIM ACI: Espesor de intima media carotídea Arteria Carótida Interna. HgA1c: hemoglobina glucosilada

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Tabla 8. Efecto del sexo sobre la expresión de CCR2 en monocitos no-clásicos CCR2⁺

Interacción de sexo con:	B	SE	β	p	Part
HOMA	0.49	0.18	1.21	0.01	0.47
HgA1c	0.79	0.35	0.59	0.03	0.40
% Grasa Corporal	0.78	0.36	0.61	0.04	0.39
VFA cm3	0.85	0.40	0.62	0.48	0.40

Análisis de regresión con interacción entre sexo y variables metabólicas. Se realizó una transformación inversa rankit para la normalización de variables HOMA y HgA1c

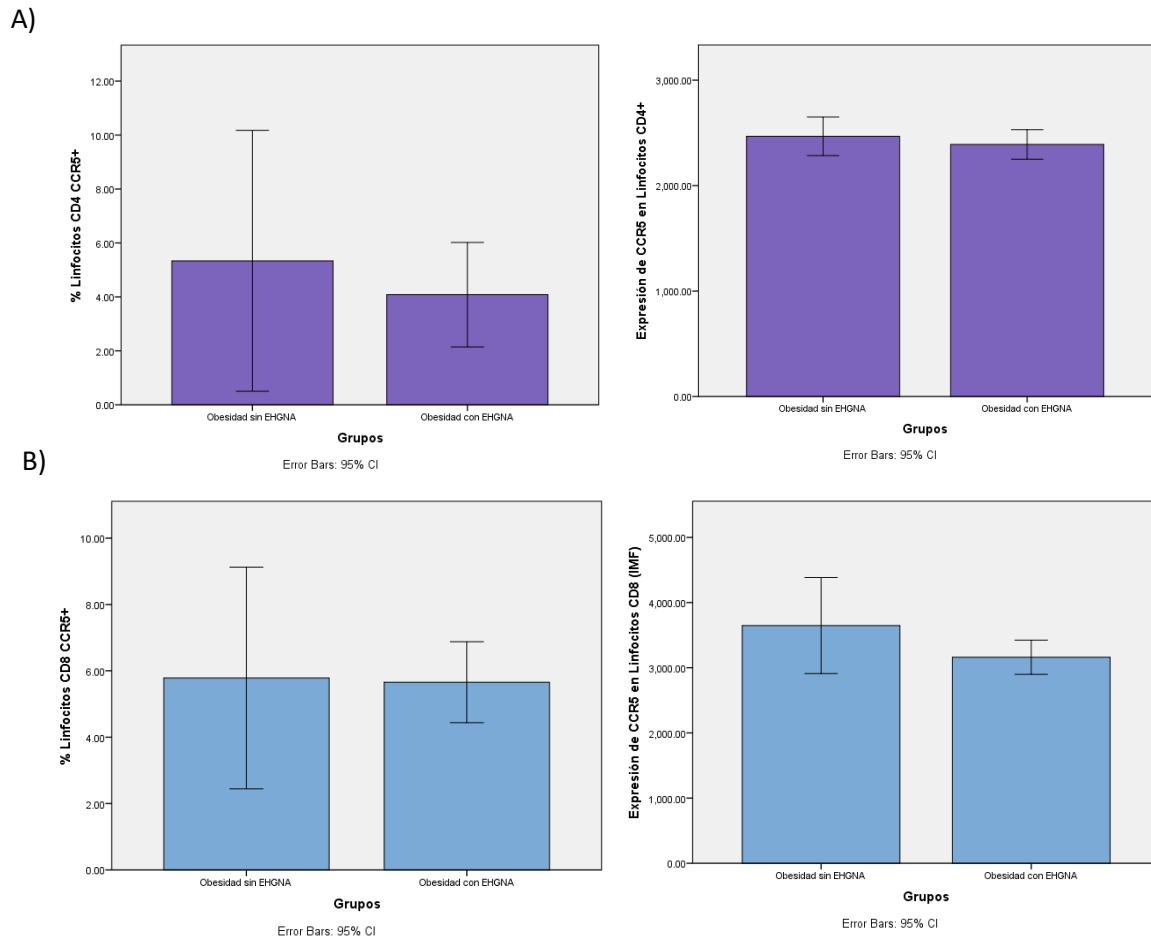
HgA1c – Hemoglobina glicosilada, HOMA: Homeostasis Model Assessment, VFA: tejido adiposo visceral

Linfocitos CCR5⁺

No se observaron diferencias significativas en frecuencia y expresión de CCR5 de linfocitos CD4 y CD8 entre grupos (Figura 5 y 6). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de linfocitos CCR5⁺ y severidad de la esteatosis hepática. Aunque se observó que a mayor grado de esteatosis hepática, la expresión de CCR5 en linfocitos CD4 tiende a disminuir, observando una *d* de Cohen de 1.5 (Figura 7).

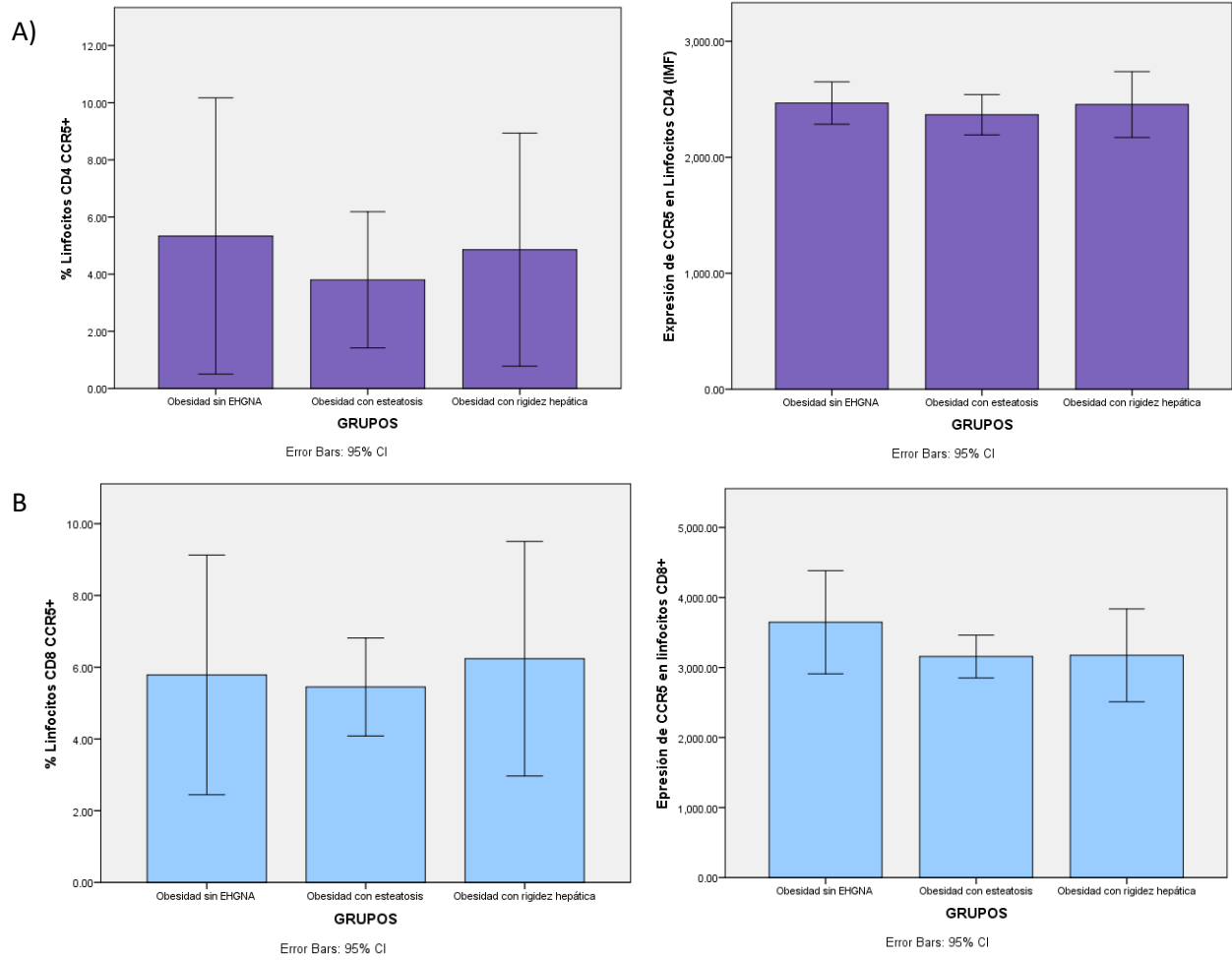
La expresión de CCR5 en linfocitos CD4 se correlacionó positivamente con HgA1c. Al realizar la evaluación por sexo, se observó que las mujeres no presentaron ninguna correlación entre linfocitos CCR5 y variables cardiometabólicas. Los varones además, presentaron una correlación positiva entre la expresión de CCR5 en linfocitos CD4 con HgA1c y VFA.

Figura 5. Frecuencia de linfocitos CD4 y CD8 CCR5⁺ y la expresión de su receptor entre niños con obesidad sin y con EHGNA



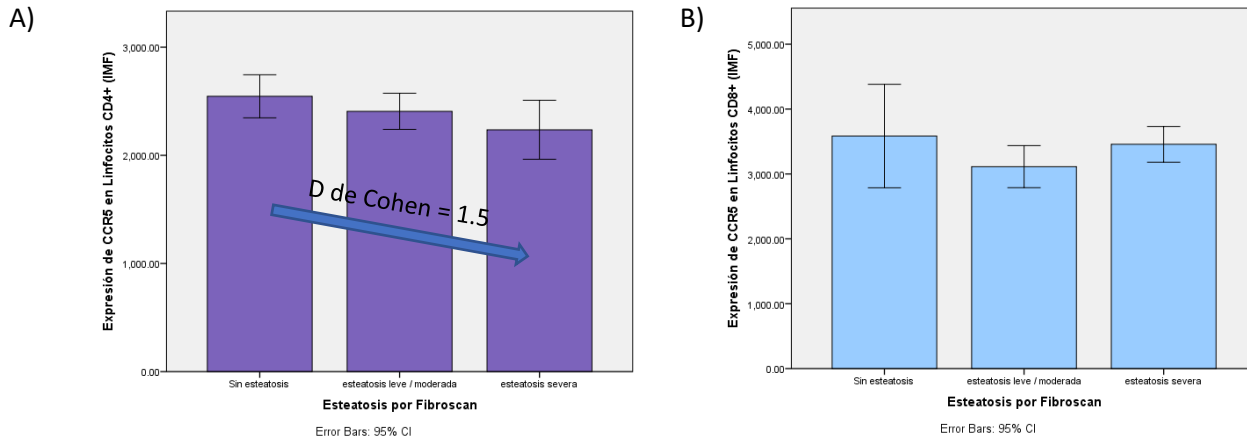
A) Linfocitos CD3 CD4 CCR5⁺ B) Linfocitos CD3 CD8 CCR5⁺
T Student

Figura 6. Frecuencia de linfocitos CD4 y CD8 CCR5⁺ y la expresión de su receptor en diferentes grados de severidad de EHGNA



A) Linfocitos CD3 CD4 CCR5⁺ B) Linfocitos CD3 CD8 CCR5⁺
ANOVA de una vía, tamaño del efecto

Figura 7. Expresión de CCR5 en linfocitos en presencia de esteatosis hepática



A) Linfocitos CD3 CD4 CCR5+ B) Linfocitos CD3 CD8 CCR5+
ANOVA de una vía, tamaño del efecto

Tabla 9. Variables cardiometabólicas asociadas a linfocitos CD4 y CD8 CCR5+

	Linfocitos CD3 CD4 CCR5+ (%)	IMF de CCR5 en Linfocitos CD4	Linfocitos CD3 CD8 CCR5+ (%)	IMF de CCR5 en Linfocitos CD3 CD8
HgA1C	-0.20	0.34*	0.04	0.10

Tabla 10. Variables cardiometabólicas asociadas a linfocitos CD4 y CD8 CCR5+ en niños varones

Sexo masculino	Linfocitos CD3 CD4 CCR5+ (%)	IMF de CCR5 en Linfocitos CD4	Linfocitos CD3 CD8 CCR5+ (%)	IMF de CCR5 en Linfocitos CD3 CD8
HgA1C	-0.02	0.58*	0.01	0.29
VFA cm3	0.29	0.58*	0.10	0.24

Discusión

La obesidad es considerada como una enfermedad inflamatoria. El sistema inmune juega un papel importante en el desarrollo de comorbilidades asociadas a la obesidad. Tanto las células del sistema inmune innato como las del sistema adaptativo se encuentran relacionadas con el estado proinflamatorio secundario el exceso de acumulo de grasa.

En niños con obesidad infantil se ha observado la participación de monocitos clásicos e intermedios en el estado proinflamatorio (Schipper et al., 2012). En adultos, también se han identificado a los monocitos CD14⁺⁺ activados como agentes inflamatorios en obesidad involucrados en complicaciones metabólicas y cardiovasculares (Rogacev et al., 2010). En nuestro estudio evaluamos la cantidad y expresión de CCR2 de monocitos circulantes entre niños con obesidad con y sin daño hepático, siendo ésta una de las principales comorbilidades en obesidad. Además, evaluamos la asociación de estas células inflamatorias con variables de daño cardiometabólico en niños y niñas con obesidad.

Entre los grupos de obesidad y daño hepático, no encontramos diferencias en la frecuencia de monocitos clásicos, intermedios y no-clásicos, pero se observó que los monocitos clásicos e intermedios (CD14⁺⁺) presentaban una mayor expresión de CCR2 en niños con obesidad y rigidez hepática. La rigidez hepática observada por elastografía transitoria se relaciona con fibrosis hepática, lo cual es un signo de mayor daño hepático (Nobili et al., 2008). Esto sugiere que probablemente a mayor daño hepático existe una mayor movilización de monocitos clásicos e intermedios hacia el sitio de lesión. Además, observamos que, a mayor esteatosis hepática, la expresión de CCR2 en monocitos intermedios y no-clásicos (monocitos CD16⁺) parece incrementar en niños con obesidad. Adicionalmente, observamos una fuerte asociación entre la expresión de CCR2 en monocitos CD16⁺ y enzimas hepáticas en niños con obesidad. Gadd y cols encontraron resultados similares, reportando que las subpoblaciones de monocitos circulantes presentaban una inclinación hacia poblaciones CD16⁺ en pacientes con EHGNA (Gadd et al., 2016). Zhang y cols también encontraron un incremento en monocitos intermedios en sujetos con EHGNA (Zhang et al., 2018b).

En nuestro estudio observamos que los monocitos circulantes CCR2⁺ presentan una asociación positiva con las enzimas hepáticas, sugiriendo que, a mayor lesión hepática, existe una mayor circulación de monocitos CCR2⁺. Estudios en animales han demostrado que la inhibición del receptor CCR2 reduce los niveles de ALT, así como la infiltración de leucocitos en tejido hepático (Parker et al., 2018). En nuestro estudio también observamos que la expresión de CCR2 en monocitos circulantes presenta una asociación positiva con variables de adiposidad, por lo que sugiere que la expresión de CCR2 aumenta conforme incrementa el acúmulo de tejido adiposo. Nuestros resultados son similares a la evidencia científica, en donde se ha demostrado la expresión de CCR2 influye en el desarrollo de obesidad y su estado proinflamatorio, así como en el mantenimiento de macrófagos en tejido adiposo (Weisberg et al., 2006).

Al evaluar la expresión de CCR2 en las diferentes subpoblaciones de monocitos, observamos que los monocitos no-clásicos presentaban una mayor asociación con tejido adiposo visceral, enzimas hepáticas, alteraciones en el metabolismo de glucosa, y con riesgo cardiovascular. Esto sugiere que monocitos no-clásicos juegan un papel importante en las comorbilidades asociadas a obesidad en niños. Mattos y cols observaron que en la obesidad los monocitos no-clásicos se direccionan hacia un perfil más inflamatorio (Mattos et al., 2016). De acuerdo con estos hallazgos, otros investigadores han demostrado que los monocitos no-clásicos se encuentran asociados a riesgo cardiovascular y metabólico. Ziegler y cols observaron que los monocitos CD16⁺ tienen una mayor afinidad por el endotelio y son productores potentes de citocinas proinflamatorias (Ziegler-heitbrock, 2006). Poitou y cols observaron que monocitos CD14^{dim}CD16⁺ (también conocidos como no-clásicos) presentaron una asociación con diabetes mellitus y glucosa en ayuno (Poitou et al., 2011). Las comorbilidades asociadas a obesidad se encuentran íntimamente relacionadas con el estado proinflamatorio que presentan estos sujetos. Es de suma importancia reconocer que esta inflamación se presenta en edades tempranas de la vida, lo cual es un gran riesgo para futuras enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

Existe una gran variedad de evidencia que demuestra que el tejido adiposo visceral se asocia a un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiometabólicas como hipertensión arterial, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, EHGNA y enfermedad coronaria (Chung et al., 2015; Lee et al., 2018). También existe evidencia de que sujetos del sexo masculino presentan un mayor acúmulo de grasa visceral en comparación con sujetos del sexo femenino, debido a una distribución corporal diferente (Palmer & Clegg, 2015; Schorr et al., 2018). En nuestro estudio observamos a varones con mayor cantidad de tejido adiposo visceral en comparación con las mujeres, quienes a su vez presentaban mayor porcentaje de grasa corporal.

Dado que los monocitos CCR2⁺ circulantes se encuentran fuertemente asociados al tejido adiposo visceral y los sujetos masculinos tienden a tener mayor acumulación de este tejido, entonces en nuestro estudio se optó por evaluar las diferencias entre la expresión de CCR2 en monocitos circulantes entre sexo y evaluar si existe un dimorfismo sexual.

En este estudio observamos la presencia de dimorfismo sexual, en dónde los varones con obesidad presentan una fuerte asociación entre monocitos CCR2⁺ y múltiples variables de riesgo cardiometabólico (tejido adiposo preperitoneal y visceral, espesor de intima media, HOMA, HbA1c, circunferencia de cintura, índice de masa corporal, Glucosa, ALT, GGT), mientras que las mujeres sólo presentan asociación con niveles de glucosa y ALT.

Se ha descrito que enfermedades cardiometabólicas tienen un predominio en el sexo masculino. El síndrome coronario agudo y el infarto agudo al miocardio ocurren de tres a cuatro veces más en hombres que en mujeres premenopáusicas (Regitz-Zagrosek et al., 2016). Además, la inflamación sistémica y local también participa en el progreso de

las enfermedades cardiovasculares y parecen responder de manera diferente entre sexos (Katsiari et al., 2019; Rathod et al., 2017). En este estudio observamos una fuerte asociación entre los monocitos circulantes CCR2⁺ y el espesor de intima media en varones con obesidad, lo que sugiere que el dimorfismo sexual de riesgo cardiovasculares parece iniciar desde edades tempranas.

El dimorfismo sexual también se observa en enfermedades como EHGNA y diabetes mellitus tipo 2, en donde la incidencia es mayor en hombres que en mujeres. El sexo masculino es un factor de riesgo para generar EHGNA (Shaunak et al., 2021). En mujeres, se ha observado que presentan una mayor sensibilidad a la insulina que los hombres (Mauvais-Jarvis, 2018). Simoes y cols observaron que niños varones con obesidad presentaban una respuesta inflamatoria diferente a las niñas con obesidad. Encontraron que solo los varones con obesidad presentan niveles elevados de leucocitos y amiloide a sérico (AAS), el cual induce la producción de CCL2 favoreciendo la migración de células inflamatorias con expresión de CCR2 (Simoes et al., 2021).

En nuestro estudio observamos una fuerte asociación entre los monocitos no clásicos que expresan CCR2 y variables de riesgo metabólico, daño hepático y resistencia a la insulina en varones con obesidad. De acuerdo a estos hallazgos, otros estudios han encontrado asociaciones similares. Jagannathan y cols encontraron una fuerte asociación entre monocitos no clásicos y HgA1C en sujetos con diabetes mellitus (Jagannathan et al., 2019). Gadd y colaboradores observaron un incremento en monocitos no clásicos en sujetos con EHGNA en comparación con sujetos con hepatitis C (Gadd et al., 2016).

Las diferencias encontradas sobre la respuesta inflamatoria entre sexo pudieran estar relacionadas al incremento en el tejido adiposo visceral observado en varones en comparación con la población femenina. Por otro lado, las hormonas sexuales y los cromosomas sexuales también juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria. Se ha documentado que los estrógenos y el cromosoma X tienen un efecto antiinflamatorio en diferentes enfermedades no transmisibles (Varghese et al., 2022).

Como podemos observar con nuestros resultados, los monocitos circulantes CCR2⁺ posiblemente participan en la fisiopatología de la obesidad y EHGNA. Se requieren nuevos estudios con una población mayor para poder confirmar el incremento de monocitos CCR2⁺ en sujetos con obesidad y daño hepático por esteatosis y fibrosis. La asociación observada entre monocitos CCR2⁺ y alteraciones en enzimas hepáticas, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular en varones hace resaltar la importancia de continuar investigando el dimorfismo sexual en esta patología y crear estrategias de mayor impacto en población infantil, con el fin de evitar desenlaces desfavorables en la edad adulta.

Actualmente no existe un medicamento aprobado que pueda revertir este daño, pero se han sugerido varias terapias que pudieran funcionar. Una de ellas es el uso de inhibidores del receptor de quimiocinas, como el inhibidor de CCR2/CCR5, el cual ha logrado mejorar

la fibrosis en modelos animales. Estos estudios se encuentran actualmente en estudios clínicos Fase IIb y en los resultados preliminares demuestran una mejoría en la fibrosis y un freno en la progresión de NASH (Lefere et al., 2020). Si los niños con obesidad tienen un incremento en monocitos circulantes CCR2⁺ y estos a su vez participan en la producción de un estado proinflamatorio, entonces podrían beneficiarse de medicamentos como los inhibidores de CCR2.

En cuanto a los linfocitos CCR5⁺ observamos que los linfocitos CD4⁺ CCR5⁺ presentaron una asociación positiva con el tejido adiposo visceral y HgA1C, estos resultados son similares a otros estudios en donde sugieren que los linfocitos CD4⁺ juegan un papel importante en la obesidad y la resistencia a la insulina (Xia et al., 2017). Recientemente se ha demostrado que niños con EHGNA presentan infiltrado de linfocitos CD4 Y CD8, teniendo una mayor proporción en niños con mayor severidad de la enfermedad (Cairolì et al., 2021). También se ha observado que linfocitos CD8 pudieran favorecer la resolución de fibrosis hepática en sujetos con NASH mediante la activación de apoptosis de células estrelladas con la ayuda del receptor CCR5 (Koda et al., 2021). En nuestro estudio no observamos incremento de linfocitos CD4 ni CD8 CCR5⁺ en niños con mayor severidad de enfermedad. Tampoco observamos una correlación entre los linfocitos CD4 y CD8 CCR5⁺ y daño hepático, probablemente este hallazgo se deba a un tamaño de muestra pequeño y a la falta de biopsia hepática para poder diagnosticar con certeza esteatosis y fibrosis hepática.

Limitaciones del estudio

El estudio se realizó con un tamaño de muestra pequeño, se sugiere realizar un nuevo estudio con un mayor número de participantes, así como incluir un grupo control de niños eutróficos. Para el diagnóstico de esteatosis y rigidez hepática utilizamos la elastografía transitoria, la cual tiene una adecuada sensibilidad y especificidad para utilizarla en niños. Sin embargo, el uso de resonancia magnética nuclear (RMN) sería un estudio más apropiado para el diagnóstico de EHGNA si no contamos con estudio patológico mediante biopsia hepática. Por cuestiones de factibilidad y presupuesto, no nos fue posible utilizar la RMN o la biopsia hepática.

Conclusión

Monocitos CCR2⁺ circulantes incrementan durante la obesidad infantil y el tejido adiposo visceral promueve el estado proinflamatorio en estos niños. Los monocitos inflamatorios que expresan CCR2 parecen incrementar conforme incrementa la severidad de esteatosis hepática. Adicionalmente, los monocitos no-clásicos demostraron presentar el mayor grado de asociación frente a variables de daño cardiometabólico como el espesor de intima media y la resistencia a la insulina en varones con obesidad y no en mujeres. Esto es de gran importancia, ya que el manejo de niños con obesidad y EHGNA deberá evaluarse de una manera diferente entre mujeres y hombres. Es de gran preocupación, que desde edades tan tempranas niños con obesidad estén presentando cambios cardiometabólicos que posteriormente pondrán en riesgo su salud. Se debe actuar de

manera temprana para evitar que estos niños formen parte de la incidencia de sujetos con diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y esteatohepatitis.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a todos los médicos y enfermeras que hicieron posible este proyecto. Con un especial reconocimiento para la Dra. Queipo García que me apoyó durante todo este camino, al Dr. Juan Carlos López Alvarenga por siempre apoyarme en los análisis estadísticos, a la Dra. Nayely Garibay por incluirme al proyecto de obesidad infantil, y al Dr. Galileo Escobedo que me apoyó en la elaboración de la publicación del artículo para este doctorado.

Referencias

- Betancourt-garcia, M. M., Arguelles, A., Montes, J., Hernandez, A., Singh, M., & Forse, R. A. (2017). Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease : the Rise of a Lethal Disease Among Mexican American Hispanic Children. *Obesity Surgery*, 236–244. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2440-5>
- Bhattacharjee, J., Kirby, M., Softic, S., & Miles, L. (2017). *with Nonalcoholic Steatohepatitis*. 1(4), 299–310. <https://doi.org/10.1002/hep4.1041>
- Böhm, B., Hartmann, K., Buck, M., & Oberhoffer, R. (2009). Sex differences of carotid intima-media thickness in healthy children and adolescents. *Atherosclerosis*, 206(2), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.016>
- Braunersreuther, V., Viviani, G. L., Mach, F., & Montecucco, F. (2012). Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 18(8), 727–735. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i8.727>
- Byeong Moo, K., Abdelfattah, A. M., Vasan, R., Fuchs, B. C., & Choi, M. Y. (2018). Hepatic stellate cells secrete Ccl5 to induce hepatocyte steatosis. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25699-9>
- Cairolì, V., Matteo, E. De, Rios, D., Lezama, C., Galoppo, M., Casciato, P., Mullen, E., Giadans, C., Bertot, G., Preciado, M. V., & Valva, P. (2021). Hepatic lymphocytes involved in the pathogenesis of pediatric and adult non - alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84674-z>
- Chung, G. E., Kim, D., Kwark, M. S., Kim, W., Yim, J. Y., Kim, Y. J., & Yoon, J. H. (2015). Visceral adipose tissue area as an independent risk factor for elevated liver enzyme in nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (United States)*, 94(9), e573. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000573>
- Clemente, M. G., Mandato, C., Poeta, M., Vajro, P., Clemente, M. G., & Clinic, P. (2016). *Pediatric non-alcoholic fatty liver disease : Recent solutions , unresolved*

issues , and future research directions. 22(36), 8078–8093.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i36.8078>

- Dagur, P. K., & McCoy, J. P. (2015). Collection, storage, and preparation of human blood cells. *Current Protocols in Cytometry*, 2015, 5.1.1-5.1.16.
<https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0501s73>
- De Vito, R., Alisi, A., Masotti, A., Ceccarelli, S., Panera, N., Citti, A., Salata, M., Valenti, L., Feldstein, A. E., & Nobili, V. (2012). Markers of activated inflammatory cells correlate with severity of liver damage in children with nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(1), 49–56.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.965>
- Desai, N. K., Harney, S., Raza, R., & Al-ibraheemi, A. (2016). *Comparison of Controlled Attenuation Parameter and Liver Biopsy to Assess Hepatic Steatosis in Pediatric Patients*. 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.03.021>. Comparison
- Devèvre, E. F., Renovato-martins, M., Sautès-fridman, C., Cremer, I., Poitou, C., Cremer, I., & Saute, C. (2015). *Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity*. 194, 3917–3923.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402655>
- Engin, A. B., & Engin, A. (2017). *Obesity and Lipotoxicity*. 960.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5>
- Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., Sanyal, A., Neuschwander-Tetri, B., Tiribelli, C., Kleiner, D. E., Brunt, E., Bugianesi, E., Yki-Järvinen, H., Grønbaek, H., Cortez-Pinto, H., Fan, J., Valenti, L., Abdelmalek, M., Romero-Gomez, M., Rinella, M., Arrese, M., Bedossa, P., ... Younossi, Z. (2020). MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1999-2014.e1.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312>
- Ferreira-Solari, N. E., Inzaugarat, M. E., Baz, P., De Matteo, E., Lezama, C., Galoppo, M., Galoppo, C., & Chervinsky, A. C. (2012). The Role of Innate Cells Is Coupled to a Th1-Polarized Immune Response in Pediatric Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Immunol*, 32, 611–621. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9635-2>
- Fitzpatrick, E., Dew, T. K., Quaglia, A., Sherwood, R. A., Mitry, R. R., & Dahawan, A. (2012). Analysis of adipokine concentrations in pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatric Obesity*, 7(6), 446–452. <https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00082>
- Fouad, Y., Waked, I., Bollipo, S., Gomaa, A., Ajlouni, Y., & Attia, D. (2020). What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD.' *Liver International*, 40(6), 1254–1261.
<https://doi.org/10.1111/liv.14478>
- Gadd, V. L., Patel, P. J., Jose, S., Horsfall, L., Powell, E. E., & Irvine, K. M. (2016). *Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease : Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation*. 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157771>

- Georgakis, M. K., Bernhagen, J., Heitman, L. H., Weber, C., & Dichgans, M. (2022). *Targeting the CCL2 – CCR2 axis for atheroprotection*. 1799–1808.
- Haukeland, J. W., Damas, J. K., Konopski, Z., Løberg, E. M., Haaland, T., Goverud, I., Torjesen, P. A., Birkeland, K., Bjørø, K., & Aukrust, P. (2006). *Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2*. *44*, 1167–1174. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.02.011>
- Heymann, F., & Tacke, F. (2016). Immunology in the liver-from homeostasis to disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *13*(2), 88–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>
- Iglesias Del Sol, A., Bots, M. L., Grobbee, D. E., Hofman, A., & Witteman, J. C. M. (2002). Carotid intima-media thickness at different sites: Relation to incident myocardial infarction - The Rotterdam Study. *European Heart Journal*, *23*(12), 934–940. <https://doi.org/10.1053/euhj.2001.2965>
- Jagannathan, R., Thayman, M., & Rao, S. R. (2019). *mellitus patients with / without chronic periodontitis*. 95–103.
- Katsiari, C. G., Bogdanos, D. P., & Sakkas, L. I. (2019). Inflammation and cardiovascular disease. *World Journal of Translational Medicine*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v8.i1.1>
- Koda, Y., Teratani, T., Chu, P. S., Hagihara, Y., Mikami, Y., Harada, Y., Tsujikawa, H., Miyamoto, K., Suzuki, T., Taniki, N., Sujino, T., Sakamoto, M., Kanai, T., & Nakamoto, N. (2021). CD8+ tissue-resident memory T cells promote liver fibrosis resolution by inducing apoptosis of hepatic stellate cells. *Nature Communications*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24734-0>
- Lee, J. J., Pedley, A., Hoffmann, U., Massaro, J. M., Levy, D., & Long, M. T. (2018). Visceral and Intrahepatic Fat Are Associated with Cardiometabolic Risk Factors Above Other Ectopic Fat Depots: The Framingham Heart Study. *The American Journal of Medicine*, *131*(6), 684-692.e12. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.02.002>
- Lefere, S., Devisscher, L., & Tacke, F. (2020). Targeting CCR2/5 in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and fibrosis: opportunities and challenges. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *29*(2), 89–92. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1718106>
- Lentferink, Y. E., Elst, M. A. J., Knibbe, C. A. J., & Vorst, M. M. J. Van Der. (2017). *Predictors of Insulin Resistance in Children versus Adolescents with Obesity*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3793868>
- Liu, W., Baker, R. D., Bhatia, T., Zhu, L., & Baker, S. S. (2016). Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(10), 1969–1987. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2161-x>
- Madan, S. A., John, F., Pysopoulos, N., & Pitchumoni, C. S. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease and carotid artery atherosclerosis in children and adults: A meta-

- analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(11), 1237–1248. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000000429>
- Marra, F., & Tacke, F. (2014). Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*, 147(3), 577-594.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.043>
- Mattos, R. T., Medeiros, N. I., Menezes, C. A., Fares, R. C. G., & Correa-oliveira, R. (2016). *Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets*. 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168610>
- Mauvais-Jarvis, F. (2018). Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. *Physiology & Behavior*, 187(5), 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.016>
- Miura, K., Yang, L., Rooijen, N. Van, Ohnishi, H., & Seki, E. (2012). *Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2*. 518754, 1310–1321. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00365.2011>
- Mook-Kanamori, D. O., Holzhauer, S., Hollestein, L. M., Durmus, B., Manniesing, R., Koek, M., Boehm, G., van der Beek, E. M., Hofman, A., Witteman, J. C. M., Lequin, M. H., & Jaddoe, V. W. V. (2009). Abdominal Fat in Children Measured by Ultrasound and Computed Tomography. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 35(12), 1938–1946. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.07.002>
- Moroni, F., Ammirati, E., Norata, G. D., Magnoni, M., & Camici, P. G. (2019). The role of monocytes and macrophages in human atherosclerosis, plaque neoangiogenesis, and atherothrombosis. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7434376>
- Narayanan, S., Surette, F. A., & Hahn, Y. S. (2016). The immune landscape in nonalcoholic steatohepatitis. *Immune Network*, 16(3), 147–158. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.3.147>
- Nobili, V., Vizzutti, F., Arena, U., Abraldes, J. G., Marra, F., Pietrobattista, A., Fruhwirth, R., Marcellini, M., & Pinzani, M. (2008). Accuracy and Reproducibility of Transient Elastography for the Diagnosis of Fibrosis in Pediatric Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 48, 442–448. <https://doi.org/10.1002/hep.22376>
- Obstfeld, A. E., Sugaru, E., Thearle, M., Francisco, A., Gayet, C., Ginsberg, H. N., Ables, E. V., & Jr, A. W. F. (2010). *diabetes*, 59, 916-925 (2010) Ferrante *CCR2.pdf*. 59(April). <https://doi.org/10.2337/db09-1403.A.E.O>
- Oo, Y. H., Shetty, S., & Adams, D. H. (2010). *The Role of Chemokines in the Recruitment of Lymphocytes to the Liver*. 31–44. <https://doi.org/10.1159/000282062>
- Palmer, B. F., & Clegg, D. J. (2015). The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.029>
- Parker, R., Weston, C. J., Miao, Z., Corbett, C., Armstrong, M. J., Ertl, L., Ebsworth, K., Walters, M. J., Baumart, T., Newland, D., McMahon, J., Zhang, P., Singh, R.,

- Campbell, J., Newsome, P. N., Charo, I., Schall, T. J., & Adams, D. H. (2018). CC chemokine receptor 2 promotes recruitment of myeloid cells associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(4), G483–G493. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00213.2017>
- Poitou, C., Dalmás, E., Renovato, M., Benhamo, V., Hajduch, F., Abdennour, M., Veyrie, N., Rizkalla, S., Saute, C., Cle, K., & Cremer, I. (2011). *CD14^{dim} CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in obesity and During Weight Loss Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis*. 2322–2330. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230979>
- Rathod, K. S., Kapil, V., Velmurugan, S., Khambata, R. S., Siddique, U., Khan, S., Eijl, S. Van, Gee, L. C., Bansal, J., Pitrola, K., Shaw, C., D'Acquisto, F., Colas, R. A., Marelli-Berg, F., Dalli, J., & Ahluwalia, A. (2017). Accelerated resolution of inflammation underlies sex differences in inflammatory responses in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 169–182. <https://doi.org/10.1172/JCI89429>
- Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Prescott, E., Franconi, F., Gerds, E., Foryst-Ludwig, A., Maas, A. H. E. M., Kautzky-Willer, A., Knappe-Wegner, D., Kintscher, U., Ladwig, K. H., Schenck-Gustafsson, K., & Stangl, V. (2016). Gender in cardiovascular diseases: Impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *European Heart Journal*, 37(1), 24–34. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv598>
- Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blomer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Kohler, H., Fliser, D., Girndt, M., & Heine, G. H. (2010). *Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis*. 14, 369–376. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp308>
- Schipper, H. S., Nuboer, R., Prop, S., Van Den Ham, H. J., De Boer, F. K., Kesmir, Ç., Mommers, I. M. H., Van Bekkum, K. a., Woudstra, J., Kieft, J. H., Hofer, I. E., De Jager, W., Prakken, B., Van Summeren, M., & Kalkhoven, E. (2012). Systemic inflammation in childhood obesity: Circulating inflammatory mediators and activated CD14⁺⁺ monocytes. *Diabetologia*, 55, 2800–2810. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2641-y>
- Schorr, M., Dichtel, L. E., Gerweck, A. V, Valera, R. D., Torriani, M., Miller, K. K., & Bredella, M. A. (2018). Sex differences in body composition and association with cardiometabolic risk. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0189-3>
- Shaunak, M., Byrne, C. D., Davis, N., Afolabi, P., Faust, S. N., & Davies, J. H. (2021). *Non-alcoholic liver disease and childhood obesity*. 1–6. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2019-318063>
- Shimobayashi, M., Albert, V., Woelnerhanssen, B., Frei, I. C., Weissenberger, D., Meyer-Gerspach, A. C., Clement, N., Moes, S., Colombi, M., Meier, J. A., Swierczynska, M. M., Jenö, P., Beglinger, C., Peterli, R., & Hall, M. N. (2018). Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *Journal of Clinical*

- Investigation*, 128(4), 1538–1550. <https://doi.org/10.1172/JCI96139>
- Simoes, E., Correia-Lima, J., Sardas, L., Storti, F., Otani, T. Z. dos S., Vasques, D. A. C., Otani, V. H. O., Bertolazzi, P., Kochi, C., Seelaender, M., & Uchida, R. R. (2021). Sex dimorphism in inflammatory response to obesity in childhood. *International Journal of Obesity*, 45(4), 879–887. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00753-1>
- Smith, S. K., & Perito, E. R. (2018). Nonalcoholic Liver Disease in Children and Adolescents. *Clinics in Liver Disease*, 22(4), 723–733. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.07.001>
- Stansfield, B. K., & Ingram, D. A. (2015). *Clinical significance of monocyte heterogeneity*. <https://doi.org/10.1186/s40169-014-0040-3>
- Takahashi, Y., & Fukusato, T. (2014). Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15539–15548. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15539>
- Temple, J. L., Cordero, P., Li, J., Nguyen, V., & Oben, J. A. (2016). A guide to non-alcoholic fatty liver disease in childhood and adolescence. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060947>
- Tilg, H., & Effenberger, M. (2020). From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(7), 387–388. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0316-6>
- Van Der Aa, M. P., Farsani, S. F., Kromwijk, L. A. J., Boer, A. De, Knibbe, C. A. J., & Vorst, M. M. J. Van Der. (2014). *How to Screen Obese Children at Risk for Type 2 Diabetes Mellitus ?* 21–26. <https://doi.org/10.1177/0009922813509480>
- Varghese, M., Song, J., & Singer, K. (2022). *Age and Sex: impact on adipose tissue metabolism and inflammation*. *Cvd*, 1–38. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111563>
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation*, 116(1), 115–124. <https://doi.org/10.1172/JCI24335>
- Wójcik-Cichy, K., Koślińska-Berkan, E., & Piekarska, A. (2018). The influence of NAFLD on the risk of atherosclerosis and cardiovascular diseases. *Clinical and Experimental Hepatology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.5114/ceh.2018.73155>
- Wolf, M. J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Tumanov, A. V., Haller, D., Unger, K., Karin, M., Kopf, M., & Knolle, P. (2014). *Article Metabolic Activation of Intrahepatic CD8 + T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes*. 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
- Xia, C., Rao, X., & Zhong, J. (2017). *Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and*

Diabetes-Associated Inflammation. 2017.

- Zhang, J., Chen, W., Fang, L., Li, Q., Zhang, X., Zhang, H., Guan, Q., Zhao, R., Yang, C., & Jing, F. (2018a). Increased intermediate monocyte fraction in peripheral blood is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 130(11–12), 390–397. <https://doi.org/10.1007/s00508-018-1348-6>
- Zhang, J., Chen, W., Fang, L., Li, Q., Zhang, X., Zhang, H., Guan, Q., Zhao, R., Yang, C., & Jing, F. (2018b). *Increased intermediate monocyte fraction in peripheral blood is associated with nonalcoholic fatty liver disease.* <https://doi.org/10.1007/s00508-018-1348-6>
- Ziegler-Heitbrock, L. (2006). *The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes : their role in infection and inflammation.* <https://doi.org/10.1189/jlb.0806510>