



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la expresión génica de *CIITA*, *CD74* y *CD86* en muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes con obesidad mórbida

TESIS

P R E S E N T A:

CHAVEZ HERNANDEZ IRVING JESUS

Correo electrónico: chavezhernandezirvingjesus.21@gmail.com

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

DIRECTOR: DR. SUÁREZ SÁNCHEZ FERNANDO

Correo electrónico: fernandossfg@yahoo.com.mx

ASESORA: DRA. RETANA UGALDE RAQUEL

Correo electrónico: retanara@unam.mx

ASESOR: M. en C. FERNÁNDEZ RIVERA OMAR

Correo electrónico: omar.fernandez@zaragoza.unam.mx



CIUDAD DE MÉXICO, 2024



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.

Agradecimientos y/o dedicatorias (opcional)

Índice

Resumen	4
Introducción	6
Marco teórico	7
1. Obesidad.....	7
1.1 Etiopatogenia	7
1.2 Fisiopatología de la obesidad	8
2. Tipos de obesidad	9
3. Tejido adiposo.....	10
3.1 Tejido adiposo blanco	11
3.1.1 Tejido adiposo subcutáneo y visceral.....	12
4. Inmunidad innata en la obesidad	12
4.1 Infiltración de macrófagos y monocitos en tejido adiposo	13
4.2 Inflamación y las células T residentes en el tejido adiposo	14
5. Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II).....	15
5.1 Interacción MHC clase II-péptido.....	16
5.2 El MHC de clase II y su genética	16
Planteamiento del problema	18
Pregunta de investigación.....	19
Objetivos.....	19
General	19
Específicos	19
Material y métodos.....	19
1. Universo.....	19
2. Técnicas, materiales o instrumentos.....	20
2.1 Obtención y almacenamiento de muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral*	20
2.2 Extracción de RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral*	20
2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del RNA total extraído de muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral.....	20
2.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral.....	20
2.5 Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes <i>CIITA</i> , <i>CD74</i> , <i>CD86</i> , <i>ACTB</i> y <i>PGK1</i>	21
3. Variables.....	22
3.1 Variables antropométricas	22
3.2 Variable clínica	22
3.3 Variables bioquímicas.....	22
4. Diseño de estudio.....	22
5. PCR a tiempo real (qPCR cuantitativa)	23
6. Análisis estadísticos.....	24

Resultados.....	25
1. Tejido adiposo subcutáneo	25
1.1 Correlación (rho) entre datos antropométricos y bioquímicos con el ΔCt de los genes <i>CIITA</i> , <i>CD74</i> y <i>CD86</i>	25
1.2 Comparación de medidas entre el diagnóstico de DT2 y el ΔCt de los genes <i>CIITA</i> , <i>CD74</i> y <i>CD86</i>	26
1.3 Diferencias de grupos entre la variable glucosa y el gen <i>CD86</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	29
1.4 Diferencias de grupos entre la variable triglicéridos y el gen <i>CD74</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	29
2. Tejido adiposo visceral.....	31
2.1 Correlación (rho) entre datos antropométricos y bioquímicos con el ΔCt de los genes <i>CIITA</i> , <i>CD74</i> y <i>CD86</i>	31
2.2 Comparación de medidas entre el diagnóstico de DT2 y el ΔCt de los genes <i>CIITA</i> , <i>CD74</i> y <i>CD86</i>	33
2.3 Diferencias de grupos entre la variable cadera y el gen <i>CIITA</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	35
2.4 Diferencias de grupos entre la variable colesterol y el gen <i>CD86</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	36
2.5 Diferencias de grupos entre la variable insulina y el gen <i>CIITA</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	37
2.6 Diferencias de grupos entre la variable insulina y el gen <i>CD74</i> mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	38
Discusión	39
Conclusiones.....	43
Referencias bibliográficas	44
Anexos.....	47
1. Valores de concentración, índices 260/230 y 260/280 del RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral.....	47
2. Estandarización de las condiciones de PCR a tiempo real mediante PCR a punto final	49

Resumen

Antecedentes: La obesidad representa una enfermedad que afecta la calidad de vida de las personas, entre las principales alteraciones que provoca dicho padecimiento es en el sistema inmune. La inflamación crónica de bajo grado se presenta en los pacientes con obesidad, donde no se observan signos evidentes de inflamación, como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor, a diferencia de la clásica, que sí los presenta. Diferentes células participan en este proceso, entre las cuales se encuentran las células presentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células dendríticas, y las más importantes descubiertas recientemente, los adipocitos, que expresan en su superficie el MHC-II y llevan a cabo la presentación antígeno-linfocito T CD4⁺, y con ello, alterando el sistema inmune adaptativo, dando como resultado la aparición de más enfermedades derivadas de la obesidad, como lo es la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2.

Métodos: Los pacientes seleccionados, se les extrajeron muestras de TA subcutáneo y visceral por parte de un cirujano durante la cirugía bariátrica, las cuales se almacenaron para su posterior extracción de RNA total, el cual fue necesario para la síntesis de cDNA para llevar a cabo la técnica de PCR a tiempo real (qPCR) con el fin de cuantificar los niveles de expresión de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86* y realizar análisis de correlación con variables antropométricas, bioquímicas, T-student con la variable diagnóstico de diabetes tipo 2, además de un análisis empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para observar la diferencia en el nivel de expresión de los genes mencionados anteriormente en dos grupos (grupo control y problema) formados a partir de los puntos de corte realizados a las variables antropométricas, bioquímicas y de diagnóstico.

Resultados: Los resultados se dividen en dos partes, los primeros en relación con el TA subcutáneo, respecto a la correlación de Spearman arrojaron un valor de -0.406 ($p= 0.0322$) entre la variable IMC y el ΔCt *CD74*, lo que indica que a medida que el IMC incrementa, el nivel de expresión del gen *CD74* disminuye. Con respecto a la diferencia de grupos, el primer resultado obtenido fue entre la variable glucosa y el gen *CD86*, los pacientes con niveles de glucosa por debajo del punto de corte (100 mg/dL) obtuvieron un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *CD86*= 1 (límite inferior= 0.61; límite superior= 1.63), mientras que los pacientes con niveles por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *CD86*= 2.31 ($p<0.005$) (límite inferior= 0.86; límite superior= 6.20), lo que indica que a medida que a mayores niveles de glucosa mayor es la expresión del gen *CD86*. Otro resultado obtenido de la diferencia de grupos fue entre la variable triglicéridos y el gen *CD74*, los pacientes con niveles de triglicéridos por debajo del punto de corte (150 mg/dL) obtuvieron un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *CD74*= 1 (límite inferior= 0.63; límite superior= 1.58), mientras que los pacientes con niveles por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *CD74*= 1.55 ($p<0.05$) (límite inferior= 0.88; límite superior= 2.74), dando a entender que a mayores niveles de triglicéridos, mayores son los niveles de expresión del gen *CD74*.

Los resultados obtenidos respecto al TA visceral fueron los siguientes, con respecto a la correlación de Spearman se obtuvieron un valor de -0.377 ($p= 0.0258$) entre la variable triglicéridos y el ΔCt *CD86*, representando una relación directamente proporcional, a mayores niveles de triglicéridos mayor es la expresión del gen *CD86*, como también, se observaron valores de correlación de -0.396 ($p= 0.0184$) y -0.337 ($p= 0.048$) entre las variables insulina- ΔCt *CD74* y HOMA-IR- ΔCt *CD74*

respectivamente, lo que representa que a medida que los niveles de insulina y HOMA-IR incrementan, también lo hacen los niveles de expresión del gen *CD74*. Con respecto a la diferencia de grupos, el primer resultado obtenido se dio entre la variable cadera y el gen *CIITA*, los pacientes con medida de cintura por debajo del punto de corte (139 cm) obtuvieron un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CIITA = 1$ (límite inferior= 0.35; límite superior= 2.85), mientras que los pacientes con medidas por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CIITA = 180.67$ ($p=1 \times 10^{-17}$) (límite inferior= 86.76; límite superior= 376.24), demostrando que a mayor medida de cadera mayores son los niveles de expresión del gen *CIITA*. Otro resultado obtenido fue entre la variable colesterol y el gen *CD86*, los pacientes con niveles de colesterol por debajo del punto de corte (170 mg/dL) obtuvieron un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CD86 = 1$ (límite inferior= 0.44; límite superior= 2.27), mientras que los pacientes con niveles por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CD86 = 1.97$ ($p < 0.05$) (límite inferior= 0.72; límite superior= 5.34), indicando que a mayores niveles de colesterol mayores son los niveles de expresión del gen *CD86*. Y finalmente, los últimos dos resultados abarcaron la variable insulina con los genes *CIITA* y *CD74*, los pacientes con niveles de insulina por debajo del punto de corte (16.6 mU/L) obtuvieron un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CIITA = 1$ (límite inferior= 0.56; límite superior= 1.77), mientras que los pacientes con niveles por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CIITA = 2.25$ ($p < 0.05$) (límite inferior= 0.72; límite superior= 7.06), de igual manera, los pacientes por debajo del punto de corte un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CD74 = 1$ (límite inferior= 0.57; límite superior= 1.75), mientras que los pacientes con niveles por encima del punto de corte dieron como resultado un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} CD74 = 1.68$ ($p < 0.005$) (límite inferior= 0.98; límite superior= 2.86), lo que sugiere que a medida que los niveles de insulina incrementa, también lo hacen tanto los niveles de expresión de los genes *CIITA* y *CD74*.

Conclusión: Respecto al TA subcutáneo de los pacientes, se observó una relación inversamente proporcional entre el IMC y los niveles de expresión del gen *CD74*, además, los pacientes con niveles elevados de glucosa (100 mg/dL) y triglicéridos (150 mg/dL) demostraron mayores niveles de expresión de los genes *CD86* y *CD74* respectivamente. Con referente al TA visceral, se observaron relaciones directamente proporcionales entre las variables triglicéridos, insulina-HOMA-IR con los niveles de expresión de los genes *CD86* y *CD74* respectivamente, como también, los pacientes con medidas y niveles elevados de cadera (139 cm), colesterol (170 mg/dL), e insulina (16.6 mU/L) indicaron mayores niveles de expresión de los genes *CIITA*, *CD86*, *CIITA-CD74* respectivamente.

Introducción

En las últimas décadas la obesidad se ha convertido en un importante problema de salud pública en las sociedades desarrolladas y economías en transición. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la sobrecarga ponderal es el quinto factor de riesgo de mortalidad en el mundo, después de la hipertensión arterial, el consumo de tabaco, la hiperglucemia y la inactividad física. Se estima que en torno a 2.8 millones de muertes al año se asocian con la obesidad en el mundo y que hasta el 44% de la carga de diabetes, el 23% de la enfermedad isquémica cardíaca y entre el 7% y 41% para algunos tipos de cáncer son atribuibles al exceso de peso. Un índice de masa corporal (IMC) elevado es uno de los ocho factores de riesgo responsables del 61% de la mortalidad cardiovascular y más del 75% de la mortalidad por enfermedad isquémica cardíaca, la principal causa de mortalidad en el mundo. La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial cuya causa principal radica en un desequilibrio energético. La OMS define el sobrepeso y obesidad como una acumulación anormal excesiva de grasa corporal que representa un peligro para la salud. La obesidad afecta negativamente a casi todas las funciones fisiológicas del cuerpo y se ha descrito como el principal factor de riesgo de numerosas enfermedades, como la diabetes *mellitus* de tipo 2, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cánceres.¹ Desde hace algún tiempo se ha aceptado de forma consensuada la utilización del IMC ~peso en kilogramos dividido entre el cuadrado de la talla en metros (kg/m²)~ para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos y más recientemente también en niños. La OMS define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30. Se considera obesidad mórbida, obesidad severa u obesidad clase III cuando el IMC es de 40 o mayor o bien el IMC es de 35 o mayor y está asociado a la presencia de al menos una comorbilidad significativa, como la diabetes o la hipertensión arterial, entre otras, que puede mejorar con la pérdida de peso.²

El objetivo de este estudio abarca a nivel genético las consecuencias de la obesidad mórbida, así como otro tipo de comorbilidades en el sistema inmune, a través de la cuantificación de genes en específico (*CIITA*, *CD74* y *CD86*) responsables de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II o HLA *por sus siglas en inglés Human Leukocyte Antigen*) empleando la técnica de PCR en tiempo real, realizada a muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral las cuales fueron obtenidas durante la cirugía bariátrica de pacientes con obesidad mórbida.

Marco teórico

1. Obesidad

La obesidad representa un proceso patológico común en el ser humano. Dicho proceso ha perdurado durante siglos por factores genéticos y ambientales, hasta convertirse actualmente en una pandemia con consecuencias serias para la salud. Este incremento en la prevalencia de obesidad está relacionado con factores dietéticos y con un incremento en el estilo de vida sedentario. El aumento del consumo de grasas saturadas y de carbohidratos, unido a una disminución de la ingesta de vegetales y unos bajos niveles de actividad física, son las causas más importantes en el desarrollo de este problema de salud mundial. Por otra parte, las consecuencias de la obesidad alcanzan proporciones catastróficas. Entre ellas cabría destacar las enfermedades cardíacas y vasculares, alteraciones del metabolismo lipídico (dislipemias) y en consecuencia aterosclerosis; alteraciones en determinado tipo de hormonas con gran actividad metabólica como la insulina, originando problemas de resistencia celular a la misma (hiperinsulinemia); menor tolerancia a la glucosa, lo que origina riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II; hipertensión arterial con el riesgo de accidentes cerebrovasculares (ACV) que ello supone; déficit de hormona de crecimiento e hiperleptinemia.³

1.1 Etiopatogenia

Los conocimientos actuales sobre genética y biología molecular permiten plantear la etiopatogenia de la obesidad como un fenómeno complejo. En este sentido, la teoría de un aumento de la ingesta mantenido en relación a un deficiente gasto energético resulta una teoría excesivamente simplista, ya que la obesidad es un trastorno muy heterogéneo en su origen, estando implicados diversidad de factores, tanto genéticos como nutricionales.³

1.1.1 Factores genéticos

Estudios recientes sugieren que el desarrollo de la obesidad podría tener su origen en las etapas más precoces de la vida, esto es, durante el período fetal. Según esto, en el período fetal tendrá lugar un mecanismo de programación, el cual activará numerosos procesos nutricionales, hormonales, físicos y psicológicos, los cuales van a actuar en períodos críticos de la vida configurando ciertas funciones fisiológicas. Así, se ha podido determinar cómo el riesgo de padecer obesidad extrema a lo largo de la vida (IMC>45), se multiplica por 7 cuando uno de los progenitores la padece. De acuerdo a la séptima revisión del mapa de la obesidad humana, han sido publicados 47 casos de obesidad monogénica, 24 casos de alteraciones mendelianas y 115 loci diferentes y susceptibles de encontrarse implicados en obesidades poligénicas. En este sentido, el mapa de la obesidad indica que, excepto en el cromosoma Y, en todos los cromosomas hay genes con una potencial implicación en la aparición y desarrollo de la obesidad. Uno de los genes descubiertos por su potencial implicación en el desarrollo de obesidad a edades tempranas es el gen *FTO21*. Se lo considera inductor de la ganancia progresiva de peso en aquellos sujetos en los que se encuentra sobreexpresado. Por lo general, su expresión es mayor en las áreas hipotalámicas implicadas en el proceso de alimentación.³

Se conocen mutaciones en determinados genes humanos responsables de la aparición de efectos pleiotrópicos que cursan con cuadros de obesidad mórbida como manifestación clínica. Entre ellos podemos destacar el síndrome de Prader–Willi, de carácter autosómico dominante. En un 70% de los casos, el paciente muestra anomalías en varios genes localizados a su vez en el cromosoma 15 paterno. Desde un punto de vista clínico, dicho síndrome en el niño se caracteriza por el desarrollo de un cuadro de obesidad, hipotonía muscular, retraso mental, hipogonadismo, criptorquidia y baja talla acompañada de manos y pies pequeños. Y el síndrome de Alström-Hallgren, caracterizado por la aparición de ceguera por distrofia retiniana, sordera nerviosa, miocardiopatía, diabetes mellitus e insuficiencia renal, aunque sin polidactilia ni retraso mental. En dicho síndrome, la obesidad suele aparecer a partir de los 2 años de edad, destacando un incremento en las cifras de peso que a menudo superan en un 100% los valores normales para la edad y sexo del niño. Su transmisión hereditaria es de tipo autosómico recesiva, y es causada por una mutación en el gen *ALMS1* situado en el cromosoma 2.³

1.1.2 Cambios en el patrón de alimentación y de actividad física

En el mundo occidental, la emergencia de la biotecnología alimentaria, ha posibilitado consumir durante todo el año cualquier tipo de alimento. En tal sentido se ha producido un incremento en el consumo de alimentos de origen animal, así como de bebidas carbonatadas de elevado contenido calórico, cuya ingesta representa entre el 20–30% del total de la energía ingerida a diario. Del mismo modo, el hábito de comer fuera de casa de manera permanente contribuye también al incremento progresivo de tejido adiposo ya que dichas comidas suelen ser ricas en grasas y con un elevado contenido calórico. De acuerdo con Stefanick, existe un mayor consenso acerca de que la actividad física diaria es el factor preponderante en el mantenimiento del peso corporal, y por consiguiente, importante para la pérdida ponderal.³

1.2 Fisiopatología de la obesidad

De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la obesidad es el resultado del desequilibrio entre el gasto y el aporte de energía. Esta energía procede, en el caso de nuestro organismo, de los principios inmediatos: carbohidratos, proteínas y grasas. Los carbohidratos son el primer escalón en el suministro de energía. Cuando el consumo de carbohidratos excede los requerimientos, estos se convierten en grasas. En ausencia, o con niveles muy bajos de carbohidratos, las grasas son movilizadas siendo utilizadas para la producción de energía. A este proceso se le conoce como lipólisis, y en él, las grasas son convertidas en ácidos grasos y glicerol. Todo exceso de energía introducida cambia la energía interna del organismo y se transforma en energía química, y como principal almacén está el tejido graso. Un ingreso energético (IE) mayor que el gasto o consumo energético total (CET), inevitablemente causará un aumento del tejido adiposo, que siempre se acompaña del incremento de la masa magra, así como también del peso corporal, en cuyo control el CET desempeña una función importante. Según esto, el peso corporal podrá variar en relación con la ingestión y el gasto energético total (GET), que es igual al gasto energético en reposo o basal (GEB) más el gasto energético durante la actividad física (GEA) y el gasto energético derivado del proceso de termogénesis (GET_1), todo esto da como resultado la siguiente fórmula:

$$GET = GEB + GEA + GET_1$$

Ahora bien, en la regulación del gasto energético y de la ingesta participan el sistema nervioso, el sistema digestivo con órganos como el hígado y el páncreas, y el adipocito. El adipocito es una célula altamente diferenciada con 3 funciones: almacén, liberación de energía y endocrino metabólica. Puede cambiar su diámetro 20 veces, y su volumen mil. Cada adipocito es capaz de almacenar en su interior un volumen máximo de 1.2 microgramos de triglicéridos. En este proceso, denominado esterificación, tendrá lugar la participación de 2 enzimas, la lipoproteinlipasa (LPL) y la proteína estimulante de acilación (ASP), ambas activadas a partir de la acción de la insulina y los quilomicrones. Sin embargo, una molécula de vital importancia participa en la regulación del proceso metabólico de los ácidos grasos llamada leptina. A través de esta hormona, el hipotálamo ejerce un efecto controlador de la homeostasis energética del organismo, modulando la ingesta y contrarrestando un potencial balance energético positivo. Para ello, la leptina provoca una activación de los sistemas efectores catabólicos. Estos van a provocar una reducción de la adiposidad por medio de una inhibición del apetito (efecto anorexígeno), estimulando con ello el gasto energético e inhabilitando los sistemas efectores anabólicos cuyo objetivo es aumentar la adiposidad corporal (vía aumento de apetito), favoreciendo así el proceso de lipólisis del tejido adiposo. La leptina, a través del hipotálamo, utiliza el sistema nervioso simpático para estimular la liberación de tirotrópina. Además, por mediación de la leptina, los receptores noradrenérgicos también modulan el peso corporal, mediante la estimulación de los receptores alfa 1 y beta 3 disminuyendo la ingesta y aumentando el gasto energético. La hormona α -melanocito estimulante (α -MSH) es un péptido anorexígeno estrechamente implicado en la regulación de la ingesta. Su administración en el sistema ventricular del cerebro causa disminución del apetito y aumento de la termogénesis.³

Otra biomolécula implicada en la modulación de la ingesta alimentaria es el neuropéptido Y. Este tiene como función principal incrementar la ingesta de alimentos, y constituye el neurotransmisor más potente de acción anabólica.³

Los péptidos intestinales poseen igualmente una acción moduladora respecto de la ingestión de alimentos. Así, péptidos como la colecistocinina, el péptido liberador de gastrina y la bombesina disminuyen la ingesta de alimentos.³

2. Tipos de obesidad

La clasificación internacional de obesidad para un adulto es la propuesta por la OMS según el IMC, tal como se presenta en la tabla 1.⁴

Tabla 1. Clasificación de la obesidad de acuerdo a la OMS

Clasificación	IMC (kg/m²)	Riesgo Asociado a la salud
Normo Peso	18.5-24.9	Promedio
Exceso de Peso	≥ 25	
Sobrepeso o Pre Obeso	25-29.9	Aumentado
Obesidad Grado I o Moderada	30-34.9	Aumentado moderado
Obesidad Grado II o Severa	35-39.9	Aumentado severo
Obesidad Grado III o Mórbida	≥ 40	Aumentado muy severo

Sin embargo, según la definición de obesidad, las personas obesas son aquellas que tienen un exceso de grasa corporal. Se considera que un hombre adulto de peso normal presenta un contenido de grasa en un rango del 15 al 20% del peso corporal

total, y las mujeres entre el 25 y 30% del peso corporal total. Deurenberg y colaboradores establecieron una ecuación para estimar el porcentaje total de grasa en adultos, basado en el IMC, la edad y el sexo.⁴

$$\% \text{ grasa corporal} = 1.2 (\text{IMC}) + 0.23(\text{edad}) - 10.8(\text{sexo}) - 5.4$$

Donde, sexo = 1 para hombres, y sexo = 0 para mujeres

Ecuación de Deurenberg y colaboradores para estimar el porcentaje total de grasa en adultos

Se puede observar que para una determinada talla y peso, el porcentaje de grasa corporal es alrededor de un 10% más alto en mujeres que en hombres. Lo anterior sugiere que las mujeres tienen una mejor adaptación a la grasa corporal que los hombres, debido a que gran parte de la grasa se distribuye en compartimentos subcutáneos y periféricos (mamas, glúteos, muslos), mientras que en los hombres el exceso de grasa tiende a depositarse en el abdomen, tanto grasa subcutánea como grasa intraabdominal.⁴

Sin embargo, para catalogar de obeso en la práctica a un sujeto, utilizamos la medición del peso corporal o el cálculo de índices basados en el peso y la altura (IMC), de acuerdo a como se ha establecido en Consensos Internacionales. Un IMC igual o superior a 30 kg/m^2 es el indicador clínico utilizado universalmente para diagnosticar obesidad en ambos sexos.⁴

Las ventajas de utilizar el IMC se basan en que existe una buena correlación poblacional (0.7-0.8) con el contenido de grasa corporal, y porque se ha demostrado una correlación positiva con el riesgo relativo de mortalidad (general y cardiovascular), independiente del sexo. Esta correlación es la que ha determinado los puntos de corte para el diagnóstico de obesidad. Sin embargo, se han planteado puntos de corte de IMC distintos según el riesgo particular que puedan presentar las distintas poblaciones. De esta manera, en sujetos de origen asiático se ha propuesto un punto de corte de IMC de 25 kg/m^2 para diagnosticar obesidad, ya que un grupo significativo de sujetos de este origen étnico desarrolla diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular, con cifras de IMC por debajo de las observadas en poblaciones occidentales.⁴

3. Tejido adiposo

El tejido adiposo se divide clásicamente en función de su localización anatómica y del tipo celular principal que lo constituye. Histológicamente, existen tres tipos principales de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (WAT), que representa más del 95% de la masa adiposa; el tejido adiposo marrón (BAT), que representa entre el 1% y el 2% de la grasa y, en los seres humanos, se presenta en pequeñas acumulaciones en las regiones cervical, axilar y paraespinal; y el tejido adiposo beige/brillante, que es difícil de cuantificar pero representa células intercaladas dentro del WAT que son capaces de transformarse en adipocitos de tipo marrón tras la exposición al frío o la estimulación adrenérgica. A diferencia de los adipocitos blancos, que tienen una gran gota de lípidos unilocular, los adipocitos marrones y beige tienen gotitas multiloculares y una alta densidad mitocondrial para disipar la energía mediante la respiración mitocondrial desacoplada, una característica que podría utilizarse para combatir la obesidad. Además, es importante tener en cuenta que los adipocitos sólo constituyen una parte del depósito adiposo y que el tejido adiposo contiene otros tipos celulares

que contribuyen a su fisiología y fisiopatología, como los preadipocitos, las células madre mesenquimales, las células vasculares y las células inflamatorias.⁵

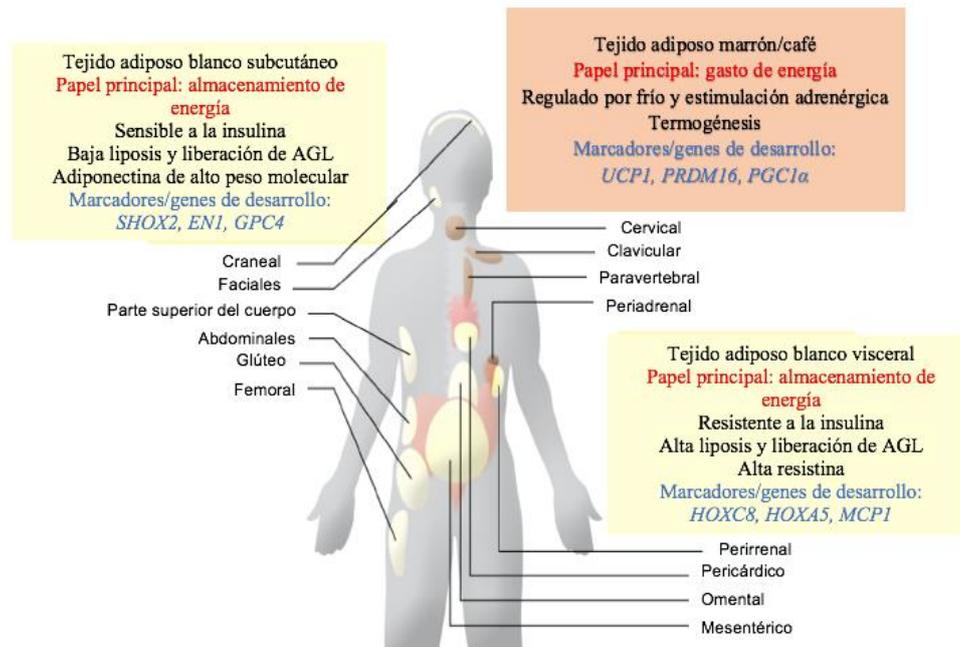


Fig 1. Tejido adiposo humano que ilustra los múltiples depósitos de grasa marrón, blanca subcutánea y visceral. Se indican las diferentes funciones, propiedades y genes marcadores/de desarrollo de estos depósitos.⁵

3.1 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco se caracteriza por ser un tejido blanco o amarillo con menor vascularización e inervación que el tejido marrón. Las células adiposas del tejido adiposo blanco tienen un tamaño que oscila entre 20 y 200 μm y son uniloculares, es decir, contienen una única vacuola lipídica. En dicha vacuola, los lípidos se almacenan para ser utilizados cuando haya demanda energética. De la totalidad de lípidos englobados por la vacuola lipídica del adipocito blanco, entre el 90 y el 99% son triacilglicérols. Los triacilglicérols depositados en la vacuola lipídica contienen energía suficiente para satisfacer las necesidades energéticas de un adulto sano durante al menos dos meses.⁵

El tejido adiposo blanco genera un gran número de adipoquinas y lipocinas. Las adipoquinas son péptidos que actúan como hormonas o mensajeros que regulan el metabolismo. Sabemos que el tejido adiposo secreta proteínas con gran versatilidad de funciones relacionadas con las citocinas proinflamatorias, la inmunidad, el complemento, el sistema fibrinolítico, el sistema renina-angiotensina, el metabolismo y transporte de lípidos y las enzimas del metabolismo de esteroides, entre otras. Las lipocinas, de naturaleza lipídica, ejercen la misma función cuando son secretadas por el adipocito e influyen en el metabolismo. Posteriormente, se descubrió la adiponectina, que es una adipocina de 30 kDa que forma hexámeros y dodecámeros, y que tiene asociaciones de alto peso molecular que promueven la sensibilidad a la insulina, aumentan la oxidación de lípidos en los músculos y el hígado y disminuyen la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias. La proporción de adipoquinas o lipocinas liberadas con acción antiinflamatoria en relación con las

de acción proinflamatoria y proaterogénica influye en el establecimiento de las alteraciones metabólicas que acompañan a la obesidad.⁵

3.1.1 Tejido adiposo subcutáneo y visceral

El tejido adiposo que se encuentra bajo la piel se denomina tejido adiposo subcutáneo (TASub), mientras que el que recubre los órganos internos se denomina tejido adiposo visceral (TAVis). Existen diferencias anatómicas considerables en la distribución de ambos tejidos adiposos en el organismo. El TAVis está presente principalmente en el mesenterio y el epiplón y drena directamente al hígado a través de la circulación portal. Durante el desarrollo, la grasa corporal total (GCT), el TAVis y el TASub suelen aumentar a medida que el niño envejece, aunque se observan tendencias diferentes en hombres y mujeres.⁶

Las cantidades elevadas de GCT, TAVis y TASub conlleva varios riesgos para la salud, como la resistencia a la insulina, la esteatosis hepática, el síndrome metabólico y la hipertensión. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la acumulación de TAVis se asocia a un aumento del riesgo metabólico y de la mortalidad general, mientras que la expansión del TASub mejora la sensibilidad a la insulina y reduce el riesgo de diabetes tipo 2 (DMT2). Estos riesgos se ven afectados por factores genéticos, biológicos y de estilo de vida, como la actividad física, la nutrición y el estrés. La grasa visceral es el principal determinante de la resistencia a la insulina, y muchos investigadores han establecido vínculos entre el exceso de grasa visceral y un estado inflamatorio exagerado.⁶

Existe una estrecha relación entre la alta morbilidad y la grasa intraabdominal (visceral), más que la grasa extraabdominal (subcutánea). La T2D se predice por la obesidad central y las adipocinas circulantes que regulan la inflamación. El TAVis en la T2D expresa niveles más elevados de adipocinas implicadas en la inflamación, que está relacionada con la glucosa en ayunas y la acción de la insulina. El aumento de la producción de estas moléculas proinflamatorias por el TAVis puede explicar los vínculos observados entre obesidad visceral, resistencia a la insulina y riesgo de diabetes. La obesidad mórbida, el envejecimiento, el estado hormonal, la nutrición, la escasa actividad física y otros factores ambientales merman la resistencia relativa del TASub a los cambios disfuncionales y favorecen el desarrollo de trastornos metabólicos. Aunque tanto el TASub como el TAVis expresan un conjunto idéntico de genes, el nivel de expresión es diferente. La expresión de genes proinflamatorios críticos es sustancialmente mayor en el SAT que en el TAVis en individuos con obesidad mórbida. Se cree que existe una contribución del tejido adiposo específica de cada compartimento a la inflamación en la obesidad y que el TASub abdominal contribuye más que el TAVis al entorno proinflamatorio asociado a la obesidad grave. La grasa subcutánea es blanda, y existen muchas opciones para tratar este tipo de grasa. La modificación del estilo de vida funciona para algunas personas. La liposucción también es una opción para eliminar el exceso de TASub. Sin embargo, para la grasa visceral, la única opción para deshacerse de ella es una buena modificación del estilo de vida, buenos hábitos alimenticios y actividad física.⁶

4. Inmunidad innata en la obesidad

En la obesidad existe un estado inflamatorio crónico de bajo grado promovido por el crecimiento descontrolado de los adipocitos y por la desregulación de sus funciones

secretoras, metabólicas y de almacenamiento de lípidos. Estos procesos son mediados a través de la acción de citocinas proinflamatorias producidas por células inmunes infiltradas en el tejido adiposo. La inflamación generalizada en este tipo de individuos promueve la resistencia a la insulina en tejido periféricos y diabetes tipo 2 en consecuencia.⁷

4.1 Infiltración de macrófagos y monocitos en tejido adiposo

El estado inflamatorio que se observa en el tejido adiposo de personas obesas es ocasionado por diversas subpoblaciones de leucocitos residentes en el tejido y en la circulación.⁸ Una de estas poblaciones leucocitarias son los monocitos y los macrófagos; existen monocitos productores de citocinas proinflamatorias, los cuales se diferencian a macrófagos proinflamatorios conocidos como M1 con fenotipo tipo Th1 y existen monocitos que se diferencian a macrófagos M2, los cuales presentan un fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación de tejido.^{9,10} En la obesidad, los monocitos proinflamatorios circulantes aumentan y los macrófagos residentes en tejido adiposo se polarizan a un perfil M1, mientras que el número de macrófagos M2 disminuye.^{11,12}

El tejido adiposo atrofiado por la obesidad secreta las citocinas MCP-1 y TNF- α , las cuales se encargan de promover un estado inflamatorio que impacta sobre el metabolismo de los adipocitos y su capacidad de almacenar triglicéridos. El MCP-1¹³, es la adipocina responsable de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo ya que funciona como un potente quimioatrayente. En los pacientes obesos los macrófagos pueden llegar a alcanzar hasta el 50% del total de células inmunes infiltradas en tejido adiposo, mientras que en personas eutróficas esta proporción no supera el 10%. La inflamación a su vez puede contribuir a la resistencia a la insulina por medio de la acción directa del TNF- α sobre la señalización del receptor de insulina en músculo esquelético. El TNF- α tiene otros efectos sobre el tejido adiposo además de inducir la resistencia a la insulina, también induce la producción de leptina, estimula la lipólisis e inhibe la lipogénesis: junto con estos efectos induce la apoptosis de los adipocitos, por lo cual, también es un regulador del volumen de adipocitos en el organismo.^{14,15}

La inflamación altera el metabolismo de lípidos por medio del receptor de hormona nuclear PPAR γ , el cual es un regulador de la adipogénesis y se requiere para la síntesis de triglicéridos y su almacenamiento en adipocitos.¹⁶ El TNF- α regula negativamente a este receptor ocasionando que disminuya el depósito de lípidos en los adipocitos por medio de un incremento en la lipólisis. En consecuencia, disminuye la síntesis de triglicéridos y aumentan de AGL circulantes. El TNF- α también interfiere con el transportador de glucosa regulado por la insulina GLUT 4, en consecuencia, el estado inflamatorio disminuye el ingreso de glucosa dentro de la célula, favorece hiperglicemia y la resistencia a la insulina.¹⁷

Otras células que han sido descubiertas en el tejido adiposo de los pacientes con obesidad, por ejemplo, las células NKT son una fuente importante de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo visceral, lo cual agrava el estado de obesidad de los individuos. En ratones, la deficiencia de NKT parece proteger al individuo contra la ganancia excesiva de peso y la resistencia a la insulina. Algo similar ocurre con los mastocitos ya que la deficiencia de estas células también parece disminuir la obesidad inducida por la dieta.¹⁸

Los eosinófilos, también células de la respuesta inmune innata, se encuentran en bajas proporciones en el tejido adiposo comparadas con otras células. Su deficiencia

en ratones está relacionada con mayor ganancia de peso y resistencia a la insulina, lo cual sugiere que los eosinófilos ayudan a mantener un metabolismo saludable. Los eosinófilos son atraídos por un ambiente de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13, las cuales favorecen la presencia de macrófagos M2 en el tejido adiposo, los cuales ayudan a resolver el estado inflamatorio. Incluso se ha encontrado que, en infecciones parasitarias provocadas por helmintos al aumentar la cantidad de eosinófilos se controla la inflamación en tejido adiposo, disminuye de la acumulación lípidos y mejora la sensibilidad a la insulina.^{19,20}

C.N. Lumeng/Molecular Aspects of Medicine xxx (2012) xxx-xxx

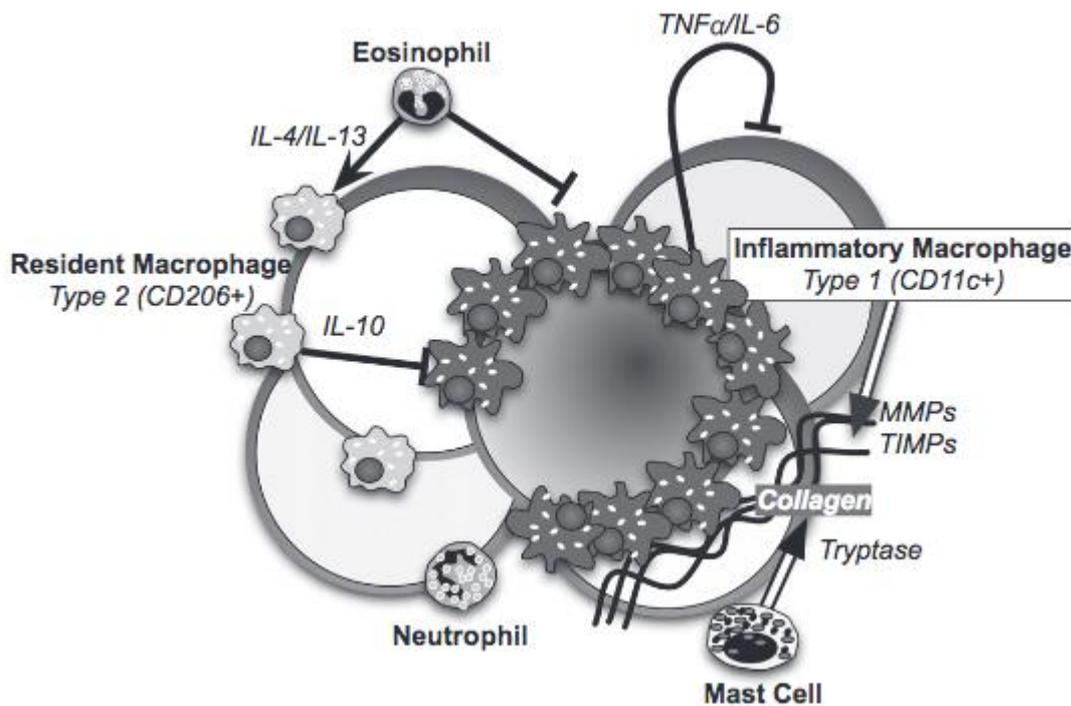


Fig 2. Células de la inmunidad innata en el tejido adiposo²¹

4.2 Inflamación y las células T residentes en el tejido adiposo

La inflamación del tejido adiposo inducida por la obesidad está controlada por una red diversa de leucocitos compuesta por múltiples reguladores celulares de la inmunidad innata y adaptativa. Un componente de la respuesta metainflamatoria a la obesidad es una alteración del estado de las células T del tejido adiposo (ATTs, por sus siglas en inglés *adipose tissue T cells*) que influye en el punto de ajuste inflamatorio del tejido adiposo y en la sensibilidad a la insulina.²²

El tejido adiposo contiene una población única de células T reguladoras residentes (Treg por sus siglas en inglés *regulatory T cells*) que es prominente en estados de delgadez y tiene una influencia protectora sobre la inflamación del tejido adiposo en la obesidad. Mientras que las células Treg disminuyen con la obesidad, las células T Th1 convencionales (Tconv por sus siglas en inglés *conventional T cells*) se acumulan en los depósitos de grasa visceral y contribuyen a las señales proinflamatorias en el tejido adiposo. La capacidad de las TH1 ATTs para promover la inflamación inducida por la obesidad depende de los receptores de células T $\alpha\beta$ (TCR), T-bet, STAT3 e interferón γ (IFN γ). No se conocen bien las señales que controlan la activación y el mantenimiento de las ATTs. La obesidad induce la proliferación de los ATTs, lo que sugiere que éstos son estimulados por señales procedentes del entorno del tejido

adiposo. En comparación con los tejidos linfoides secundarios, el tejido adiposo contiene pocas células T inmaduras (T naive) y un alto porcentaje de células T CD4⁺ de tipo efector/memoria que regulan la inmunidad adaptativa basándose en interacciones con las APC. Las APC integran múltiples vías de señalización en los tejidos, lo que da lugar a la maduración de las células T naive hacia un perfil de activación específico. En el caso de las células T CD4⁺, un componente central del proceso de maduración es la presentación de antígenos a través del MHC de clase II, que se une al TCR. Varias líneas de evidencia sugieren que las APC se asocian con las células T en el tejido adiposo para controlar la metainflamación. Mientras que las APC pueden dar forma a los ATTs, éstos también pueden influir en el reclutamiento y la activación de los macrófagos del tejido adiposo (ATM por su siglas en inglés *adipose tissue macrophages*). La activación de los ATTs precede a la importante acumulación de CD11c⁺ ATM proinflamatorios inducida por la obesidad crónica. Esta observación implica que la maquinaria necesaria para activar los ATTs en respuesta a la obesidad debe ser nativa del tejido adiposo y existir antes del inicio de la obesidad.²²

5. Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II)

Las moléculas MHC clase I y clase II son glucoproteínas unidas a membrana que se relacionan de manera estrecha tanto en estructura como en función. Ambos tipos de glicoproteínas de membrana funcionan como moléculas presentadoras de antígeno muy especializadas que forman complejos excepcionalmente estables con péptidos antigénicos, los cuales se exhiben en la superficie celular para reconocimiento por células T.¹⁰

Específicamente hablando del MHC-II, está conformado por dos cadenas polipeptídicas diferentes, una cadena de 33 kDa y una cadena de 28 kDa, que se vinculan mediante interacciones no covalentes. Como las cadenas clase I, las moléculas MHC clase II son glucoproteínas unidas a membrana que contienen dominios externos, un segmento transmembranal y un segmento ancla citoplásmico. Cada cadena en una molécula clase II contiene dos dominios externos: dominios α -1 y α -2 en una cadena, y dominios β -1 y β -2 en la otra. Los dominios α -2 y β -2 proximales a la membrana, como los dominios α -3/microglobulina β_2 proximales a la membrana de las moléculas MHC clase II, muestran similitud de secuencia con la estructura del pliegue de inmunoglobulina; por esta razón las moléculas MHC clase II se clasifican también en la superfamilia de las inmunoglobulinas. La porción distal a la membrana de una molécula clase II está compuesta por los dominios α -1 y β -1 y forma la hendidura de unión a antígeno para el antígeno procesado.¹⁰

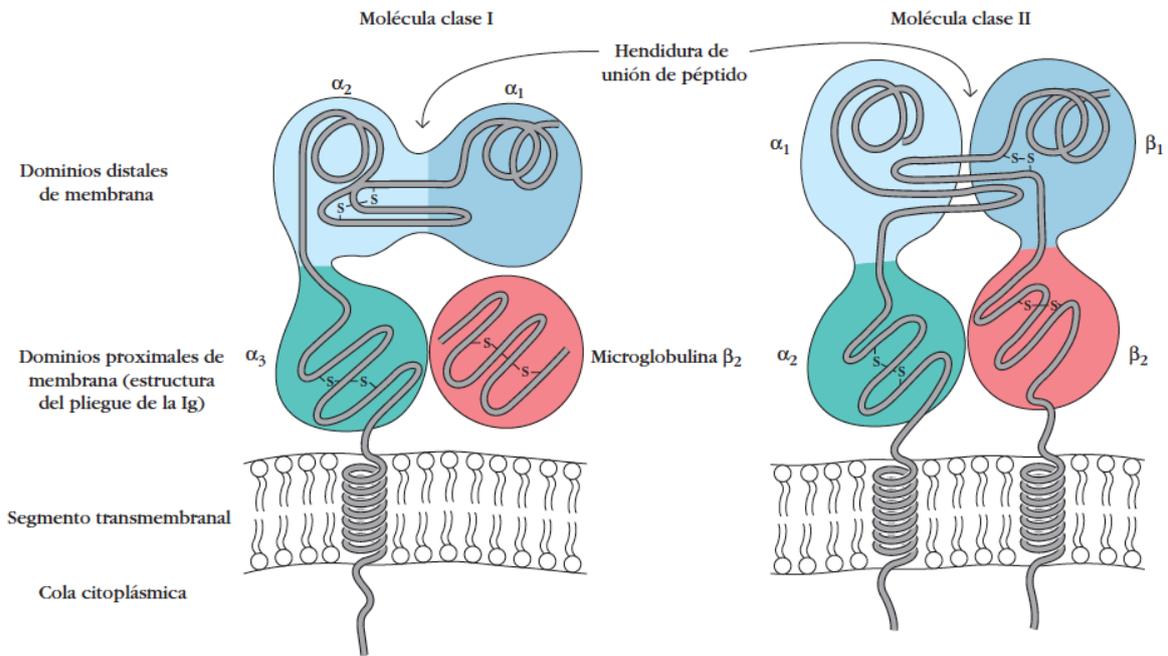


Fig 3. Esquemas de la molécula MHC clase I y clase II que muestran los dominios externos, el segmento transmembranal y la cola citoplásmica ¹⁰

5.1 Interacción MHC clase II-péptido

Las moléculas MHC clase II unen péptidos y los presentan a células T CD4⁺. Como las moléculas clase I, las de clase II pueden unir una diversidad de péptidos. En general estos péptidos se derivan de proteínas exógenas (ya sea propias o extrañas), que se degradan dentro de la vía endocítica de procesamiento. La mayoría de los péptidos que se unen a moléculas MHC clase II se deriva de proteínas propias unidas a la membrana o proteínas ajenas internalizadas por fagocitosis o por endocitosis mediada por receptor y luego procesadas en la vía endocítica. Por ejemplo, los péptidos derivados de la digestión de moléculas MHC clase I unidos a membrana con frecuencia se unen a moléculas MHC clase II. Los péptidos recuperados de complejos MHC clase II-péptido suelen contener 13 a 18 residuos, de modo que son un poco más largos que los péptidos noaméricos que más a menudo se unen a moléculas clase I. La hendidura que une péptido en las moléculas clase II está abierta en ambos extremos y ello permite que los péptidos más largos se extiendan más allá de los extremos. Los péptidos que se unen a moléculas MHC clase II contienen una secuencia interna que comprende siete a 10 aminoácidos que proporcionan los principales puntos de contacto. Por lo general esta secuencia tiene un residuo aromático o hidrófobo en el extremo amino y tres residuos hidrófobos adicionales en la porción media y el extremo carboxilo terminal del péptido. Además, más de 30% de los péptidos eluidos de moléculas clase II contiene un residuo prolina en la posición 2 y otro grupo prolina en el extremo carboxilo terminal.¹⁰

5.2 El MHC de clase II y su genética

Las moléculas del MHC de clase I y clase II son moléculas presentadoras de antígenos para los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente, por lo que son de crucial importancia para la respuesta inmunitaria celular. Su expresión se controla principalmente a nivel de la transcripción génica. Los genes del MHC de clase II

muestran una expresión altamente controlada en función del desarrollo, el tipo de célula y el estímulo, con una expresión constitutiva limitada a las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés *Antigen-Presenting Cell*) profesionales, como las células dendríticas (DC), las células B, los macrófagos y las células epiteliales tímicas.¹⁰

Entre los principales genes reguladores se tiene al *CIITA*, que ha sido reconocido como el "regulador maestro" de la expresión del MHC de clase II, ya que la expresión diferencial de este se debe en gran medida a la expresión diferencial de *CIITA*. El gen *CIITA* es miembro fundador de la familia de proteínas NLR (de unión de nucleótidos con repeticiones ricas en leucina, por sus siglas en inglés *nucleotide-binding and leucine-rich-repeat-containing*) pero durante mucho tiempo se mantuvo al margen de esta familia de proteínas como único regulador transcripcional.²³

La estructura de la proteína *CIITA* se caracteriza por un dominio ácido N-terminal, una región rica en prolinas, serinas y treoninas (dominio P/S/T), un dominio central de unión a nucleótidos (dominio GTP) y al menos cuatro repeticiones C-terminales ricas en leucina.²³

Como se ha descrito anteriormente, la regulación de la expresión génica del MHC de clase II se regula en gran medida a través de *CIITA* y los niveles de MHC de clase II, y la expresión del RNAm de *CIITA* se correlacionan estrechamente en varios tejidos murinos y líneas celulares. Así pues, la expresión diferencial de MHC de clase II se debe en gran medida a la expresión diferencial de *CIITA*. La expresión de *CIITA* parece estar regulada principalmente a nivel de transcripción, aunque también se han descrito diversas modificaciones postranscripcionales de *CIITA*. La eliminación del promotor IV (pIV) de *CIITA* demostró que este promotor era esencial para la expresión de *CIITA* inducida por Interferón gamma (IFN- γ) en células no hematopoyéticas. Por otra parte, los macrófagos mostraron una expresión normal de *CIITA* y MHC-II inducida por IFN γ en ratones de la cepa pIV KO. Por lo tanto, *CIITA* pIV es esencial para la expresión de *CIITA* y el consiguiente MHC de clase II en células de origen no hematopoyético.²³

Otro gen que se relaciona con la expresión del MHC de clase II es el *CD74*, esta pertenece a la familia de las proteínas de membrana de tipo II de paso único, sirve de chaperona para las moléculas de MHC de clase II en las ACP y ocupa el surco de unión MHC de clase II para evitar la unión inapropiada de péptidos. Para permitir la presentación del antígeno, *CD74* se degrada y su fragmento, el péptido de cadena invariante asociado a la clase II (CLIP, por sus siglas en inglés *class-II-associated invariant chain peptide*), permanece unido al surco de unión del MHC de clase II, que finalmente se elimina para permitir la unión del péptido y la posterior presentación del antígeno. Inicialmente se pensó que mostraba un patrón de expresión restringido en gran medida a las células B y que se localizaba intracelularmente, pero se ha demostrado que la expresión de *CD74* aparece en la superficie celular y está presente en las ACP, como los macrófagos o las células dendríticas, así como en ciertos tumores malignos sólidos, incluidos los cánceres de mama y gastrointestinales.²⁴

Tras la activación de *CD74* por la unión de su ligando, el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés *macrophage migration-inhibitory factor*), o por la estimulación de anticuerpos, se activa la señalización, lo que resulta en una mayor supervivencia y proliferación o en la inducción de la detención del crecimiento y la muerte celular, dependiendo del contexto celular.²⁴

Y finalmente, el gen *CD86* o también conocido como B7-2 es una glicoproteína transmembrana de tipo 1 que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF por sus siglas en inglés *immunoglobulin superfamily*) y se expresa de forma

constitutiva en las APC. B7-2 y su homólogo cercano B7-1 actúan como ligandos de los receptores coestimuladores/inhibidores CD28/CTLA-4 presentes en las células T. Según el modelo de dos señales de la activación de las células T, éstas reciben la primera señal, que es específica del antígeno, cuando el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés *T-cell receptor*) interactúa con el MHC cargado de péptidos antigénicos (pMHC) presente en la APC. La segunda co-señal, que es inespecífica, la proporcionan moléculas co-estimuladoras o co-inhibidoras que promueven la activación o la supresión de la célula T, respectivamente. La co-señal procede de la interacción de receptores co-estimuladores/inhibidores de la familia CD28 en la célula T (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, etc.) con sus ligandos afines pertenecientes a la familia B7 presentes en APC. Se ha demostrado que estas moléculas de señalización conjunta y los grupos de moléculas de adhesión rodean el complejo TCR-pMHC y forman una sinapsis inmunológica (IS, por sus siglas en inglés *immunological synapse*) entre la célula T y la APC que conduce a un acontecimiento importante en la activación de la célula T.²⁵

Planteamiento del problema

Hoy en día la obesidad se ha convertido en una importante epidemia de salud pública que ha empeorado progresivamente en los últimos 50 años. Se ha descrito como una enfermedad compleja y de etiología multifactorial.⁹ Entre sus principales consecuencias se encuentra la alteración del sistema inmunológico, ya que se ha observado un aumento de biomarcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR) y la neutrofilia en niños obesos de tan sólo 3 años. Esto indica que muchos de los orígenes de la inflamación inducida por la obesidad pueden iniciarse realmente durante la infancia. Los efectos inflamatorios se observan en muchos tejidos y se generan por una combinación de señales inflamatorias sistémicas, eventos celulares dinámicos y respuestas específicas de los tejidos con exceso de nutrientes.²¹ Entre los principales mecanismos inmunológicos alterados durante la obesidad se encuentra la presentación CPA-LcT CD4⁺, en la cual participa el MHC de clase II, este se ve sobreexpresado en las células que se encargan de presentar el antígeno a los linfocitos T CD4⁺, la forma de corroborar esto es mediante la cuantificación de los genes responsables de la expresión del MHC de clase II, como lo es el gen *CIITA* (el regulador maestro), *CD74* (chaperona que regula la presentación de antígenos) y *CD86* (factor de coestimulación).

A pesar de contar con una gran variedad de información acerca de los estados inflamatorios y la inmunidad innata alterada durante el estado de obesidad, aún no se tiene establecido como algunas variables del tipo antropométricas (peso, longitud de cintura, cadera, etc), bioquímicas (niveles de colesterol, HDL, triglicéridos, etc), así como el diagnóstico de diabetes tipo II se correlacionan con los niveles de expresión de los genes encargados de la expresión de MHC de clase II, dando paso a la investigación y resolución de dicha problemática.

Pregunta de investigación

Todo el panorama abarcado anteriormente da paso a la realización de la pregunta ¿Que tipo de relación existe entre los niveles de expresión de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86* con las variables antropométricas (Peso, talla, IMC, cintura, cadera, ICC), bioquímicas (Glucosa, HbA1c, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos e insulina) y clínica (diagnóstico de diabetes tipo 2)?

Objetivos

General

Determinar las relaciones que existen entre los niveles de expresión de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86* en muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral y las variables antropométricas, bioquímicas y clínica de los pacientes con obesidad mórbida.

Específicos

- Sintetizar cDNA a partir de RNA total de tejido adiposo subcutáneo y visceral
- Estandarizar las condiciones de temperatura, tiempos y ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión mediante la técnica de PCR a punto final de los genes *ACTB*, *PGK1*, *CIITA*, *CD74* y *CD86*
- Cuantificar los niveles de expresión génica de *CIITA*, *CD74* y *CD86* en las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral de pacientes con obesidad mórbida
- Determinar si la presencia de la enfermedad diabetes tipo 2 influye en la expresión de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*

Material y métodos

1. Universo

Los pacientes involucrados en el estudio tenían una edad entre 22 y 58 años de distinto sexo. Fueron reclutados en la Clínica de diabetes y obesidad, Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS. Dichos pacientes presentaban obesidad mórbida y antes de ser sometidos a una cirugía bariátrica se les explicaron los objetivos del estudio y aquellos que aceptaron continuar en él se les pidió que firmaran un consentimiento informado.

2. Técnicas, materiales o instrumentos

2.1 Obtención y almacenamiento de muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral*

Las muestras fueron obtenidas por un cirujano bariatra al momento de la cirugía bariátrica. Dichas muestras se almacenaron durante 24h a 4 °C en RNALater (Thermo Fisher Scientific), el cual sirve como un reactivo de estabilización y almacenamiento de RNA tisular que penetra rápidamente en los tejidos para estabilizar y proteger el RNA celular, para después congelarse a -70 °C.

**Este paso fue realizado anteriormente por personal tanto de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica como por personal colaborador*

2.2 Extracción de RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral*

Tras la descongelación el exceso de RNALater fue retirado de las muestras y fueron pesadas para obtener una masa aproximada de 100 mg, seguido de esto se sumergieron en 1 mL de reactivo TriPure Isolation Reagent (Sigma-Aldrich) el cual permite preservar la integridad del RNA total durante el procedimiento de lisis celular. Luego fueron homogeneizadas con el equipo Polytron PT 1200 CL (Kinematica). La mezcla se transfirió a un nuevo tubo donde se le adiciono 0.2 mL de cloroformo, para después ser homogeneizada e incubada por 15 minutos a 25°C. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4°C en la centrífuga Sorvall Legend Micro R21 (Thermo Scientific) para la precipitación de restos celulares. Una vez terminada la centrifugación se observaron 2 fases, una fase acuosa o hidrofílica transparente en donde está contenido el RNA total, y una fase orgánica o hidrofóbica donde están contenidos otros residuos celulares. La fase acuosa incolora fue transferida a un nuevo tubo donde se adicionó 0.5 mL de isopropanol, seguido de una homogeneización e incubación a -20 °C por 1 hora, después se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4°C para precipitar el RNA total. Se descartó el sobrenadante para realizar el lavado del RNA total, empleando 1 mL etanol al 75% frío, se homogeneizó y centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante al finalizar la centrifugación, este paso fue realizado por duplicado. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C.

**Este paso fue realizado anteriormente por personal tanto de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica como por personal colaborador*

2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del RNA total extraído de muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral

El RNA total obtenido fue cuantificado mediante el equipo Epoch N/S 1505119D (Biotek). La integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% el cual se visualizó con el equipo fusión FX (Vilber).

2.4 Síntesis de cDNA a partir de RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral

Se empleó el kit RT-PCR System (ThermoScript) para la síntesis de cDNA. Se agregaron 9 μ L de RNA total obtenido (~5 μ g), junto con 1 μ L de primers (hexámeros al azar 50 ng/ μ L) que funcionan como cebadores que se unen a sitios

complementarios aleatorios del RNA total, y 2 μL de mezcla de dNTP's (10 mM) cuya función es la de brindar los oligonucleótidos o bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) necesarias para la síntesis del cDNA. Dicha mezcla fue incubada a 65 °C por 5 minutos y luego puesta en hielo, a esta mezcla se le denominó como "Mezcla de reacción inicial". Seguido de esto se preparó una mezcla de síntesis de cDNA la cual contenía 4 μL de 5X cDNA Synthesis Buffer el cual funciona como una solución que brinda las condiciones de pH necesarias para llevar a cabo la reacción, 1 μL DTT (0.1 M) el cual estabiliza enzimas y otras proteínas que poseen grupos sulfhidrilos libres, 1 μL de agua libre de nucleasas, 1 μL de RNaseOUT™ (40 U/ μL) un potente inhibidor no competitivo de ribonucleasas de tipo pancreático como RNAasa A que evita la degradación del RNA, y 1 μL de ThermoScript™ RT (15 U/ μL) una transcriptasa inversa aviar con actividad reducida de RNasa H la cual permite sintetizar cDNA a partir de RNA. La mezcla fue puesta en hielo para su posterior uso, a la cual se le denominó como "Mezcla de reacción". Se adiciono 8 μL de la "Mezcla de reacción" a los tubos que contenían la "Mezcla de reacción inicial" y se mezcló con ayuda de pipeteo. Terminado esto se incubaron los tubos en dos tiempos, el primero fue de 10 minutos a 25 °C, seguido de 50 minutos a 50 °C, para después detener la reacción de la transcriptasa inversa incubando los tubos a 85 °C por 5 minutos. Después de esto se adiciono 1 μL de *E.coli* RNase H (2 U/ μL) la cual degrada específicamente la cadena de RNA de un híbrido de RNA-ADN para producir oligorribonucleótidos terminados en fosfato 5' y ADN monocatenario, seguido de una última incubación a 37 °C por 20 minutos. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C.

2.5 Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *CIITA*, *CD74*, *CD86*, *ACTB* y *PGK1*

La estandarización se llevó a cabo mediante la técnica de PCR a punto final empleando el cDNA sintetizado previamente. El volumen final de reacción fue de 15 μL . En un microtubo se adiciono un volumen de 1.5 μL de 10X PCR buffer Minus Mg, el cual sirve para mantener el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa, seguido de 0.45 μL de MgCl_2 (50 mM) un cofactor necesario para la actividad enzimática de la DNA polimerasa, 0.3 μL mezcla de dNTP's (10 mM) nucleótidos que sirven para generar las nuevas cadenas de ADN, oligonucleótidos sentido y antisentido a diferentes concentraciones de cada uno de los genes de interés (*CIITA*, *CD74* y *CD86*), como también de genes HouseKeeping (*ACTB* y *PGK1*) que tienen la función de determinar el fragmento que se vaya a amplificar, 0.06 μL de *Platinum® Taq* DNA polimerasa, enzima que se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de DNA que llevan la secuencia blanco, y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 15 μL . Dicha mezcla fue sometida a temperaturas y tiempos diferentes de desnaturalización, alineación y extensión de PCR (*consultar tablas 2 y 3*) en el termociclador digital 10006004 Maxygen (Axygen). Finalmente, los productos de reacción se revelaron en gel de agarosa mediante electroforesis, demostrando la expresión de los genes de interés como de los housekeeping.

Tabla 2. Combinaciones de oligonucleótidos sentido y antisentido para la estandarización de las condiciones de amplificación de los genes de interés como housekeeping

Concentración oligonucleótido antisentido (μM)			
Concentración oligonucleótido sentido (μM)	0.05	0.3	0.9
0.05	<i>0.05 μM/0.05 μM</i>	<i>0.05 μM/0.3 μM</i>	<i>0.05 μM/0.9 μM</i>
0.3	<i>0.3 μM/0.05 μM</i>	<i>0.3 μM/0.3 μM</i>	<i>0.3 μM/0.9 μM</i>
0.9	<i>0.9 μM/0.05 μM</i>	<i>0.9 μM/0.3 μM</i>	<i>0.9 μM/0.9 μM</i>

Tabla 3. Temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión para la estandarización de las condiciones de amplificación de los genes de interés como housekeeping

Temperaturas ($^{\circ}C$)			Tiempo (seg)		
Desnaturalización	Alineamiento (gradiente)	Extensión	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
	50				
	53				
94	56	72	15	30	30
	59				
	62				

3. Variables

3.1 Variables antropométricas

Peso (kg)
 Talla (m)
 Índice de masa corporal (IMC kg/m^2)
 Cintura (cm)
 Cadera (cm)
 Índice Cintura/Cadera (ICC)

3.3 Variables bioquímicas

Glucosa (mg/dL)
 Hemoglobina glicosilada (HbA1c) (%)
 Triglicéridos (mg/dL)
 Colesterol total (mg/dL)
 HDL (mg/dL)
 LDL (mg/dL)
 Insulina (mU/L)

3.2 Variable clínica

Diagnóstico de diabetes tipo 2

4. Diseño de estudio

Tipo de estudio: Retrospectivo transversal descriptivo observacional
 Variable independiente: niveles de expresión de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*
 Variables dependientes: variables bioquímicas, antropométricas y clínica

5. PCR a tiempo real (qPCR cuantitativa)

Tras la estandarización mediante PCR a punto final aplicada a los genes HouseKeeping *ACTB* y *PGK1*, como los de interés *CIITA*, *CD74* y *CD86*, se realizó la técnica de PCR a tiempo real, esto empleando las concentraciones de oligonucleótido sentido y antisentido, ciclos, temperaturas y tiempos requeridos para la expresión de los genes en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, tal como se muestra a continuación:

Tabla 4. Concentraciones de oligonucleótidos sentido y antisentido de los genes ACTB, PGK1, CIITA, CD74 y CD86 para la técnica de PCR a tiempo real

Gen	Concentraciones	
	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
<i>ACTB</i>	0.3 μ M	0.9 μ M
<i>PGK1</i>	0.9 μ M	0.3 μ M
<i>CIITA</i>	0.3 μ M	0.3 μ M
<i>CD74</i>	0.3 μ M	0.3 μ M
<i>CD86</i>	0.3 μ M	0.3 μ M

Las condiciones de temperaturas, tiempos y ciclos de PCR a tiempo real obtenidos a partir de la estandarización para cada gen abarca una desnaturalización inicial de 1 ciclo, mientras que la desnaturalización, alineamiento y extensión constan de 40 ciclos en total. Los tiempos y temperaturas para cada paso de la PCR son descritas en la siguiente tabla:

Tabla 5. Condiciones de temperatura y tiempos de PCR para los genes ACTB, PGK1, CIITA, CD74 y CD86

Gen	Temperaturas ($^{\circ}$ C)			Tiempo (seg)		
	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
<i>ACTB</i>		60				
<i>PGK1</i>		60				
<i>CIITA</i>	94	62	72	15	30	30
<i>CD74</i>		60				
<i>CD86</i>		62				

Establecidas ya las condiciones de reacción lo siguiente que se realizó fue preparar la mezcla maestra (MM) en microtubos para cada gen, considerando el número de muestras de cDNA que se tengan de los tejidos adiposos subcutáneos y viscerales. El contenido de dicha mezcla es el que se muestra de la siguiente manera:

Tabla 6. Volúmenes de reactivos para preparar la MM

Reactivo	Volumen por reacción (μL)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	7.5
Oligonucleótido sentido	(Consultar la tabla 4)
Oligonucleótido antisentido	(Consultar la tabla 4)
cDNA Tejido adiposo subcutáneo o visceral	$\leq 500 \text{ ng}/\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	Hasta completar el volumen final
Volumen final	15

Se adicionó un volumen determinado de MM a cada uno de los pozos de la placa, y después se agregó el cDNA de los tejidos adiposos subcutáneos y viscerales en su respectivo lugar, se colocó un film para sellar la placa. Seguido de esto se centrifugó la placa en el equipo Rotina 46R (Hettich) a 500 rpm por 30 segundos. Y finalmente se colocó la placa en el compartimento del equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) y se configuró de acuerdo con el análisis que se realizó.

6. Análisis estadísticos

Análisis de correlación de Spearman entre los resultados obtenidos de la cuantificación de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86* con las variables antropométricas, bioquímicas, como una comparación entre los niveles de expresión de los genes en los tejidos adiposos subcutáneo y visceral en los diferentes grupos estructurados a partir de un punto de corte establecido para las variables antropométricas y bioquímicas mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Resultados

1. Tejido adiposo subcutáneo

1.1 Correlación (rho) entre datos antropométricos y bioquímicos con el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*

Tabla 7. Valores de correlación (rho) entre las variables antropométricos y bioquímicos y el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*

Variable	rho (p)		
	ΔCt <i>CIITA</i>	ΔCt <i>CD74</i>	ΔCt <i>CD86</i>
Peso (kg)	-0.0312 (0.875)	0.168 (0.392)	0.265 (0.173)
Talla (m)	-0.374 (0.0501)	-0.206 (0.293)	0.187 (0.342)
IMC (kg/m ²)	0.176 (0.370)	-0.406 (0.0322)	0.117 (0.555)
Cintura (cm)	-0.0628 (0.751)	0.0815 (0.680)	0.0733 (0.711)
Cadera (cm)	0.0950 (0.631)	0.157 (0.425)	0.162 (0.409)
Índice cintura/cadera	-0.180 (0.358)	-0.153 (0.435)	0.0159 (0.936)
Glucosa sanguínea (mg/dL)	0.154 (0.433)	0.211 (0.282)	-0.281 (0.148)
HbA1c (%)	0.249 (0.201)	0.0439 (0.824)	-0.0519 (0.793)
Colesterol total (mg/dL)	0.146 (0.457)	0.205 (0.298)	-0.145 (0.461)
HDL (mg/dL)	-0.348 (0.0697)	-0.150 (0.445)	0.0916 (0.643)
LDL (mg/dL)	0.121 (0.538)	0.162 (0.410)	-0.206 (0.294)
Triglicéridos (mg/dL)	0.0520 (0.793)	-0.234 (0.231)	-0.0205 (0.917)
Insulina (mU/L)	-0.122 (0.535)	-0.0224 (0.910)	-0.0772 (0.696)
HOMA-IR	-0.054 (0.784)	0.003 (0.989)	-0.117 (0.555)

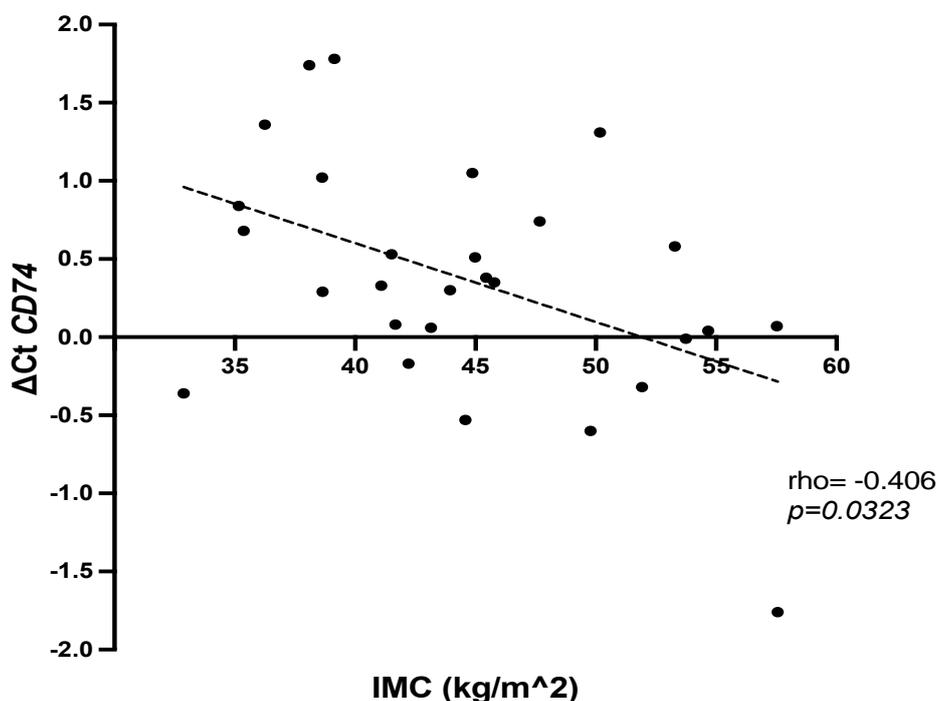
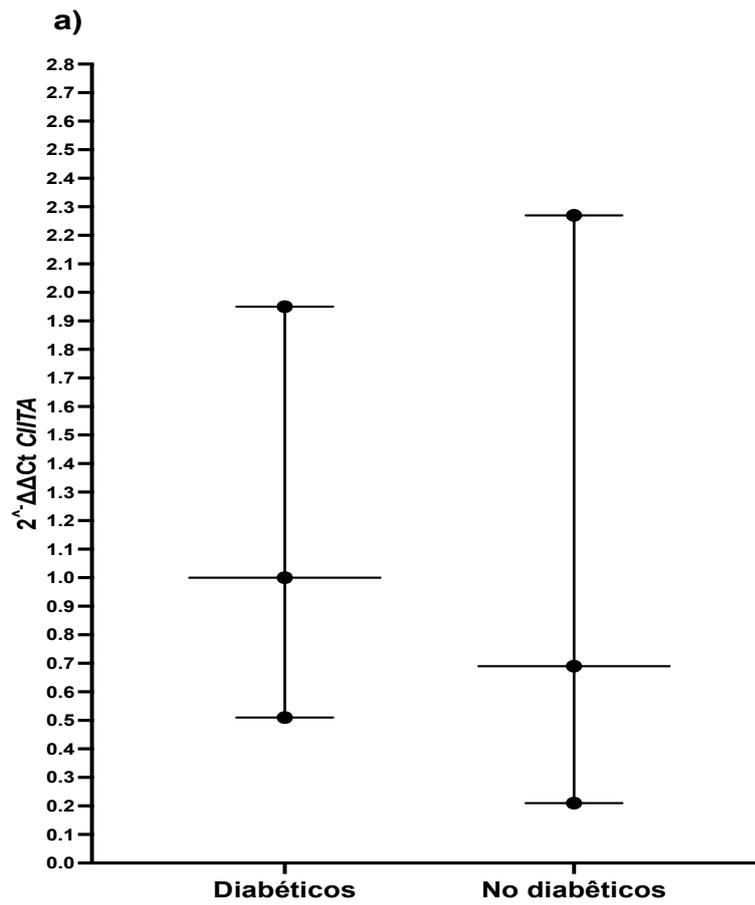
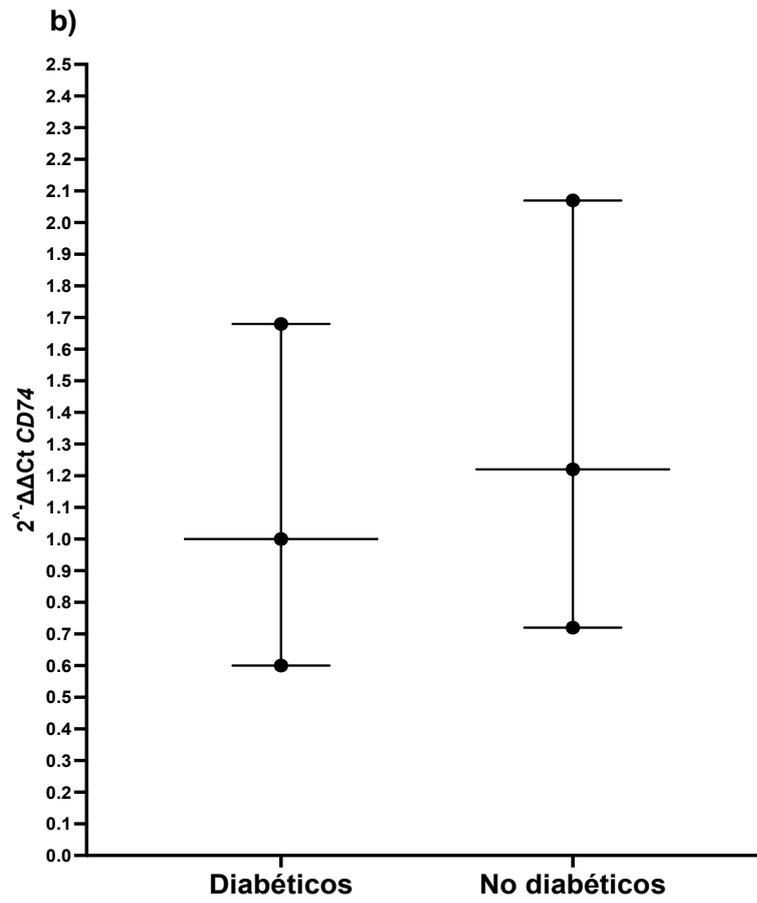
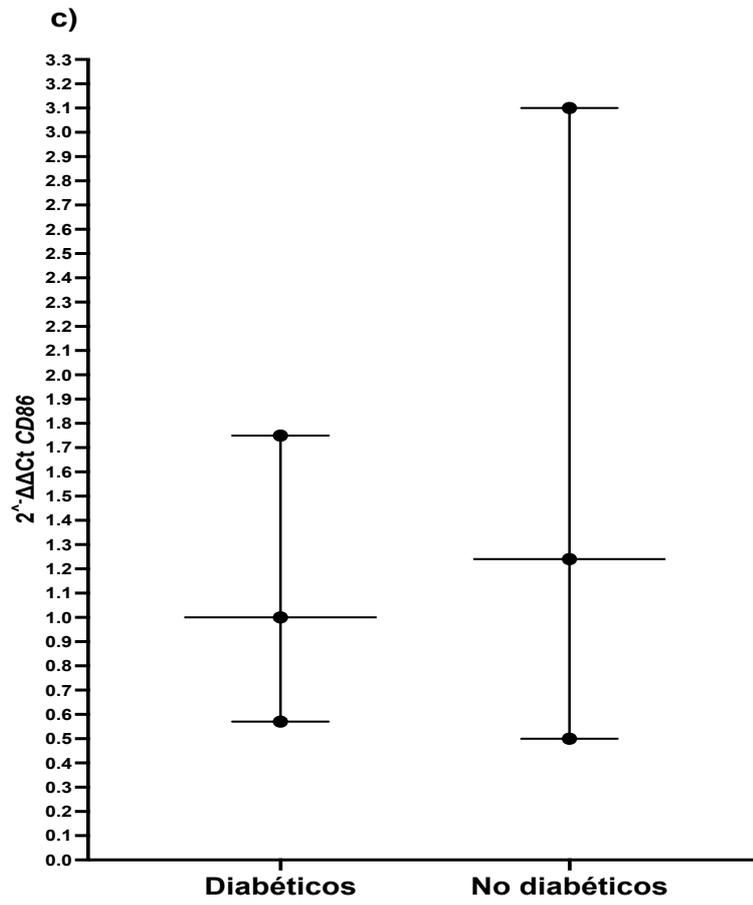


Gráfico 1. Correlación entre la variable IMC (kg/m²) y el ΔCt *CD74*
n = 28

1.2 Comparación de medidas entre el diagnóstico de DT2 y el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*







1.3 Diferencias de grupos entre la variable glucosa y el gen *CD86* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

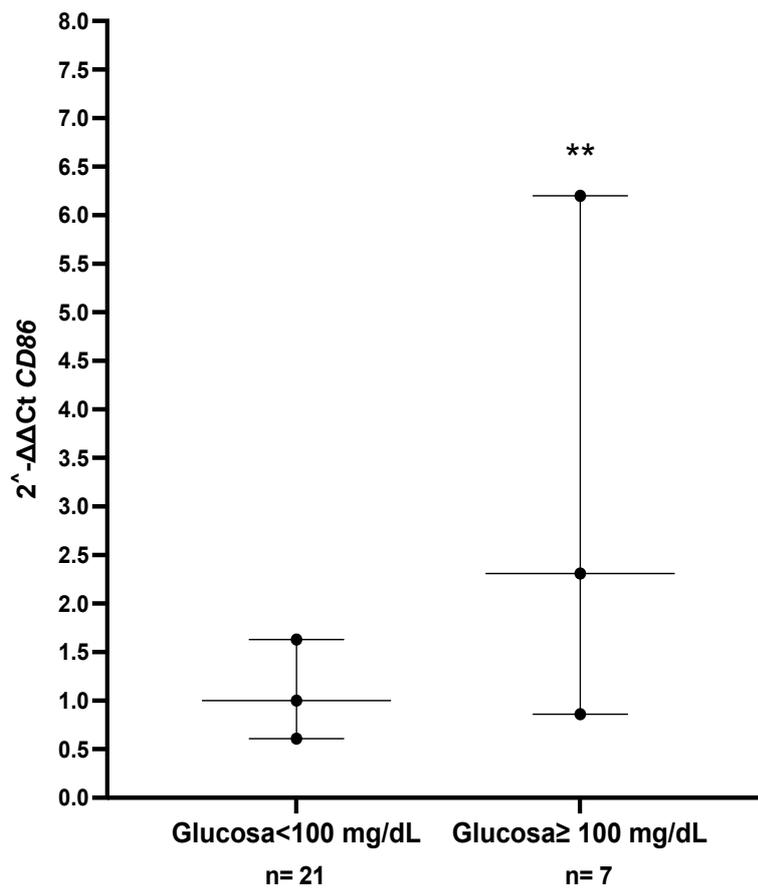


Gráfico 2. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *CD86* en los grupos formados a partir del punto de corte de glucosa (100 mg/dL) ** $p < 0.005$

1.4 Diferencias de grupos entre la variable triglicéridos y el gen *CD74* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

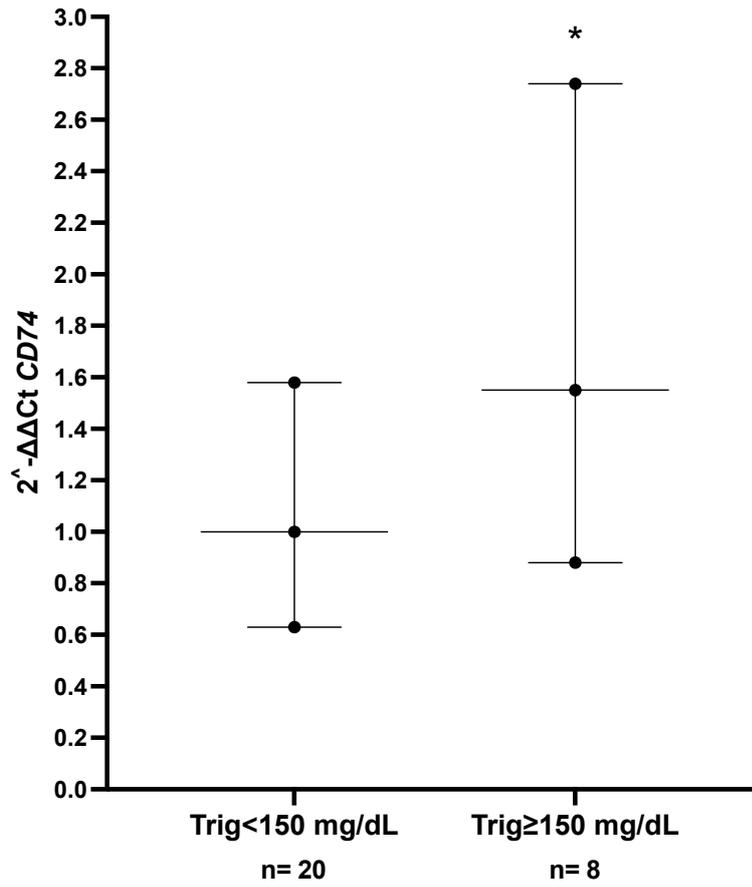


Gráfico 3. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ del gen CD74 en los grupos formados a partir del punto de corte de triglicéridos (150 mg/dL) * $p < 0.05$

2. Tejido adiposo visceral

2.1 Correlación (rho) entre datos antropométricos y bioquímicos con el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*

Tabla 8. Valores de correlación (rho) entre las variables antropométricas y bioquímicas y el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*

Variable	rho (p)		
	ΔCt <i>CIITA</i>	ΔCt <i>CD74</i>	ΔCt <i>CD86</i>
Peso (kg)	-0.0668 (0.703)	-0.0918 (0.600)	-0.0736 (0.674)
Talla (m)	-0.160 (0.357)	-0.175 (0.315)	-0.106 (0.545)
IMC (kg/m ²)	0.0171 (0.922)	-0.0326 (0.852)	-0.0261 (0.882)
Cintura (cm)	0.0921 (0.599)	-0.0382 (0.827)	-0.0177 (0.920)
Cadera (cm)	-0.137 (0.434)	-0.172 (0.322)	-0.114 (0.513)
Índice cintura/cadera	0.285 (0.0965)	0.122 (0.486)	0.0434 (0.804)
Glucosa sanguínea (mg/dL)	0.178 (0.306)	0.0952 (0.586)	-0.0859 (0.623)
HbA1c (%)	0.101 (0.564)	0.0361 (0.837)	0.131 (0.454)
Colesterol total (mg/dL)	-0.0727 (0.678)	-0.0151 (0.931)	-0.2446 (0.157)
HDL (mg/dL)	-0.229 (0.185)	-0.0252 (0.885)	0.173 (0.320)
LDL (mg/dL)	-0.0961 (0.583)	-0.0703 (0.688)	-0.189 (0.277)
Triglicéridos (mg/dL)	-0.158 (0.365)	-0.255 (0.139)	-0.377 (0.0257)
Insulina (mU/L)	-0.287 (0.0941)	-0.396 (0.0184)	-0.1406 (0.420)
HOMA-IR	-0.173 (0.320)	-0.337 (0.048)	-0.163 (0.349)

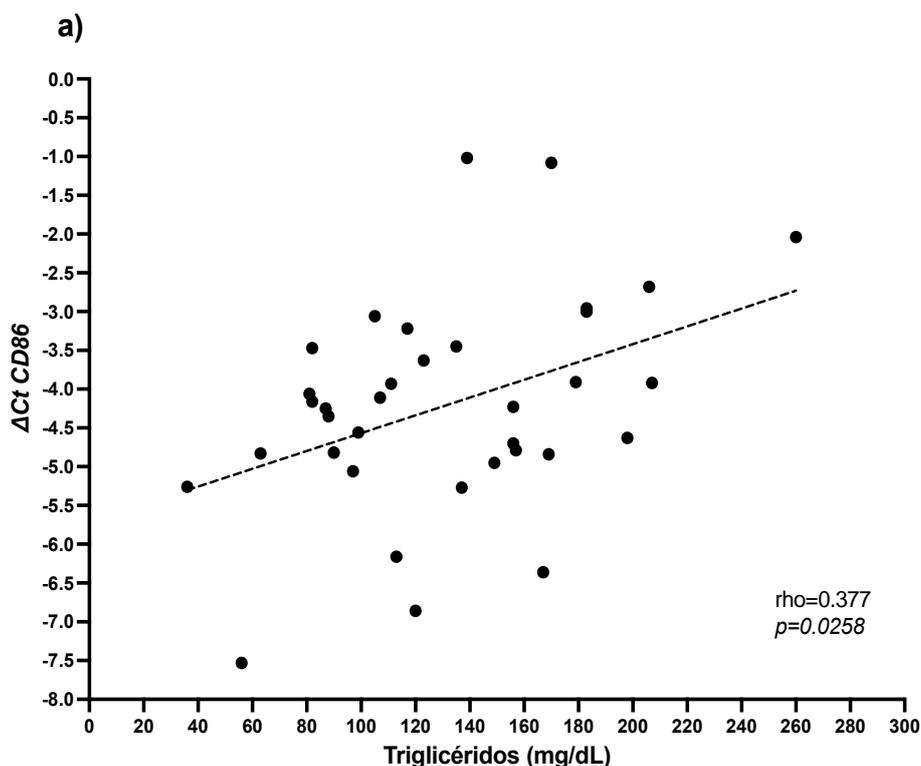


Gráfico 4. Correlación entre la variable triglicéridos (mg/dL) y el ΔCt *CD86*
n= 35

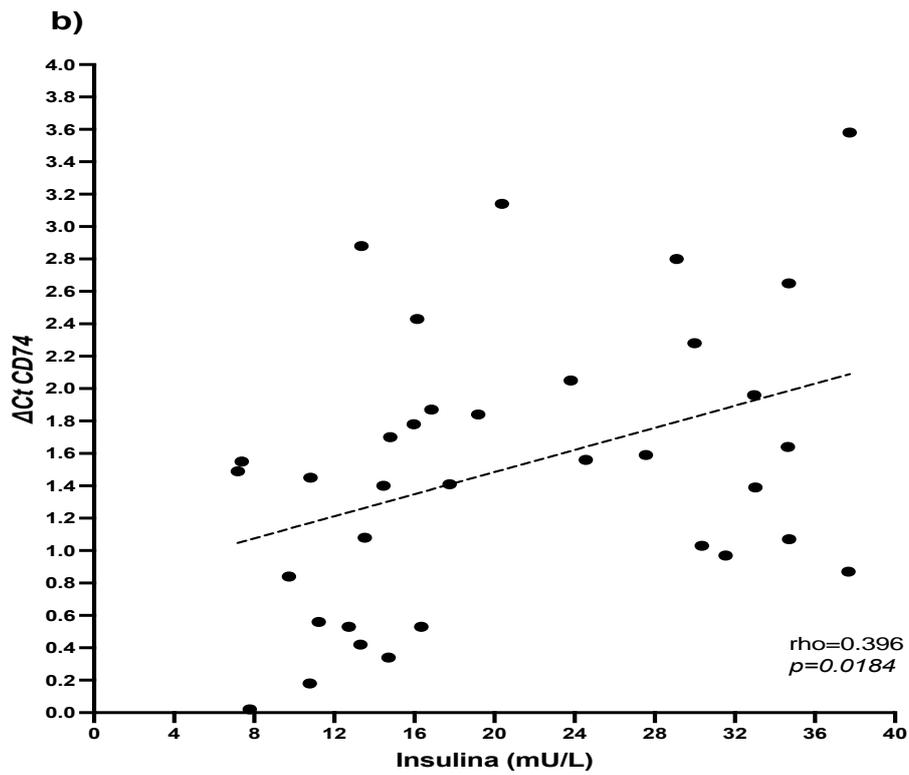


Gráfico 5. Correlación entre la insulina (mU/L) y el $\Delta Ct CD74$
 $n=35$

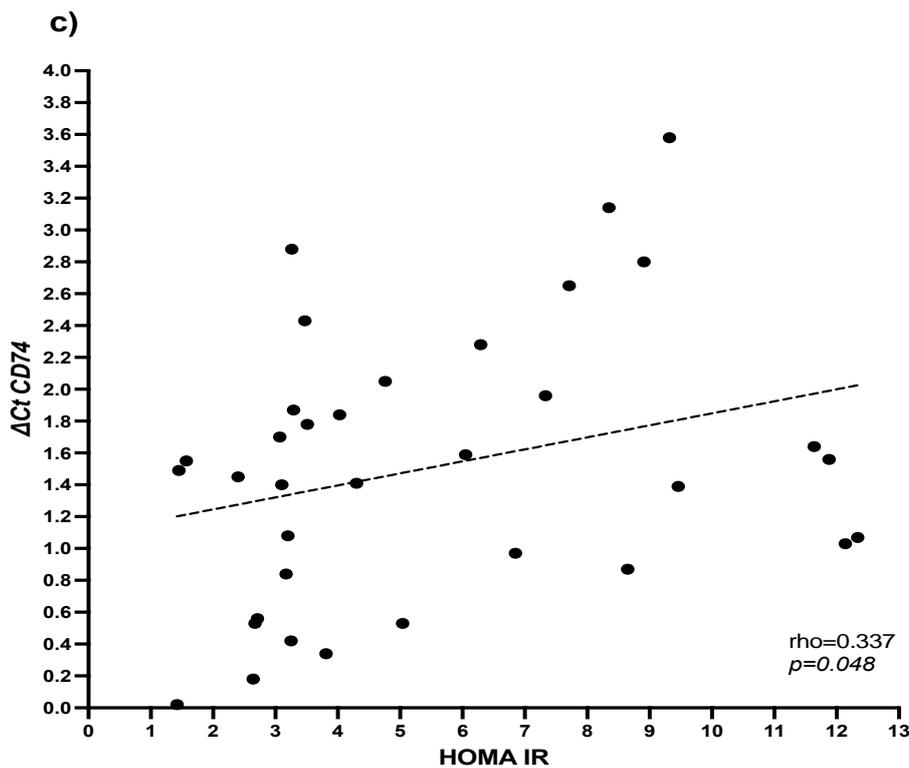
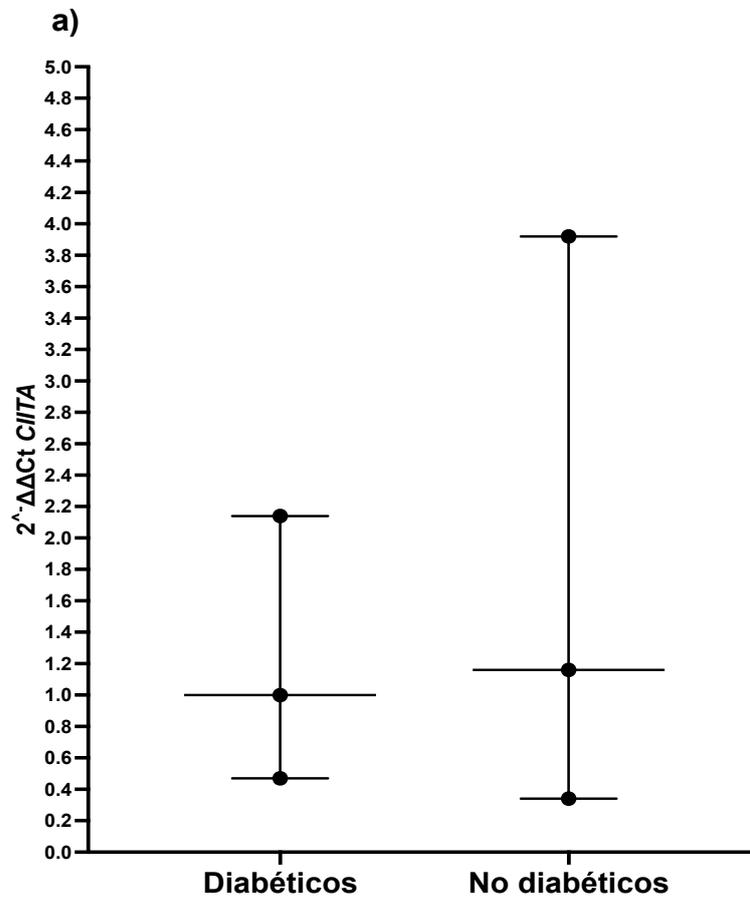
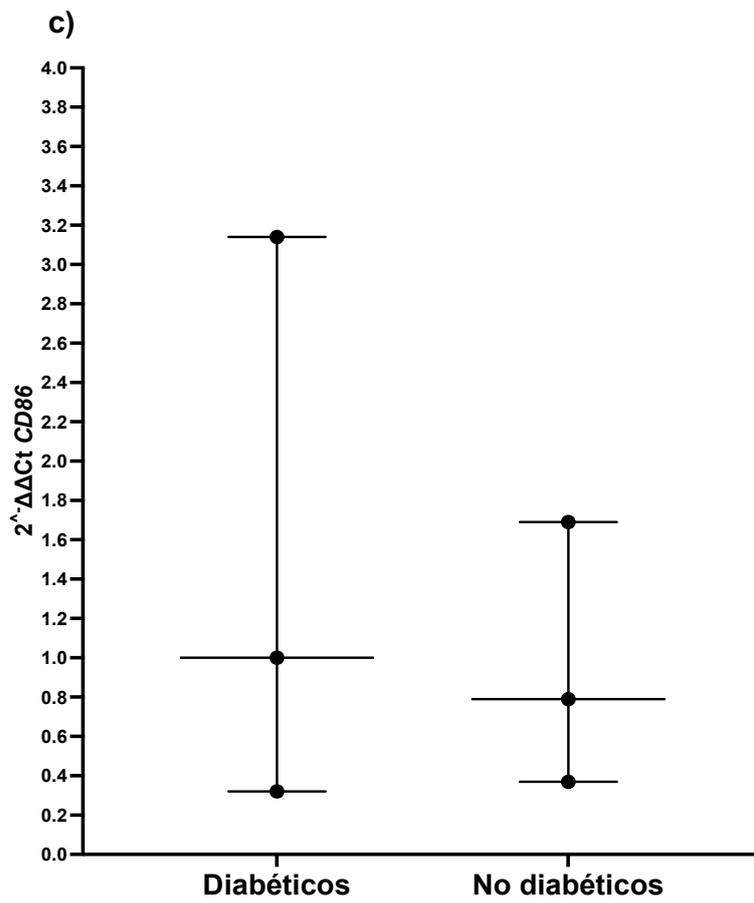
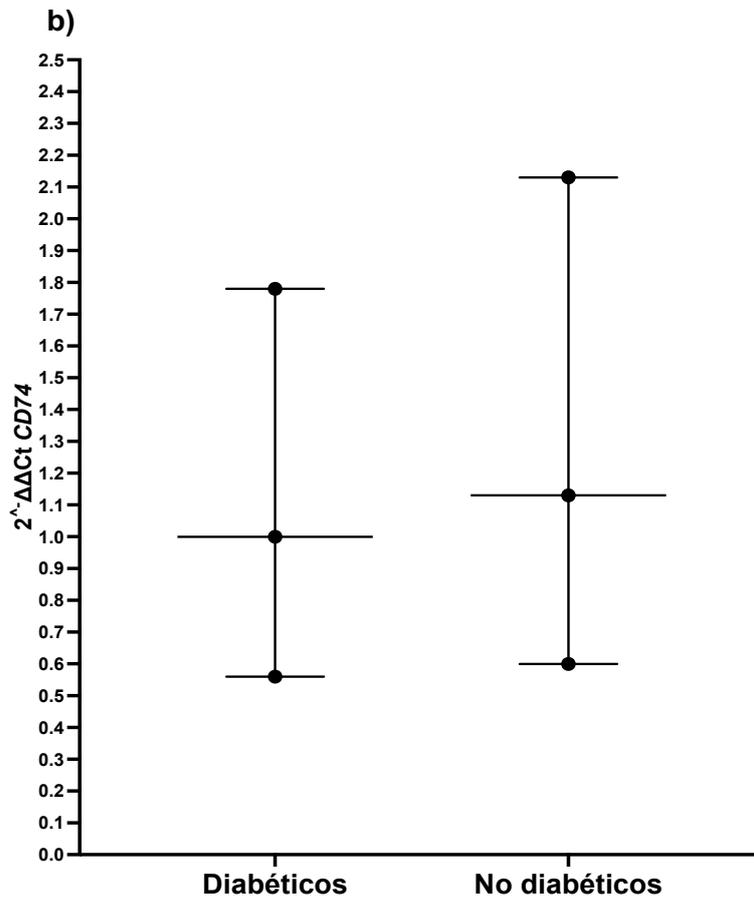


Gráfico 6. Correlación entre la variable HOMA-IR y el $\Delta Ct CD74$
 $n=35$

2.2 Comparación de medidas entre el diagnóstico de DT2 y el ΔCt de los genes *CIITA*, *CD74* y *CD86*





2.3 Diferencias de grupos entre la variable cadera y el gen *CIITA* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

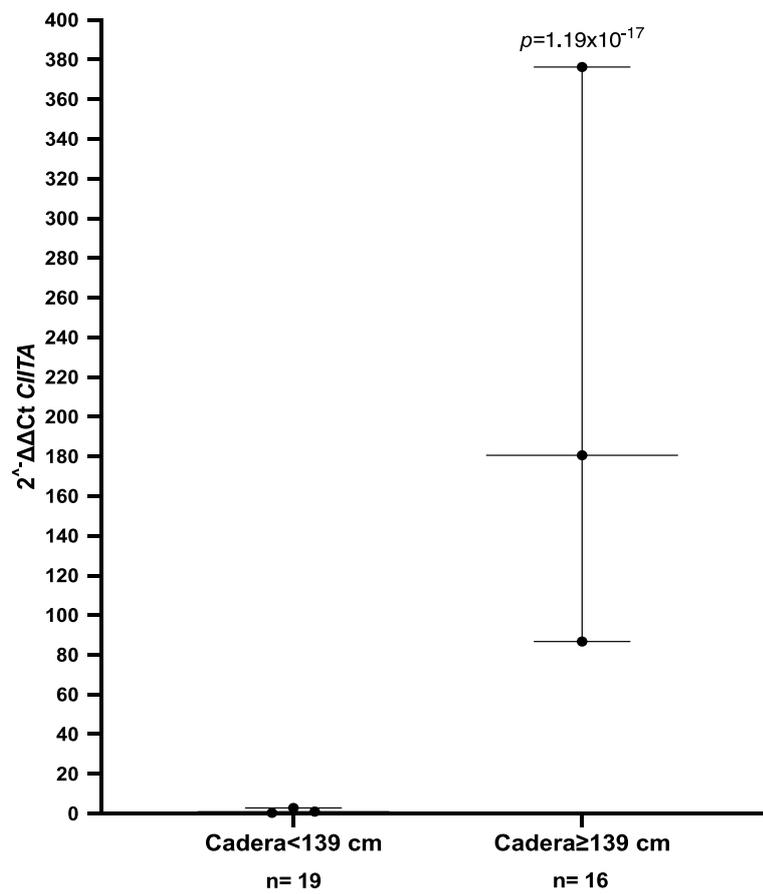


Gráfico 7. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *CIITA* en los grupos formados a partir del punto de corte de la medida de cadera (139 cm)

2.4 Diferencias de grupos entre la variable colesterol y el gen *CD86* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

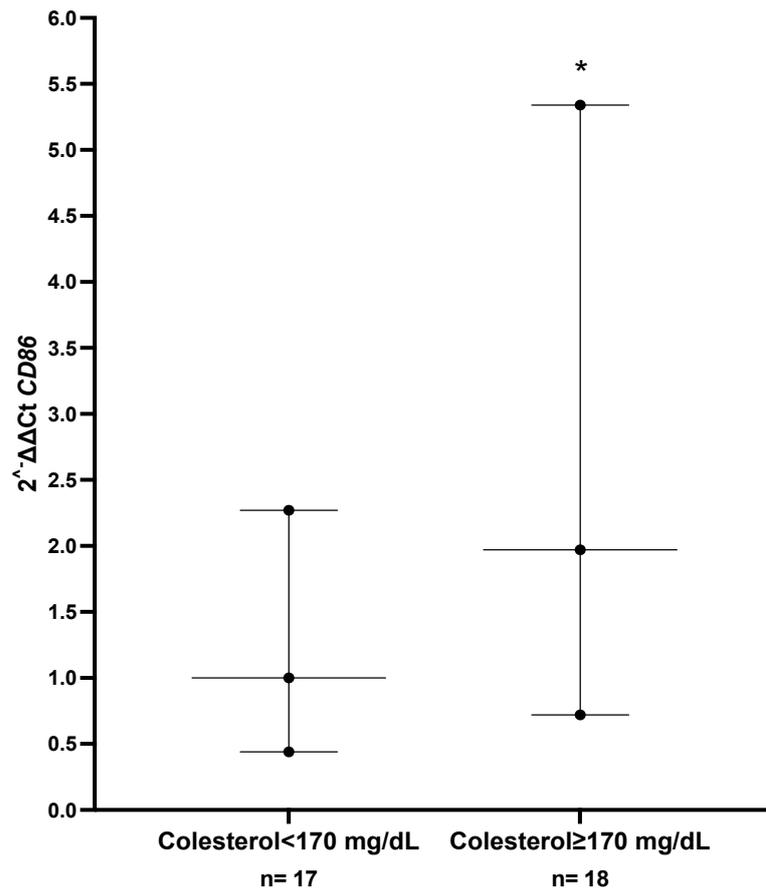


Gráfico 8. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *CD86* en los grupos formados a partir del punto de corte de colesterol (170 mg/dL) * $p < 0.05$

2.5 Diferencias de grupos entre la variable insulina y el gen *CIITA* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

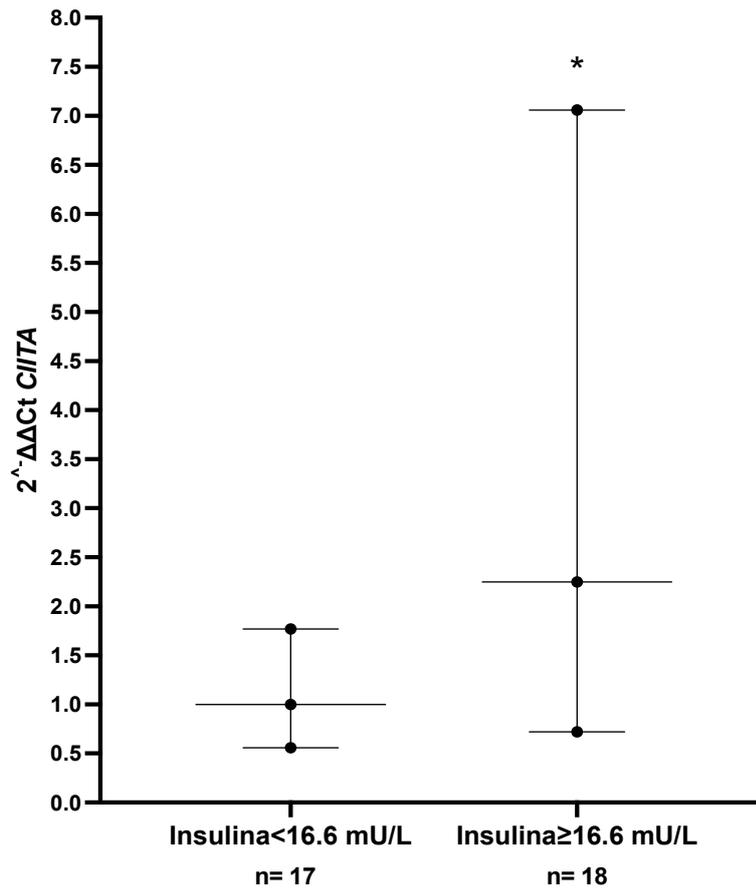


Gráfico 9. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *CIITA* en los grupos formados a partir del punto de corte de insulina (16.6 mU/L) * $p < 0.05$

2.6 Diferencias de grupos entre la variable insulina y el gen *CD74* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

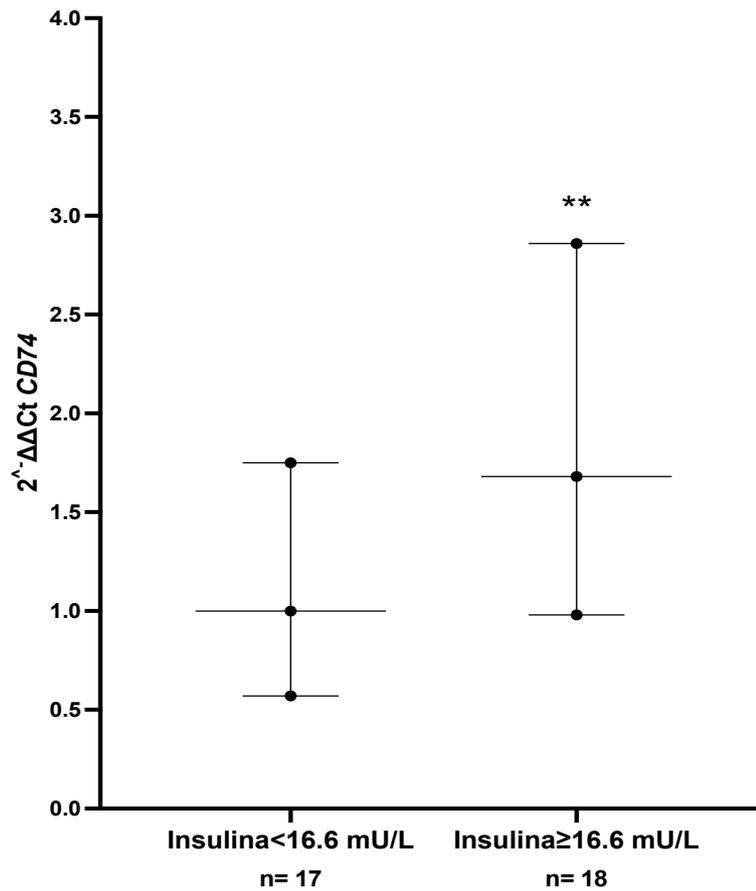


Gráfico 10. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *CD74* en los grupos formados a partir del punto de corte de insulina (16.6 mU/L) ** $p < 0.005$

Discusión

La obesidad representa una alteración tanto a nivel fisiológico como celular, principalmente el tejido que se ve afectado es el tejido adiposo (TA), debido a un proceso conocido como inflamación crónica de bajo grado, no presenta signos evidentes de inflamación como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor a diferencia de la inflamación clásica. Numerosos estudios muestran una estrecha asociación entre tres afecciones: obesidad, resistencia a la insulina e inflamación. Principalmente, la inflamación contribuye a la progresión de varios trastornos metabólicos en la obesidad.²⁶ Con relación a lo antes mencionado, los resultados obtenidos tanto de los valores de correlación como de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en ambos tejidos, empezando por el TA subcutáneo, en donde se obtuvo un valor de correlación entre el IMC y el ΔCt *CD74* de -0.406 (*Tabla 7, Gráfico 1*), indicando que a medida que el IMC incrementa, los niveles de expresión del gen *CD74* disminuyen, lo que podría relacionarse a un menor presencia del MHC de clase II en la superficie celular de los adipocitos y algunas otras APC. Según estudios transversales, los individuos obesos metabólicamente sanos presentaron adipocitos de menor tamaño que los pacientes obesos metabólicamente anormales, lo que sugiere que la hipertrofia de los adipocitos estaba asociada al desarrollo de trastornos metabólicos.^{27,28} La expansión hipertrófica se da en respuesta a la sobrealimentación, y depende de la capacidad de los adipocitos existentes para captar y retener los lípidos circulantes, lo que conduce a una desregulación del TA caracterizada por un perfil proinflamatorio y resistencia a la insulina. En el depósito adiposo subcutáneo, es el lugar más grande y menos perjudicial para almacenar el exceso de calorías, la expansión se logra inicialmente por hiperplasia, actuando como "sumidero" metabólico del exceso de lípidos almacenados.^{29,30} Con esto presente, se podría considerar que el TA subcutáneo sufre una menor hipertrofia por el exceso de energía en forma de grasas, disminuyendo la expresión del gen *CD74*, necesario para la presencia del MHC-II en la superficie celular en los adipocitos, y disminuyendo la presentación antigénica a las células T *CD4+*. Con respecto a los resultados obtenidos en la diferencia de grupos mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el primero indica que en los grupos de pacientes separados a partir del punto de corte en la variable glucosa (100 mg/dL), los pacientes que presentan niveles de glucosa menores a 100 mg/dL, el nivel de expresión del gen *CD86* es menor, y los pacientes con niveles de glucosa mayores a 100 mg/dL, los niveles de expresión de dicho gen están incrementados (*Gráfico 2*), lo que ocasiona que haya una mayor coestimulación por parte de los adipocitos a las células T *CD4+* incrementando su maduración y la producción de citocinas proinflamatorias. Investigaciones previas han recalcado el papel de los monosacáridos en las células del sistema inmune, principalmente en las APC, como los monocitos/macrófagos, donde se demostró que la ingesta crónica de una dieta rica en fructosa (6-10 semanas; solución al 20% de fructosa) favorecía los subtipos de macrófagos M1 (proinflamatorios), con una reducción del número de subtipos M2 (antiinflamatorios) en el TA epididimal de los ratones.³⁰ Como también en las células dendríticas, ya que probaron concentraciones de 5 a 25 mM de fructosa y glucosa *in vitro* utilizando células dendríticas humanas recogidas de donantes sanos durante 24-72 h. Los resultados indicaron que 15 mM de fructosa eran capaces de inducir un aumento de la expresión de marcadores clave de activación, como *CD86*, una molécula coestimuladora. Esto, a su vez, fue seguido por un aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6, y TNF- α . Además, el tratamiento con 15 mM de glucosa también indujo un aumento de la expresión de los niveles de TNF-

α al cabo de 72 h.³¹ Estos hallazgos descritos anteriormente podrían dar una razón del incremento de los niveles de expresión del gen *CD86* en los de adipocitos de los pacientes que presentan niveles elevado de glucosa (≥ 100 mg/dL), haciendo que sean mas susceptibles a la inflamación crónica por la coestimulación de las células T. Otro resultado obtenido en la diferencia de grupos esta relacionada con la variable triglicéridos, a partir del punto de corte establecido (150 mg/dL) se observó que el grupo con valores por debajo del punto de corte tiene una menor expresión del gen *CD74*, en comparación a los pacientes con niveles por encima del punto de corte en donde la expresión del gen esta incrementada (*Gráfico 3*), lo que podría ocasionar que una mayor cantidad de moléculas de MHC-II estén presentes en la superficie celular de los adipocitos. De acuerdo con la literatura, estudios previos han dado como resultados que los adipocitos también expresan moléculas MHC-II, y que sus niveles aumentan significativamente en los adipocitos de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD). El MHC-II de los adipocitos empieza a aumentar a las 2 semanas de la HFD, y la expresión de los genes marcadores Th1 proinflamatorios *Tbx21* e *Irfg* en las células T residentes en el tejido adiposo (ART) aumenta a las 2-3 semanas tras la HFD, lo que sugiere que la MHC-II de los adipocitos puede mediar en la activación de las células Th1 y desencadenar la inflamación adiposa inducida por la obesidad.³² Con este antecedente, se puede relacionar con los resultados obtenidos con respecto a los niveles incrementados del gen *CD74* en los pacientes con exceso de triglicéridos, lo que generaría un constante estado inflamatorio. El otro tejido analizado corresponde al TA visceral, donde se obtuvieron 3 correlaciones con una significancia menor al 0.05, la primera de estas fue de -0.377 entre la variable triglicéridos y el Δ Ct *CD86* (*Tabla 9, Gráfico 4*), indicando que a medida que incrementan los niveles de triglicéridos también lo hacen los niveles de expresión del gen *CD86*, pudiendo ocasionar una mayor coestimulación a las células T. Se ha investigado el efecto de los ácidos grasos en la línea celular del sistema inmune, teniendo como registros importantes que las lipoproteínas ricas en triglicéridos (ácidos grasos saturados) aumentan la actividad transcripcional de los marcadores genéticos proinflamatorios *CD80* y *CD86* en las células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs).³³ Además de esto, otros estudios abarcaron que los moDCs estimulados con ácido palmítico regulaban al alza la expresión de *CD83* y *CD86*, como también indujo la secreción de IL-1 dependiente de TLR4, generando especies reactivas de oxígeno y activando la vía canónica NF κ B en los moDCs.³⁴ Con este antecedente se podría considerar que este fenómeno sucede de igual manera en los adipocitos, incrementando la coestimulación de las células T CD4⁺. Los otros resultados de correlación, entre las variables Insulina- Δ Ct *CD74* (*Tabla 9, Gráfico 5*) y HOMA IR- Δ Ct *CD74* (*Tabla 9, Gráfico 6*), dieron un valor de correlación de -0.396 y -0.337 respectivamente, lo que indica que mientras los niveles tanto de insulina como el valor de HOMA-IR incrementan, también lo hacen los niveles de expresión del gen *CD74*, lo que podría ocasionar que los adipocitos presenten una mayor cantidad de antígenos proteínicos a las células T CD4⁺. *CD74* (también conocida como cadena invariante MHC de clase II) es una proteína transmembrana de tipo II que forma parte del complejo receptor del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).³⁵ El MIF es también un importante mediador endógeno de la expresión de la COX-2 en diversos tipos de células, y la actividad de la COX-2 puede afectar a las actividades proinflamatorias y protumorigénicas del MIF.^{36, 37} La activación de la COX-2 durante la inflamación del TA es importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina, el hígado graso y la modulación de las células inmunitarias en ratas con obesidad inducida por HFD, ya que se genera un cambio fenotípico de los macrófagos del TA

de macrófagos M2 antiinflamatorios a macrófagos M1 proinflamatorios.^{38, 39} Al tener presente el papel que desempeña el CD74 en el incremento de los macrófagos M1 mediante la vía COX-2, el incremento de dicho gen podría desencadenar un estado de hiperinsulinemia, como también, presentar una mayor probabilidad de padecer resistencia a la insulina, y presentar diabetes tipo 2, además otro antecedente importante es el mismo TA visceral, el cual es reconocido como el principal depósito de grasa asociado al aumento en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas, ya que se le implica como el tejido que da inicio a la resistencia a la insulina (IR) debido a que un incremento en el flujo de los ácidos grasos libres (AGL) tanto en el sistema portal como en la circulación general tiene efectos sobre la captación de glucosa a nivel celular y en el metabolismo glucídico intracelular.⁴⁰ Con respecto a los resultados obtenidos en la diferencia de grupos, el primer resultado significativo corresponde a la variable cadera y el gen *C/ITA*, tomando como punto de corte una medida de cintura de 139 cm, en donde el grupo con una medida de cintura menor al punto de corte los niveles de expresión de dicho gen son menores, comparados con el grupo con una medida de cintura mayor al punto de corte, teniendo valores muy incrementados de la expresión del gen *C/ITA*, hasta 180 veces más que el grupo control, siendo este el resultado más interesante obtenido de la experimentación (*Gráfico 7*). Esto podría causar una mayor síntesis del MHC-II y generando así un estado constante de inflamación en estos pacientes. Uno de los problemas que genera la obesidad en el TA es que dicho tejido puede volverse disfuncional e incapaz de expandirse adecuadamente para almacenar el exceso de energía ingerida, lo que desencadena el almacenamiento de triglicéridos en lugares donde la función principal no es el almacenamiento de grasa, a esta grasa se le denomina como grasa ectópica, que se localiza en los principales órganos reguladores de la glucosa, como el hígado, el músculo esquelético y el páncreas, suele considerarse "lipotóxica", ya que puede interferir en la señalización normal de la insulina, promover la resistencia a ésta y aumentar el riesgo de diabetes tipo 2.⁴¹ Respecto a la distribución del tejido adiposo respecto al sexo, las mujeres tienen más TA subcutáneo, lo que crea una distribución en "forma de pera", mientras que los hombres tienen grasa distribuida predominantemente en el TA visceral alrededor de los órganos abdominales creando un hábito corporal en "forma de manzana".⁴² Dado el resultado obtenido, la posible causa del incremento de la expresión del gen *C/ITA* en los pacientes con una cintura por arriba de los 139 cm se deba a la presencia de la grasa ectópica, ya que al tener una mayor presencia de mujeres que de hombres en el estudio, el TA glúteo femoral que se encuentra más relacionado con las mujeres (compuesto en su mayoría de TA subcutáneo) ayuda a reducir el impacto de dicha grasa ectópica, mientras que los hombres al tener una menor proporción de este tipo de tejido indica un incremento del riesgo de la grasa ectópica, y siendo un punto de afectación principal la cadera, en donde podría ocasionar una inflamación exacerbante y por ende, ser más susceptible a los desordenes metabólicos, como la RI. El siguiente resultado obtenido fue entre colesterol-*CD86*, en donde el punto de corte establecido (170 mg/dL) indica que los pacientes con niveles menores al punto de corte presentaron un nivel de expresión menor de dicho gen, comparado con los niveles de expresión de *CD86* en los pacientes con niveles por arriba del punto de corte, lo que podría resultar en un incremento de la coestimulación por parte de los adipocitos y algunas células del sistema inmune como los macrófagos hacia las células T CD4⁺ (*Gráfico 8*). Investigaciones han descrito la alteración al sistema inmune por parte de un compuesto derivado del colesterol, el 27-Hidroxicolesterol (27OHChol), el cual aumenta la inflamación y desencadena una respuesta inmunitaria mediante la

activación de monocitos/macrófagos.⁴³ También induce moléculas implicadas en la activación de las células T en la superficie de las células monocíticas.⁴⁴ Los receptores LXR tienen funciones cruciales en la regulación de las respuestas inmunitarias. Se sabe que los oxisteroles endógenos, como el 27OHChol, activan los LXRs.⁴⁵ Se ha demostrado que la actividad agonística de los LXR está implicada en la expresión de *CCL3*, *CXCL8*, *CD14*, *CD80*, *CD86*, *CD163* y *CD206* tanto en monocitos como en macrófagos de humanos.⁴⁶ Lo anterior descrito podría explicar el incremento de los niveles del gen *CD86* en los adipocitos con niveles elevados de colesterol, incluso pudiendo considerar que no solo el 27OHChol, si no que otro tipo de derivados como el propio colesterol participen en las alteraciones al sistema inmune, específicamente con los coestimuladores y algunas otras vías relacionadas con la inmunidad. Los resultados finales obtenidos de la diferencia de grupos involucran a los genes *CIITA* y *CD74* con los niveles de insulina, a partir del punto de corte establecido (16.6 mU/L), los pacientes con valores por arriba de dicho punto de corte presentaron un incremento en la expresión de los genes *CIITA* y *CD74* (*Gráfico 9 y 10*), en relación con este último gen se describió anteriormente con los valores de correlación que a medida que los niveles de insulina incrementaban, también lo hacía la expresión de *CD74*, así que en los grupos con mayores niveles de insulina es viable la expresión de *CD74* se vea incrementada de igual manera. Con respecto a los resultados con el gen *CIITA*, el grupo que presentó mayores niveles de expresión de este gen fue el que tiene niveles de insulina por encima del punto de corte establecido, lo que podría estar involucrado en un incremento en la síntesis de MHC-II y generando un incremento en la interacción APC-célula T CD4⁺. El TA al presentar un constante estado inflamatorio, abundan muchas citocinas proinflamatorias, entre ellas el IFN- γ , la cual ha sido investigada y encontrando como resultado induce resistencia a la insulina, regula a la baja los marcadores de diferenciación y reduce el almacenamiento de lípidos en los adipocitos humanos a través de la vía JAK-STAT, muy probablemente mediada por la activación sostenida de JAK1-STAT1.⁴⁷ Además de interferir con la vía de señalización de la insulina, también regula la expresión del MHC-II, la inducción de genes MHC II por IFN- γ en macrófagos está regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. La expresión de los genes MHC II está bajo el control de *CIITA*, que requiere tratamiento con IFN- γ para ser inducida y organizar la expresión génica sin unión directa al promotor.⁴⁸ Con esto presente, se podría dar hincapié al porque del incremento del gen *CIITA* a mayores niveles de insulina, ya que el IFN- γ estaría afectando tanto a la señalización de la insulina, provocando un estado hiperinsulinémico, como también un incremento en la expresión del gen y haciendo que el MHC-II se incremente y genere tanto más células T CD4⁺ como citocinas.

Conclusiones

El TA subcutáneo presento una relación inversamente proporcional entre la variable IMC y el gen *CD74*, mientras que, en la diferencia de grupos, los pacientes con niveles elevados de glucosa (punto de corte=100 mg/dL) y triglicéridos (punto de corte=150 mg/dL) presentaron una mayor expresión de los genes *CD86* y *CD74* respectivamente. Respecto al TA visceral, mostro una relaciones directamente proporcionales entre la variable triglicéridos y el gen *CD86*, las variables insulina y HOMA-IR con el gen *CD74*, y en el caso de la diferencia de grupos, el valor mas interesante corresponde a los pacientes con mayor medida de cintura (punto de corte=139 cm) con valores de expresión bastante incrementados del gen *CIITA*, como también los pacientes con niveles elevados de colesterol (punto de corte=170 mg/dL) presentaron niveles elevados del gen *CD86*, y finalmente, los pacientes con niveles elevado de insulina (punto de corte=16.6 mU/L) mostraron niveles de expresión elevados de los genes *CIITA* y *CD74*, siendo este el tejido con mayores relaciones y por ende, uno de los mas alterados.

Referencias bibliográficas

1. Bellido D, López de la Torre M, Monereo S. Obesidad : una enfermedad crónica [Internet]. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2023 [consultado el 8 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://search-ebscobhost.com.pbidi.unam.mx:2443/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001002199225&lang=es&site=eds-live>
2. Rubio MA, Ballesteros MD, Sánchez A, Torres AJ. Manual de obesidad mórbida [Internet]. 2ª edición. Madrid: Médica Panamericana; 2015 [consultado el 8 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://search-ebscobhost.com.pbidi.unam.mx:2443/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001002199179&lang=es&site=eds-live>
3. González Jiménez E. Obesidad: Análisis etiopatogénico y fisiopatológico. Endocrinol Nutr [Internet]. 2013 [consultado el 8 de agosto de 2023];60(1):17-24. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-pdf-S1575092212001283>
4. Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. REV MED CLIN CONDE [Internet]. 2012 [consultado el 8 de agosto de 2023];23(2):124-8. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-pdf-S0716864012702882>
5. Kahn C.R, Wang G, Lee K. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic síndrome. J Clin Invest. 2019;129(10):3990-4000.
6. Mittal B. Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. Indian J Med Res. 2019;149(5):571-573.
7. Greenberg, AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. Am J Clin Nutr. 2006;83(2):461S–465S.
8. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J. Clin. Invest. 2007; 117, 175–184.
9. Zeyda, M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. International Journal of Obesity. 2007;31(9):1420–1428.
10. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby. 6ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana, 2007 (pp 189-199).
11. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, *et al.* CD14^{dim} CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011; 31(10): 2322–2330.
12. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M. *et al.* Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. Diabetes. 2009; 58(11): 2574–2582.
13. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. Nature. 1997; 389(6651): 610–614.
14. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J. Clin. Invest. 2003; 112(12): 1796–1808.
15. Langin D, Arner P. Importance of TNF α and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. Trends Endocrinol Metab. 2006; 17(8): 314–320.

16. Poulsen L la C, Siersbæk M, Mandrup S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2012; 23(6): 631–639.
17. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(2): 971–976.
18. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, *et al.* Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med.* 2009; 15(8): 940–945.
19. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. 2011; 332(6026): 243-7.
20. Hussaarts L, García N, Beek L, Heemskerk MM, *et al.* Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J.* 2015; 29(7): 3027-39.
21. Lumeng CN. Innate immune activation in obesity. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(1), 12–29.
22. Cho KW, Morris DL, DelProposto JL, *et al.* An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4⁺ T cells controls obesity-induced inflammation. *Cell Rep.* 2014;9(2): 605-617.
23. León JA, Steimle V. The MHC Class II Transactivator CIITA: Not (Quite) the Odd-One-Out Anymore among NLR Proteins. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3): 1074.
24. Wurster KD, Costanza M, Kreher S, *et al.* Aberrant Expression of and Cell Death Induction by Engagement of the MHC-II Chaperone CD74 in Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL). *Cancers (Basel).* 2021;13(19): 5012.
25. Lankipalli S, Selvam D, Samanta D, Nair D, Ramagopal UA. Cryptic association of B7-2 molecules and its implication for clustering. *Protein Sci.* 2021;30(9): 1958-1973.
26. Obesity and Insulin Resistance: Associations with Chronic Inflammation, Genetic and Epigenetic Factors
27. Bluher M. Are there still healthy obese patients? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity* 2012; 19: 341–346.
28. Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Tonks K, Campbell LV, Greenfield JR. Insulinsensitive obesity in humans - a 'favorable fat' phenotype? *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 116–124.
29. Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity—The Case of BBS Obesity.
30. Gambaro, S.E.; Zubiría, M.G.; Portales, A.E.; Rey, M.A.; Rumbo, M.; Giovambattista, A. M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. *J. Nutr. Biochem.* 2018, 61, 173–182.
31. Jaiswal, N.; Agrawal, S.; Agrawal, A. High fructose-induced metabolic changes enhance inflammation in human dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2019, 197, 237–249.
32. Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, Lin J, Zou J, Liu JZ, *et al.* Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. *Cell Metab* (2013) 17:411–22.
33. Dietary Fatty Acids in Postprandial Triglyceride-Rich Lipoproteins Modulate Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Maturation and Activation.

34. Nicholas, D.A.; Zhang, K.; Hung, C.; Glasgow, S.; Aruni, A.W.; Unternaehrer, J.; Payne, K.J.; Langridge, W.H.R.; De Leon, M. Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β . *PLoS ONE* 2017, 12
35. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. (2003) MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med.* 197, 1467–1476
36. Carli C, M. C., Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. (2009) Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways. *Endocrinology* 150, 3128-3137
37. Sampey AV, H. P., Mitchell RA, Metz CN, Morand EF. (2001) Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.* 44, 1273-1280
38. Hsieh PS, J. J., Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC. (2009) COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity.* 17, 1150-1157
39. Hsieh PS, L. K., Chiang CF, Chen CH. (2010) Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *Eur J Clin Invest.* 40, 164-171
40. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina
41. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol.* (2015) 208:501–12.
42. Chang E, Varghese M, Singer K. Gender and Sex Differences in Adipose Tissue. *Curr Diab Rep.* 2018 Jul 30;18(9):69.
43. Kim SM, Lee SA, Kim BY, Bae SS, Eo SK, Kim K. 27-Hydroxycholesterol induces recruitment of monocytic cells by enhancing CCL2 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;442:159-164.
44. Son Y, Kim SM, Lee SA, Eo SK, Kim K. Oxysterols induce transition of monocytic cells to phenotypically mature dendritic cell-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;438:161-168.
45. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem.* 2001;276:38378-38387.
46. 27-Hydroxycholesterol induces macrophage gene expression via LXR-dependent and -independent mechanisms
47. Interferon Attenuates Insulin Signaling, Lipid Storage, and Differentiation in Human Adipocytes via Activation of the JAK/STAT Pathway
48. Induction of CIITA by IFN- γ in macrophages involves STAT1 activation by JAK and JNK

Anexos

1. Valores de concentración, índices 260/230 y 260/280 del RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral

Folio del paciente	Concentración RNA total (ng/ μ L)	260/230 RNA	260/280 RNA
GHR-001	240.16	1.87	2.03
GHR-002	299.57	2.12	2.01
GHR-003	451.95	2.20	2.02
GHR-004	512.09	2.05	2.05
GHR-005	409.78	2.30	2.03
GHR-010	161.83	1.77	2.05
GHR-011	531.97	2.12	2.08
GHR-012	44.41	0.57	1.97
GHR-014	201.19	2.12	2.02
GHR-015	1497.08	2.24	2.07
GHR-017	463.43	1.54	2.05
GHR-019	173.21	1,60	2.05
GHR-022	406.62	2.13	2.03
GHR-023	447.91	2.01	2.04
GHR-024	501.24	1.75	2.05
GHR-025	592.61	1.88	2.06
GHR-026	292.48	1.89	2.00
GHR-027	253.99	1.84	2.03
GHR-028	130.07	1.82	2.11
GHR-029	182.03	1.99	2.33
GHR-032	72.78	0.42	1.87
GHR-033	633.63	2.08	2.06
GHR-034	477.69	1.76	2.05
GHR-036	204.20	0.17	2.06
GHR-040	224.00	2.31	1.97
GHR-041	61.80	2.35	1.90
GHR-045	110.90	1.76	2.01
GHR-046	75.10	2.06	2.02

Tabla 11. Valores de concentración, índice 260/230 y 260/280 de RNA total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo de los pacientes con obesidad mórbida

Folio del paciente	Concentración RNA total (ng/μL)	260/230 RNA	260/280 RNA
GHR-001	601.60	1.42	2.06
GHR-002	446.24	2.14	1.99
GHR-003	614.77	2.22	1.99
GHR-004	473.48	2.20	2.05
GHR-005	243.51	2.01	2.03
GHR-009	488.42	2.37	2.01
GHR-010	1266.55	2.26	2.11
GHR-011	655.61	2.15	2.08
GHR-012	753.29	2.20	2.09
GHR-013	664.92	2.25	2.05
GHR-014	352.20	2.01	2.03
GHR-015	2330.67	2.05	2.07
GHR-016	1203.75	2.28	2.07
GHR-017	830.85	2.37	2.04
GHR-019	843.03	2.27	2.08
GHR-020	581.66	2.20	2.07
GHR-021	456.78	2.43	2.04
GHR-023	602.87	1.82	2.04
GHR-024	729.70	1.77	2.08
GHR-025	673.21	2.18	2.07
GHR-026	521.44	2.00	2.01
GHR-027	545.30	1.86	2.05
GHR-028	256.43	2.19	2.07
GHR-029	557.91	2.09	2.17
GHR-030	178.74	1.88	2.09
GHR-032	620.17	1.97	1.99
GHR-033	279.07	2.04	1.96
GHR-034	524.87	1.24	2.05
GHR-035	131.21	1.42	2.03
GHR-036	429.95	1.65	2.11
GHR-037	345.81	1.88	2.04
GHR-040	257.30	2.10	2.03
GHR-041	199.80	1.89	2.05
GHR-045	285.90	1.87	1.91
GHR-046	180.10	1.77	2.05

Tabla 12. Valores de concentración, índice 260/230 y 260/280 de RNA total de las muestras de tejido adiposo visceral de los pacientes con obesidad mórbida

2. Estandarización de las condiciones de PCR a tiempo real mediante PCR a punto final

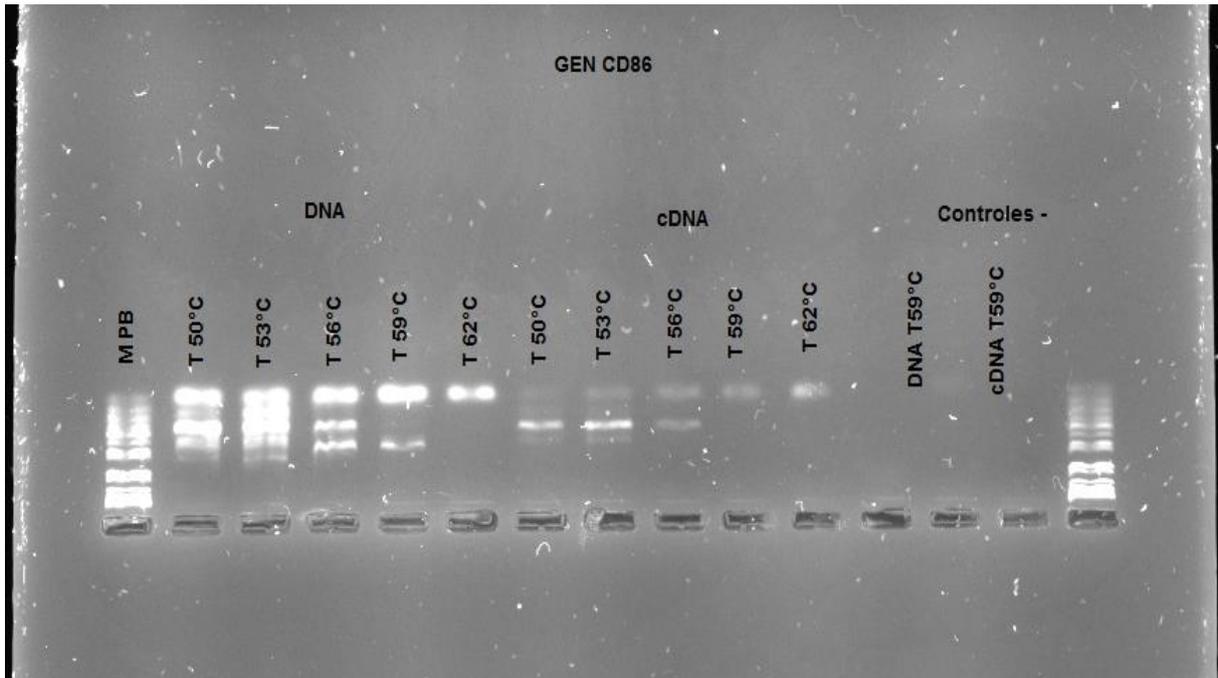


Fig 4. Productos de amplificación en gel de agarosa del gen CD86 expuestos a gradientes de temperatura de alineación en cDNA y DNA humano
M PB= marcador de pares de bases

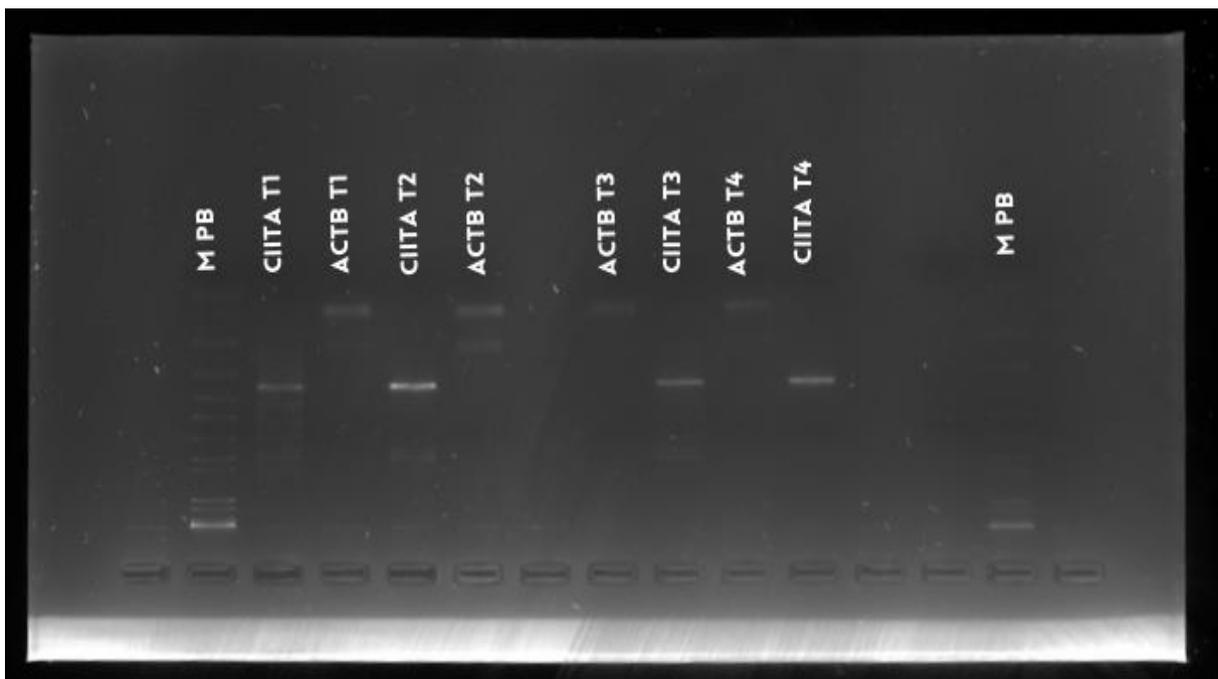


Fig 5. Productos de amplificación en gel de agarosa de los genes CIITA y CD86 expuestos a gradientes de temperatura de alineación en cDNA humano
T1=53 °C; T2=56 °C; T3=59 °C; T4=62 °C M PB= marcador de pares de bases

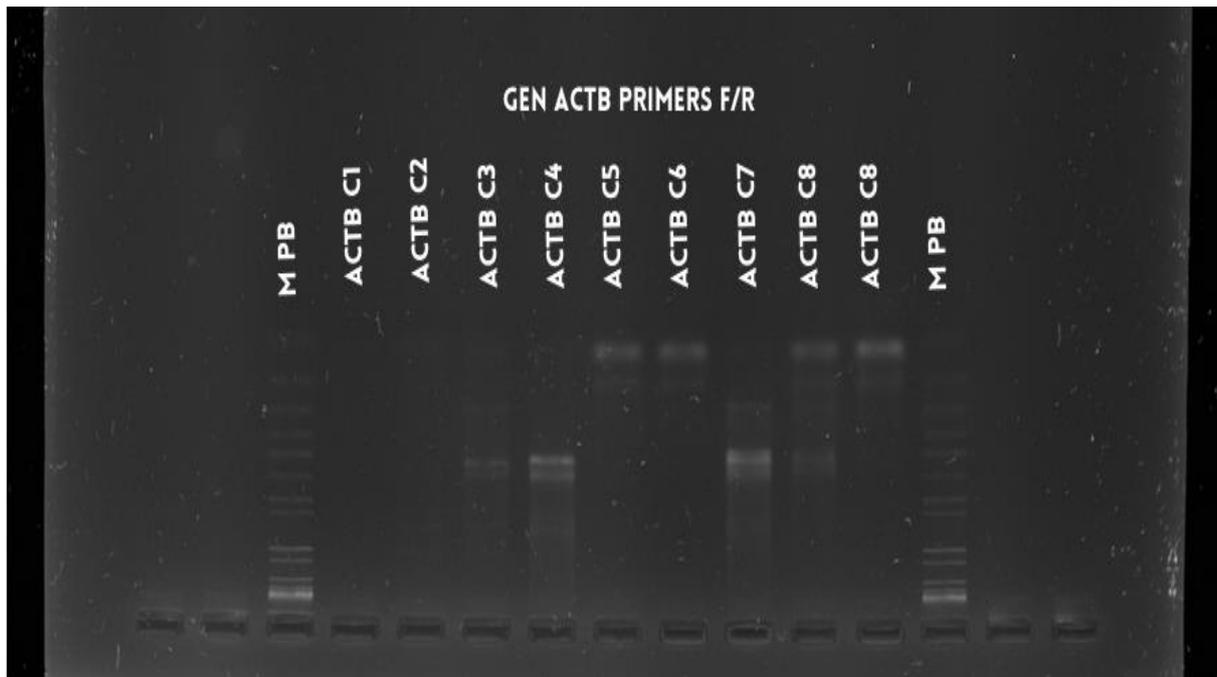


Fig 6. Productos de amplificación en gel de agarosa del gen ACTB expuesto a diferentes concentraciones de oligonucleótidos sentido/antisense en cDNA humano
 M PB= marcador de pares de bases
 Concentraciones de oligonucleótidos sentido/antisense (C1-0.05 μ M/0.05 μ M), (C2-0.05 μ M/ 0.3 μ M), (C3-0.05 μ M/0.9 μ M), (C4-0.3 μ M/0.05 μ M), (C5-0.3 μ M/0.3 μ M), (C6-0.3 μ M/0.9 μ M), (C7-0.9 μ M/0.05 μ M), (C8-0.9 μ M/0.3 μ M), (C9- 0.9 μ M/0.9 μ M)

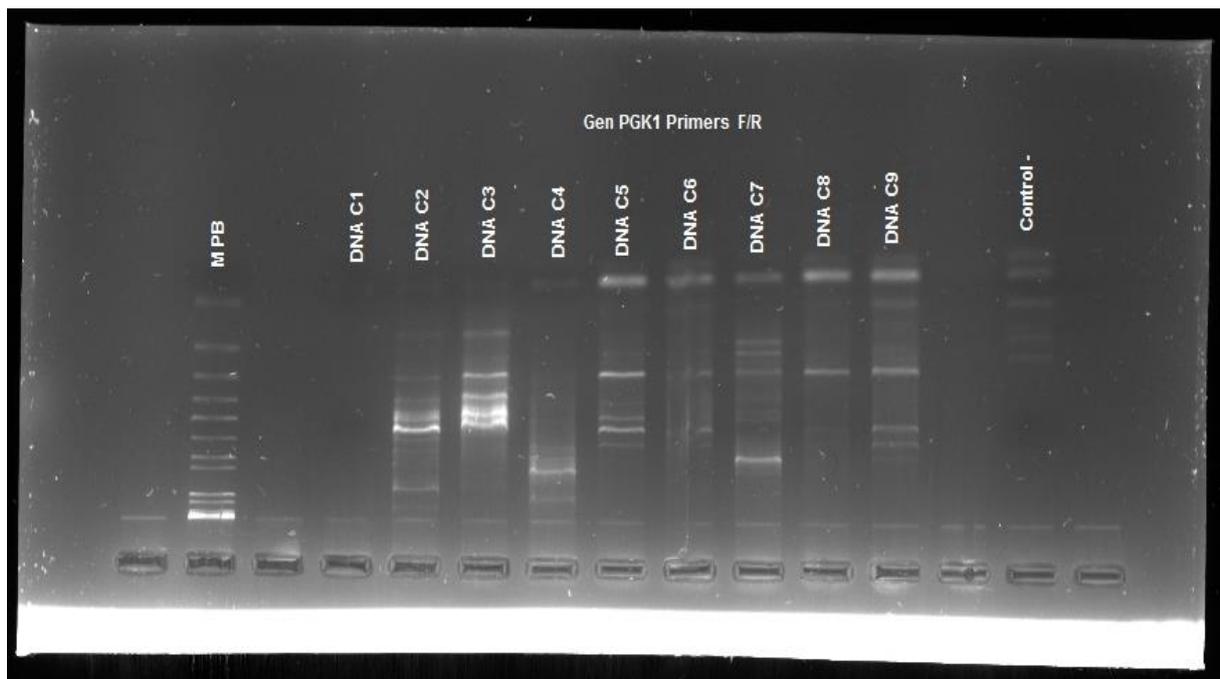


Fig 6. Productos de amplificación en gel de agarosa del gen PGK1 expuesto a diferentes concentraciones de oligonucleótidos sentido/antisense en cDNA humano
 M PB= marcador de pares de bases

Concentraciones de oligonucleótidos sentido/antisentido (C1-0.05 μ M/0.05 μ M), (C2-0.05 μ M/ 0.3 μ M), (C3-0.05 μ M/0.9 μ M), (C4-0.3 μ M/0.05 μ M), (C5-0.3 μ M/0.3 μ M), (C6-0.3 μ M/0.9 μ M), (C7-0.9 μ M/0.05 μ M), (C8-0.9 μ M/0.3 μ M), (C9- 0.9 μ M/0.9 μ M)