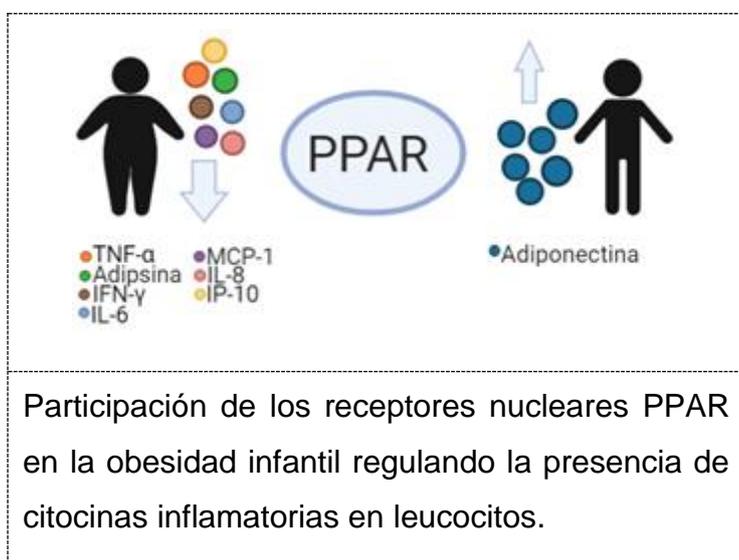


Relación entre el perfil inflamatorio y la expresión de los factores de transcripción PPAR en leucocitos de niños con obesidad.

Relationship between the inflammatory profile and expression of PPAR transcription factors in leukocytes of children with obesity.



Relación entre el perfil inflamatorio y la expresión de los factores de transcripción PPAR en leucocitos de niños con obesidad.

Relationship between the inflammatory profile and expression of PPAR transcription factors in leukocytes of children with obesity.

Laura Alejandra Vargas Romero

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Dra. Mónica Losada Barragan

RESUMEN

La obesidad es una patología asociada con el depósito anormal de grasa en adipocitos, que causa inflamación y resistencia a insulina aumentando el riesgo de diabetes. Este proceso inflamatorio está asociado a la actividad de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) que tiene una función antiinflamatoria. Sin embargo, se desconoce el rol de estos receptores en leucocitos y su papel en la inflamación en la obesidad infantil. Se utilizaron muestras de sangre de un grupo de niños entre 7 y 17 años de edad, sanos y con obesidad para posterior análisis de expresión génica de los isotipos de PPAR presentes en sus leucocitos por qPCR. Los niveles séricos de citocinas, quimiocinas y adipocinas fueron determinados mediante citometría de flujo. Se encontró un aumento de interleucina-8, Interleucina-6, factor de necrosis tumoral- α , interferon- γ , proteína quimiotáctica de monocitos-1 y adiposina en obesidad, mientras que en el grupo con normopeso se encontró un aumento de adiponectina. De manera que se evidencia una relación entre la obesidad infantil y un perfil pro-inflamatorio

de citocinas, adipocinas y quimiocinas en suero. Así mismo, PPAR- α se expresó mayormente en el grupo con obesidad y presentó una correlación negativa con los niveles de TNF- α , indicando una relación entre la expresión de PPAR- α y el proceso inflamatorio de niños con obesidad.

Palabras clave: Obesidad infantil, citocinas, adipocinas, expresión génica, PPAR, leucocitos.

ABSTRACT

Obesity is a pathology associated with abnormal fat deposition in adipocytes, which causes inflammation and insulin resistance, the risk of diabetes. This inflammatory process is associated with the activity of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) that have an anti-inflammatory function. However, the role of these receptors in leukocytes and their relationship with inflammation in childhood obesity is unknown. Blood samples from a group of healthy and obese children between 7 and 17 years of age will be used for subsequent analysis of gene expression of the PPAR isotypes present in their leukocytes by qPCR. Serum levels of cytokines, chemokines, and adipokines were included by flow cytometry. An increase in interleukin-8, Interleukin-6, tumor necrosis factor- α , interferon- γ , monocyte chemotactic protein-1 and adiponectin was found in obesity, while the increase in adiponectin was controlled in the group. Thus, a relationship between childhood obesity and a pro-inflammatory profile of serum cytokines, adipokines, and chemokines is evident. Likewise, PPAR- α was expressed mainly in the obese group and presented a negative correlation with TNF- α levels, indicating a relationship between PPAR- α expression and the inflammatory process of children with obesity.

Keywords: childhood obesity, cytokines, adipokines, gene expression, PPAR, leukocytes.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema de salud pública caracterizado por la acumulación anormal de energía en forma de grasa presente en los adipocitos, que conlleva a un aumento excesivo en la masa corporal (1). Específicamente la población entre los 5 y 19 años es diagnosticada de acuerdo con el percentil de índice de masa corporal (IMC) y clasificado mediante el uso de tablas de puntaje Z del IMC de la organización mundial de la salud (OMS) para los estándares de edad en niños y adolescentes (2).

La obesidad altera la respuesta inmune provocando problemas como la resistencia insulínica, desórdenes metabólicos e inflamación de tipo crónica. Siendo la última, el producto de la acción de algunas citocinas proinflamatorias (3). Por tanto, existe una estrecha relación en la alteración de la respuesta inmune y metabólica que presenta el organismo, llevando a la presencia de otras patologías como la diabetes tipo 2 (T2D) o problemas cardiovasculares (4). Estos desórdenes asociados a la obesidad se encuentran en parte relacionados con la desregulación de un grupo de moléculas que cumplen un papel inflamatorio u hormonal, denominados citocinas y quimiocinas, que contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad (4).

Existen diversas proteínas que participan en los procesos relacionados con la obesidad, como: el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) que aumenta la trombosis y presenta expresión aumentada en obesidad y enfermedades cardiovasculares (3); la lipocalina-2, caracterizada por su expresión aumentada ante estrés e inflamación (3), y en la obesidad promueve la resistencia insulínica (5); la proteína estimulante de adhesión (ASP), tiene actividad proinflamatoria al estimular el almacenamiento de

triglicéridos, esterificar ácidos grasos, aumentando su captación, también inhibe la lipasa sensible a hormona y aumenta la liberación de insulina en las células beta (6,7); la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) caracterizada por regular la migración e infiltración de monocitos y macrófagos (8), en la obesidad promueve la formación de hígado graso no alcohólico (9); la proteína inducida por interferón gamma-10 (IP-10), se incrementa en obesidad y regula las respuestas inmunes a través de la activación y el reclutamiento de leucocitos , como las células T y los monocitos (10); la proteína de unión al retinol 4 (RBP4) conocida porque participa en los efectos de la adiposidad como lo es la resistencia insulínica y los desórdenes metabólicos que esta presenta (11).

Algunas interleucinas actúan en la obesidad, regulando el proceso inflamatorio producido por esta enfermedad. Dentro de este grupo se encuentra la interleucina-6 (IL-6) encargada de regular la respuesta inflamatoria, y participar en el proceso asociado con la resistencia a la insulina (3); la interleucina-1 β (IL-1 β) que inhibe la secreción de ácido gástrico en el organismo y se ve incrementada en la obesidad (12); interleucina-10 (IL-10) que inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias por linfocitos T y macrófagos; interleucina-8 (IL-8) que está incrementada en la obesidad, promoviendo enfermedades como aterosclerosis y diabetes (13); interleucina-12 (IL-12) que está relacionada con la disminución de la sensibilidad a insulina en ratones obesos, en humanos está fuertemente relacionado con el IMC, porcentaje de grasa, triglicéridos y con aumento de TNF- α (14).

Hay otras citocinas como, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que está relacionado con el aumento inflamatorio y es expresado de manera incrementada en enfermedades como la obesidad (3), promueve la resistencia a insulina (6); el interferón gamma (IFN- γ) producido principalmente en las células T, se encarga de mediar la actividad de

macrófagos y la resistencia a patógenos intracelulares (15), en la obesidad el incremento del tamaño y cantidad de adipocitos, fomenta la atracción de macrófagos promoviendo así la inflamación (16); la apelina que tiene un efecto vasodilatador por estimulación del óxido nítrico y vasoconstrictor por acción sobre la musculatura vascular, inhibe la secreción de la hormona antidiurética, aumenta el cortisol y suprime la hormona foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH) y tirotrópina (TSH) (6). Y el factor derivado del epitelio pigmentario, con actividad antioxidante y antiinflamatoria en leucocitos y plaquetas (3).

Desregulaciones hormonales también han sido identificadas en la obesidad. La adiponectina es una adipocina disminuida en esta enfermedad, que participa en la inhibición de las citocinas TNF- α e IL-6 y en la determinación de resistencia insulínica (1). La leptina participa en la regulación de la ingesta alimenticia y además dentro de sus funciones inmunes se encuentra la activación de macrófagos con liberación de IL-2, TNF- α , IL-4, MCP-1, y la proliferación de linfocitos T (1). La resistina, determina la resistencia a la insulina aumentando la concentración de AMP, también cumple función activando la liberación de citocinas IL-6 y TNF- α vía NF κ B (complejo proteico que participa en la transcripción de ADN) (1), por lo que su función es inflamatoria en obesidad. La adiposina, conocida también como factor de complemento D, que es sintetizado principalmente en los adipocitos, se encuentra elevada en obesidad y posee un sistema regulatorio dependiente de insulina y glucocorticoides (11). Al mismo tiempo que activa diferentes respuestas inflamatorias relacionadas con monocitos, neutrófilos y macrófagos (17).

Los efectos producidos por esta patología podrían estar controlados por los factores de transcripción denominados receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs), que regulan la expresión génica al activarse con diferentes ligandos como los

son ácidos grasos libres, eicosanoides, entre otros (18). Al ingresar al núcleo se unen al receptor X retinoide y se anclan a un segmento de ADN específico para estimular la expresión de genes diana (19). De esta forma, cuando se activan, participan en el control del proceso inflamatorio producido por la obesidad, mediante la regulación de la expresión de citocinas inflamatorias (20). Previniendo así el desarrollo de algunos desórdenes metabólicos como dislipidemia, problemas y diabetes mellitus tipo 2 (21).

Los tres isotipos de PPAR (α , β , γ) cumplen un papel fisiológico específico en el organismo dependiendo de su ubicación tisular. PPAR- γ es expresado esencialmente en el tejido graso y se encuentra implicado en el control del metabolismo e inflamación, participando en la regulación de los adipocitos e insulina siendo capaz de mejorar las vías involucradas en la obesidad (22, 23). PPAR- α es expresado en varios tejidos del cuerpo, como el tejido adiposo y el hígado, activándose cuando las condiciones energéticas son deficientes (24). A su vez, limita la expresión de citocinas proinflamatorias, siendo capaz de controlar el proceso inflamatorio (25). Regulando los macrófagos en condiciones homeostáticas del organismo (26). Por último, PPAR- β/δ es expresado predominantemente en el tejido graso y la piel, participa en el control homeostático de los lípidos (27,28). Así como también es fundamental para la regulación de alteraciones producidas por la obesidad, como la acumulación de grasa en el hígado, inflamación y lesión de células hepáticas (29). Es importante tener en cuenta que los tres subtipos pueden ser expresados en el mismo tejido participando de forma coordinada en el control inflamatorio del organismo (30).

Los tres isotipos de PPAR han sido ampliamente estudiados, encontrándose así que por ejemplo, PPAR- β es fundamental para la regulación de alteraciones producidas por la

obesidad, como la acumulación de grasa en el hígado, inflamación y lesión de células hepáticas. Sin embargo, no hay investigaciones más específicas sobre las funciones que pueden cumplir PPAR- β (29). De manera que casi todos los estudios se han enfocado en PPAR- α y PPAR- γ , en las que se sugiere que las concentraciones de PPAR- γ en sangre se encuentran bajas en niños con obesidad, en comparación con niños sanos (31). De manera que este se asocia con la disminución de masa corporal y el mejoramiento de la resistencia insulínica debido a que está relacionado con el aumento del número de mitocondrias que reducen la gluconeogénesis y lipogénesis en obesidad inducida (25).

La obesidad puede ser considerada crónica, recurrente y progresiva, lo que le otorga un alto nivel de riesgo en el mundo (32), por lo que es considerada una epidemia que afecta a la población en diferentes etapas de la vida (32). De esta manera, se ha convertido en un problema mayor, teniendo en cuenta que se altera el sistema inmune. Los niveles de leucocitos se encuentran en mayor concentración (33), promoviendo la inflamación en respuesta a los estímulos producidos por la obesidad, como consecuencia a la acción de las proteínas mencionadas anteriormente. Esta inflamación favorece el riesgo a desarrollar diferentes patologías como síndrome metabólico, aumentando hasta en un 50% su prevalencia en niños con obesidad severa e incluso provoca mayor riesgo de resistencia a la insulina (34). Que presenta una correlación positiva con el IMC en niños obesos (35). La obesidad aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiometabólicas por la acumulación de grasa subcutánea principalmente en el abdomen, u otras afecciones como diabetes, hipertensión, dislipedimas, enfermedad cardiovascular, disfunción hepática y respiratoria, y cáncer a temprana edad, aumentando así la tasa de mortalidad en la juventud (3, 32).

Los PPARs presentan una conexión metabólica con el sistema inmune por su alta capacidad antiinflamatoria. Muchos estudios realizados sobre las funciones de estos receptores se encuentran ligados a su participación en la regulación del desorden metabólico y la inflamación, convirtiéndose en moléculas de interés para patologías como la obesidad, postulándolos como posibles moduladores terapéuticos de esta enfermedad (36). Por su parte, los leucocitos son primordiales en la respuesta inmunológica y en procesos inflamatorios. Sin embargo, aún se desconoce con exactitud el papel que cumplen los PPARs en los leucocitos en individuos en condiciones de obesidad. En esta investigación se estableció la relación de los diferentes isotipos de PPAR en leucocitos de niños con obesidad con su respuesta inflamatoria. Este estudio fue desarrollado con la perspectiva de regular este proceso y evitar que a temprana edad se desarrollen enfermedades crónicas asociadas con el metabolismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación es un estudio observacional transversal de un grupo de 37 niños y adolescentes bogotanos con características de obesidad y peso estándar, los cuales participaron en el estudio teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- **Criterios inclusivos:** los participantes fueron seleccionados en un rango de edad entre 7 y 17 años con características de peso estándar (normopeso) y de obesidad. La obesidad fue definida teniendo en cuenta un índice de masa corporal con una desviación estándar $> +2$ (equivalencia en percentil 95) de acuerdo con la resolución N° 2465 del 14 de Junio del 2016 del Ministerio de Salud y Protección Social. Esto fue calculado para el percentil de edad y género, de acuerdo a los estándares de referencia para la clasificación antropométrica del estado nutricional de menores de 18 años. Todos los participantes entregaron aceptación del consentimiento informado del representante legal del menor para la participación en el estudio, con previo conocimiento acerca del diseño, compromisos y beneficios del estudio y el asentimiento del niño o adolescente. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de Revisión Institucional de la Universidad Antonio Nariño y el comité de Ética Médica de DEXA DIAB (CE-CC-00721).
- **Criterios exclusivos:** fueron excluidos del estudio aquellos participantes con peso mayor o igual a 100 kg, tratamiento farmacológico que altere su peso, perfil metabólico o los niveles de glicemia en sangre, padecer enfermedades como diabetes mellitus, causas secundarias de obesidad, enfermedad psiquiátrica, trastornos mentales, trastornos alimenticios, enfermedades cardiovasculares,

renales, hepáticas o incapacidad de realizar actividad física y niños sin adulto mayor como acompañante en las valoraciones.

Medición de variables bioquímicas, antropométricas y de composición corporal: a cada uno de los participantes del estudio se les midió parámetros antropométricos y metabólicos. Para las mediciones antropométricas se tuvieron en cuenta el peso corporal, altura, percentil del índice de masa corporal (IMC) a partir de una metodología previamente estandarizada (37). Se determinó la composición corporal, teniendo en cuenta el porcentaje de grasa de depósitos como brazo, tronco, pierna, androide y ginoide, mediante el uso de un dispositivo DEXA. De los parámetros bioquímicos se consideraron en estado basal las mediciones de glicemia, insulina, colesterol total, triglicéridos, Colesterol HDL, Colesterol LDL, No-HDL. Después de dos horas se suministró glucosa oral (1,75 g por cada kg de peso corporal) y se determinaron los niveles de glucosa, para determinar el índice de resistencia a la insulina. Cada uno de los parámetros bioquímicos fue determinado por un laboratorio clínico especializado.

Teniendo en cuenta lo anterior, fueron colectadas 2 muestras de sangre adicionales de aproximadamente 4 mL por cada participante, las cuales fueron procesadas para la obtención de suero y leucocitos. A partir de estas muestras fueron seleccionadas 37. Cada participante se escogió teniendo en cuenta la asistencia a los controles para la medición de sus parámetros completos, y la calidad de ARN obtenido, ya que de este depende el análisis de expresión génica. Por lo que en este trabajo partimos del suero obtenido y de leucocitos almacenados en trizol para la cuantificación de proteínas y PCR en tiempo real.

Extracción de suero: a partir de la muestra de sangre almacenada en un tubo Vacutainer sin anticoagulantes (tapa roja), se dejó coagular a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se retiró el coágulo centrifugando a 1000-2000 g durante 10 minutos con una centrifuga refrigerada. Posteriormente, se colectó el sobrenadante denominado suero, que fue transferido a un tubo de polipropileno usando una pipeta Pasteur. Finalmente, el suero se distribuyó en alícuotas de 0,5 mL, almacenándose a una temperatura de aproximadamente -20 °C.

Extracción de leucocitos: para la extracción de leucocitos se utilizaron tubos con anticoagulante, se les realizó spin y centrifugación a 800 g durante 5 minutos. Se preparó un tubo cónico de 15mL con 14mL de tampón de lisis de glóbulos rojos 1X (RBCL) para cada muestra. Después de la centrifugación, se transfirió la capa de glóbulos a los tubos con RBCL y se mezcló por inversión para dejar asentar a temperatura ambiente por 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, si la muestra se observaba turbia era necesario dejar asentar durante 5 minutos más. Se realizó spin en una centrífuga clínica a 800 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante sin perder el pellet celular, dejando un poco de líquido proporcional al tamaño del sedimento obtenido. Posterior a esto, se agregó 1 mL de trizol a cada tubo y por repipeteo se hizo lisis celular. Una vez se rompían todas las células, incluyendo los gránulos grandes, se transfirió la solución Trizol/células a tubos previamente marcados y se almacenaron a -80 °C para la extracción de ARN.

Extracción de ARN: las muestras de leucocitos almacenadas en trizol a -80 °C y obtenidas en los procesos mencionados previamente, fueron homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente. Posterior a esto, se adicionó cloroformo frío e incubaron a temperatura ambiente. Cada muestra fue centrifugada para obtener 3 fases:

fase inferior de fenol cloroformo, fase intermedia blanca de ADN y una fase superior incolora de ARN. La fase superior se extrajo con una micropipeta a un nuevo eppendorf libre de RNAsas para precipitar mediante la adición de isopropanol e incubación. La muestra fue centrifugada para obtener RNA en forma de pellet. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó con etanol utilizando un vortex para realizar centrifugación. El sobrenadante fue descartado, resuspendido en agua libre de RNAsas y disuelto por repipeteo para incubarlo durante 15 minutos en baño maría. Luego de este tiempo, se dividió en pequeñas alícuotas de 20µL mantenidas a -80 °C para utilizarlas más adelante.

La cantidad y pureza del ARN fue determinada por espectrofotometría teniendo en cuenta la absorbancia de la muestra en las longitudes de onda 260/280 y 260/230 empleando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 (Thermo Scientific). En adición, la calidad fue evaluada por medio de una electroforesis del ARN mediante el uso de un gel de agarosa 1.2%, en buffer MOPS 1X e Hydragreen 1 X. La electroforesis se llevó a cabo durante 40 minutos a 100 V. Finalizada la electroforesis el gel fue visualizado en un transiluminador UV.

Transcripción reversa:

Se realizó transcripción reversa a cada una de las muestras partiendo de 1 µg de ARN. La cantidad de ARN de cada muestra fue diluida en agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 10 µL. A cada dilución se le adicionó la mix compuesta de buffer RT, mezcla de dNTP, primers aleatorios, transcriptasa reversa MultiScribe, inhibidor de RNAsas y agua libre de nucleasas) de acuerdo a los volúmenes indicados según el fabricante (No. 4368813, applied biosystems). Se mezclaron 10 µL de master mix 2X RT y

10 μ L de la muestra de ARN en tubos individuales y posteriormente fueron homogeneizados. La síntesis de ADNc fue realizada en el termociclador Bio-Rad T100TM bajo las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C durante 5 minutos y finalmente 4°C.

Diseño primers: antes de realizar la PCR en tiempo real, fue necesario diseñar cada primer (forward y reverse) de los genes a utilizar. Mediante el uso del NCBI-gene se buscó el gen y la secuencia del transcrito de interés. Posteriormente, en primer-BLAST se adecuaron los parámetros específicos para seleccionar los primers más adecuados teniendo en cuenta: porcentaje de GC, tamaño entre 18 - 25 pb, temperatura de anillamiento entre 55 - 60 °C y tamaño de producto generado entre 50 - 110 pb. Los primers seleccionados en el paso anterior, fueron analizados en IDT-Oligo Analyzer, teniendo en cuenta los valores de ΔG que deben ser cercanos a ceros y, como máximo hasta -9 y -7 en el caso de la formación de dímeros y *hairpin*, respectivamente. Finalmente, en nucleotide-BLAST se confirmó que los primers no anillaran con ADN genómico para que fueran adecuados.

Tabla 1. Características de los primers.

Primer	Número de acceso	Cadena molde	Secuencia	Tm (°C)	Eficiencia (%)
PPAR- α	NC_000022.11	Forward	AGCTGTCACCACAGTAGCTTG	58	95,72
PPAR- α		Reverse	CAGAGTGGGCTTTCCGTGTC		
PPAR- γ	NC_000003.12	Forward	GGCATCCCCCTAAACTTCG	58	94,13
PPAR- γ		Reverse	TGGCTTCTTTCAAATCTGGTG		
PPAR- β	NC_000006.12	Forward	ACCAACGAGGGTCTGGAATG	58	96,72
PPAR- β		Reverse	AGCCTTGAAGCAGTCCTGTA		
PGK1	NC_000023 .11	Forward	CGGGTCGTTATGAGAGTCG	58	90,32
PGK1		Reverse	AATTTGATGCTTGGGACAGC		
YWHAZ	NC_000008 .11	Forward	CATCACTCAGCCCACTCAGG	58	96,53
YWHAZ		Reverse	ATGACTGGATGTTCTGCTGGCTC		

PCR en tiempo real: para evaluar la expresión génica de PPAR- α , PPAR- β y PPAR- γ se realizó PCR en tiempo real, empleando como genes endógenos PGK y YWHAZ. La determinación de la temperatura de anillamiento de cada uno de los genes evaluados fue optimizada por medio de gradientes de temperatura, teniendo en cuenta las temperaturas de anillamiento obtenidas en la herramienta de diseño de primers “Primer blast” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), mediante los valores de C_t y de la curva de disociación. Las temperaturas establecidas para cada gen se encuentran en la tabla 1.

Las reacciones fueron realizadas en el termociclador CFX96TM (Bio-Rad) y la mezcla SYBR Green. Se realizaron 40 ciclos que consistían en: desnaturalización (95°C durante 2 minutos), desnaturalización (95°C durante 15 segundos), anillamiento (específico para cada primer), y elongación (70°C durante 32 segundos). Al finalizar cada reacción se realizó una curva de disociación. Durante las corridas se incluyó un control negativo donde el ADNc se reemplazó por agua libre de RNAsas y un control positivo donde el gen de interés esté siendo expresado. La cuantificación de la expresión relativa de ARNm fue realizada utilizando del método $\Delta\Delta C_t$, teniendo en cuenta los niveles de ARN de los controles internos, a partir de la fluorescencia de cada gen, y las eficiencias de amplificación se determinaron mediante la ecuación (38):

$$E = 10^{(-1/pendiente)}$$

Esto permitió comparar la transcripción individual entre la muestra y el control, analizada por duplicado (38).

Kit multiplex de adipocinas y citocinas humanas: la evaluación de citocinas y adipocinas séricas de los participantes del estudio fue realizada mediante un inmunoensayo multiplex basado en perlas codificadas por fluorescencia (No. 40196, BioLegend) y mediante el uso del Citómetro de flujo (Accuri C6, BD). Este kit permite la cuantificación de 13 adipocinas y citocinas en forma simultánea (adiponectina, adiposina, RBP4, MCP-1, IL-1 β , IP-10, IL-10, IL-8, leptina, IL-6, IFN- γ , resistina, y TNF- α). El fundamento de esta técnica está basado en el tamaño e intensidad interna de fluorescencia en cada una de las perlas, las cuales están conjugadas con un anticuerpo específico y sirven para capturar un analito específico. Al mezclar las perlas e incubarlas con una muestra de analitos, cada analito se unirá a sus respectivas perlas. Posteriormente, se adiciona una mezcla de anticuerpos de detección biotinilados. Cada anticuerpo de detección en la mezcla se une a cada analito previamente unido a las perlas. Por último, se agregó estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que se une a los anticuerpos de detección biotinilados para proporcionar intensidades de señal fluorescentes en proporción a la cantidad de analitos unidos. El análisis fue realizado en el LEGENDplex™ data analysis software (versión 8.0), y los datos son presentados como la intensidad media de fluorescencia del reportero PE (MFI) en función de la concentración (pg/mL), teniendo en cuenta los límites de la curva estándar.

Análisis de datos y estadística: los análisis estadísticos se realizaron empleando el software GraphPad Prism, versión 5.0. Para determinar si los datos mostraban una distribución normal se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar las diferencias entre las diferentes condiciones, se empleó la prueba de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Finalmente, la relación de PPAR con el proceso inflamatorio en niños fue analizada aplicando la prueba de correlación de Spearman entre los niveles de

expresión del receptor nuclear PPAR- α y los niveles de citocinas, quimiocinas y adipocinas. De esta manera, todos los datos en este estudio se expresaron como la media \pm desviación estándar (S.D.). Valores con un $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, se analizaron las medidas antropométricas y bioquímicas de 19 niños con normopeso y 18 niños con obesidad (Tabla 2). En la tabla 3 se observan los valores de referencia para la edad de la población de estudio. Se evidenció en relación a la edad y a los niveles de colesterol LDL un comportamiento similar sin diferencias significativas entre los grupos. En cuanto que los niveles de colesterol HDL fueron significativamente mayores ($p=0,0077$) en el grupo control en comparación con el grupo con obesidad. Parámetros como el peso ($p=0,0002$), insulina basal ($p=0,0001$), IMC ($p=0,0001$) y HOMA ($p=0,0001$) mostraron en el grupo con obesidad valores significativamente mayores, indicando resistencia a insulina e hiperinsulinemia para este grupo (39). En relación con los niveles de triglicéridos, estos fueron significativamente mayores ($p=0,0001$) en pacientes obesos y podrían estar relacionados con una prevalencia a padecer problemas cardiometabólicos. Estos resultados concuerdan con el índice TG/HDL que también fue significativamente mayor ($p<0,0001$) en este grupo. El índice TG/HDL está asociado con un perfil lipídico aterogénico, riesgo de enfermedad coronaria y resistencia insulínica (40), lo cual corrobora el riesgo cardiovascular y la condición de IR en los participantes obesos. Respecto al colesterol LDL no presentó diferencias entre los grupos. Por último, los depósitos de grasa en brazo, pierna, tronco, androide y ginoide presentaron un porcentaje de grasa significativamente mayor ($p=<0,0001$) en el grupo con obesidad.

Tabla 2. Parámetros antropométricos y características metabólicas de niños y adolescentes obesos y con peso normal.*

	Control n= 19	Obesidad n= 18
Femenino	8	10
Masculino	11	8

Edad (años)	10,47 ± 2,87	11,33 ± 2,93
Tanner	2,88 ± 1,72	2,72 ± 1,32
Percentil IMC	49,92 ± 28,03	96,37 ± 8,50****
Peso (Kg)	35,33 ± 13,12	55,97 ± 14,40 **
Talla (cm)	139,83 ± 18,32	143,99 ± 12,32
% Grasa (brazo)	33,07 ± 9,44	45,91 ± 7,73 ****
% Grasa (pierna)	32,82 ± 7,74	44,41 ± 5,82 ****
% Grasa (tronco)	21,06 ± 8,95	42,9 ± 6,79 ****
% Grasa (androide)	18,58 ± 9,93	44,33 ± 7,53 ****
% Grasa (ginoide)	28,88 ± 8,21	44,68 ± 5,96 ****
Glicemia en ayunas (mg/dL)	87,61 ± 5,55	87,59 ± 6,25
2 horas de glucosa (mg/dL)	91,74 ± 13	94,23 ± 13,58
Insulina (mcU/mL)	7,77 ± 4,78	19,77 ± 8,02 ****
Triglicéridos (mg/dL)	76,48 ± 18,47	117,27 ± 31,64***
Colesterol HDL (md/dL)	50,34 ± 8,22	41,39 ± 9,51 **
Colesterol LDL (mg/dL)	84,55 ± 18,04	94,70 ± 20,67
HOMA-IR (puntuación)	1,50 ± 1,19	4,28 ± 1,72 ****
Índice TG/HDL	1,60 ± 0,61	3,02 ± 1,24 ****

*Los datos son expresados como la media ± desviación estándar. Percentil IMC = percentil del índice de masa corporal; HOMA-IR = modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; colesterol HDL = colesterol de lipoproteínas de alta densidad; Colesterol LDL = colesterol de lipoproteínas de baja densidad. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

Tabla 3. Valores de referencia de los parámetros antropométricos y bioquímicos.*

Parámetro	Nivel		
	Aceptable	Límite	Elevado
Insulina (mg/dL)	2,9 - 24,9	-	> 24,9
HOMA-IR	< 3,43	-	> 3,43
Glicemia en ayunas (mg/dL)	>100	-	< 126
2 horas de glucosa (mg/dL)	< 140	-	< 200
Colesterol total (mg/dL)	< 170	170 - 199	> 200
Colesterol LDL (mg/dL)	< 110	110 - 129	> 130
Colesterol HDL (mg/dL)	> 45	40 - 45	< 40
Trigliceridos (mg/dL)	< 90	90 - 130	> 130
Índice TG/HDL	<2,0	-	> 3,0

*Los valores de referencia de insulina e índice HOMA fueron obtenidos de estudios de estandarización de los niveles de insulina e índice HOMA en niños y adolescentes (41), los niveles de glicemia en pre y postprandial fueron tomados de ADA (American Diabetes Association) (42), los niveles de colesterol total, LDL-C, HDL-C, y triglicéridos fueron obtenidos de NCEP (National Cholesterol Education Program)(43). Finalmente, el índice TG/HDL fue tomado de el estudio de valores de referencia índice TG/HDL (33).

Para determinar inicialmente la presencia de transcritos de los tres isotipos de PPAR en las muestras empleadas, la expresión de cada isotipo fue analizada por qPCR. PPAR- α presentó una expresión relativa significativamente alta ($p= 0,0484$) en el grupo de pacientes control respecto al grupo de pacientes obesos, donde se observa una reducción del 50% en la expresión de este gen (Figura 1a). En contraste, PPAR- β no evidenció una expresión diferencial ($p=0,1358$) entre los grupos de estudio (Figura 1b). En obesidad, la expresión de este isotipo ha sido reportada previamente en la pulpa blanca del bazo (centro de proliferación de linfocitos) de ratas (44).

Por último, la expresión de PPAR- γ no fue detectada en leucocitos en ninguna de las muestras. Para corroborar este hallazgo, empleamos como control positivo ADNc de tejido adiposo, ya que este isotipo se encuentra presente principalmente en células adiposas. Esta muestra presentó una amplificación positiva con un valor de C_t de 30,1 y un único pico en la curva de disociación con una temperatura de 84,5 °C para este tejido, indicando que la reacción es específica y que PPAR- γ no muestra niveles detectables de transcritos en leucocitos (Figura 2). Sin embargo, este isotipo sí estaría relacionado con el sistema inmune, ya que se ha encontrado su expresión en macrófagos humanos ejerciendo un posible efecto antiinflamatorio (45).

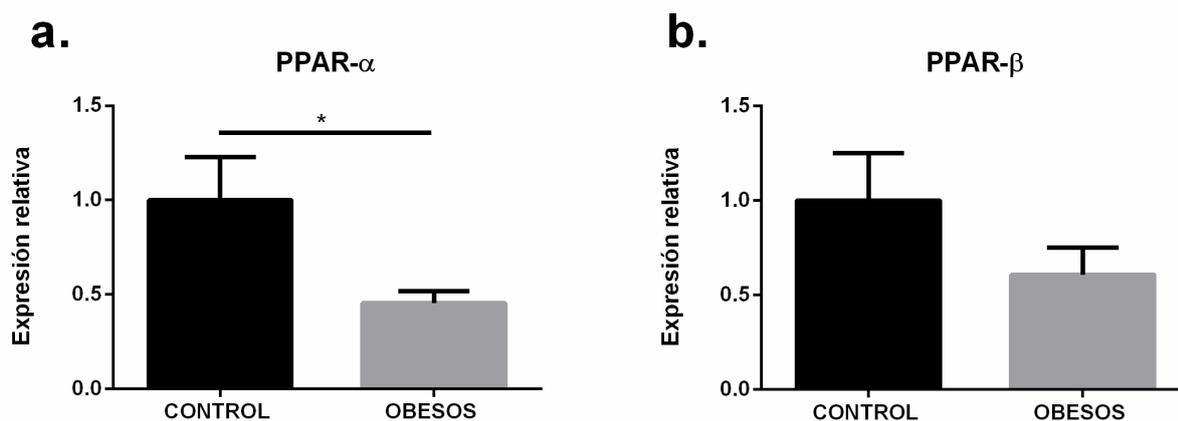


Figura 1. Expresión relativa de PPAR- α y PPAR- β en leucocitos. La expresión de PPAR- α y PPAR- β fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta$ CT. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen blanco y la media geométrica de dos genes constitutivos *PGK* y *YWHAZ*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de Mann Whitney. * $p < 0,05$.

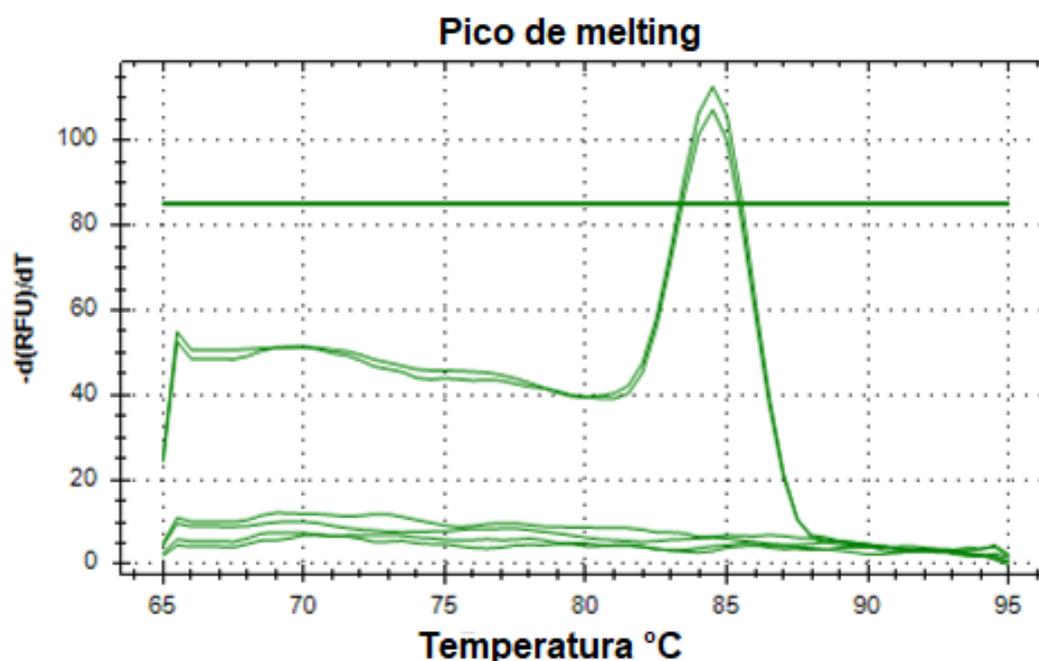


Figura 2. Curva de disociación de PPAR- γ en tejido adiposo y leucocitos. La expresión de PPAR- γ fue determinada por PCR en tiempo real en leucocitos y en tejido adiposo. Los valores son presentados como delta de unidades de fluorescencia relativa

en función de la temperatura en donde los picos representan el valor de la temperatura de disociación de PPAR- γ en tejido adiposo.

Posteriormente, se midieron los niveles en suero de citocinas, quimiocinas y adipocinas en los grupos de estudio mediante citometría de flujo. En la figura 3, se observan los resultados del grupo de citocinas analizadas, donde los participantes en condición de obesidad mostraron un incremento significativo en los niveles de IL-8 ($p= 0,0081$), IL-6 ($p= 0,0005$), TNF- α ($p= 0,0004$) e IFN- γ ($p= 0,0110$) en comparación con el grupo control.

La concentración de IL-8 fue de $319,3 \pm 159,6$ pg/mL en niños obesos y $205,7 \pm 141,3$ pg/mL en niños control (Figura 3a). IL-6 mostró una concentración de $67,8 \pm 70,9$ pg/mL en pacientes obesos y $17,1 \pm 24,4$ pg/mL en niños con normopeso (figura 3-b). En relación con el IFN- γ , esta citocina mostró concentraciones de 6.342 ± 3.883 pg/mL en los participantes obesos y 4.091 ± 2.547 pg/mL en participantes control (Figura 3c). Los niveles séricos de TNF- α fueron de $109,0 \pm 73,0$ pg/mL y $51,6 \pm 49,8$ pg/mL para el grupo con obesidad y control, respectivamente (Figura 3d). Por otro lado, la IL-10 no presentó diferencia significativa entre los grupos de estudio con concentraciones de $87,1 \pm 107,2$ pg/mL y $61,1 \pm 57,5$ pg/mL en participantes obesos y control, respectivamente (Figura 3e). Los niveles de IL-1 β también fueron evaluados, no obstante, fueron indetectables en todas las muestras analizadas.

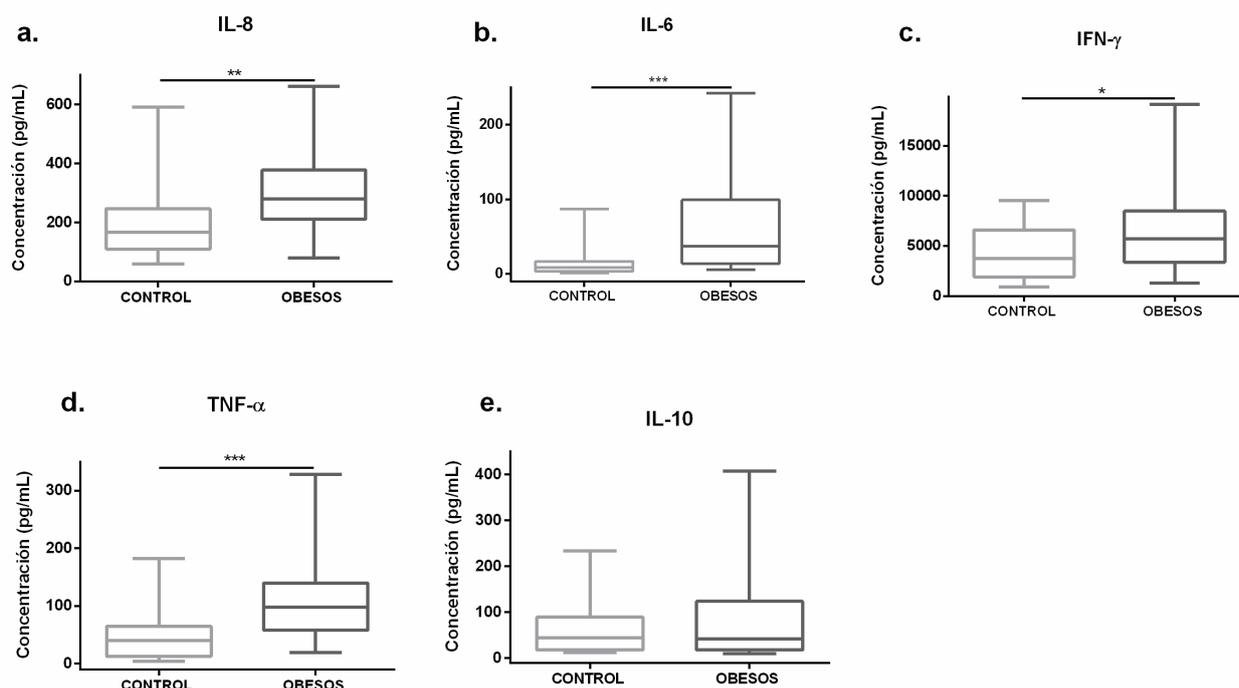


Figura 3. Concentración sérica de citocinas en niños y adolescentes con obesidad.

Los niveles de citocinas fueron medidos en suero preprandial por citometría de flujo mediante un inmunoensayo multiplex humano de inflamación. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba Mann Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

En la figura 4 se representan los resultados de las quimiocinas analizadas, encontrándose que el grupo de pacientes con obesidad presentó una concentración de MCP-1 significativamente alta ($p = 0,0452$), con concentraciones de 8.208 ± 5.398 pg/mL, en comparación con el grupo de participantes con normopeso, con niveles de $5,3 \pm 2,1$ pg/mL (Figura 4a). Mientras que IP-10 no presentó diferencias significativas ($p = 0,0543$) entre el grupo con obesidad y control con concentraciones de $1,8 \pm 1,6$ pg/mL y $2,6 \pm 2,1$ pg/mL, respectivamente (Figura 4b).

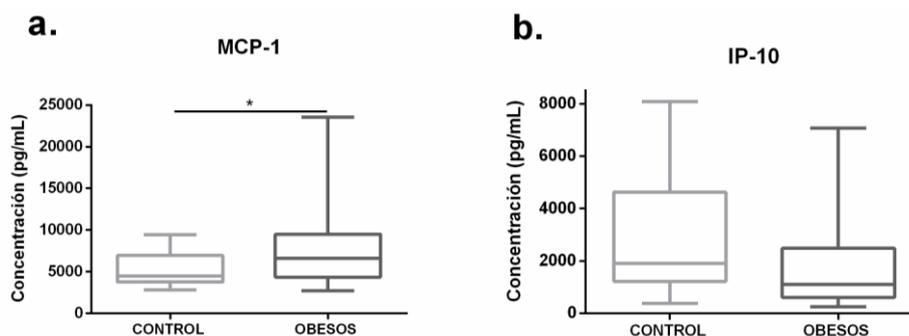


Figura 4. Concentración sérica de quimiocinas en niños y adolescentes con obesidad. Los niveles de quimiocinas fueron medidos en suero preprandial por citometría de flujo mediante un inmunoensayo multiplex humano de inflamación. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba Mann Whitney. * $p < 0,05$.

En relación con las adipocinas analizadas, la adiponectina presentó una concentración significativamente alta en el grupo control ($p = 0,0018$) con una concentración de 123.001 ± 91.876 pg/mL, respecto al grupo con obesidad que exhibió una concentración de 43.960 ± 30.211 pg/mL (Figura 5a). En contraste, la adiposina presentó una concentración de 17.761 ± 12.875 pg/mL en el grupo con obesidad, que fue significativamente mayor ($p = 0,0397$), respecto al grupo control, el cual ostentó una concentración de 7.688 ± 6.116 pg/mL (Figura 5b).

La resistina no ostentó una diferencia significativa entre los grupos de estudio, con concentraciones de 13.102 ± 8.342 pg/mL y 16.792 ± 8.302 pg/mL para los participantes obesos y control, respectivamente (Figura 5c). La leptina también fue analizada, sin embargo, presentó niveles considerablemente altos en el grupo con obesidad, que superaban las concentraciones determinadas en la curva de calibración, lo cual no permitió cuantificarla mediante el ensayo utilizado. Finalmente, el RBP4, no presentó concentración representativa en ninguno de los grupos de estudio, lo que

indica que en suero no es secretada en niveles detectables bajo las condiciones empleadas, como si ocurre en otros tejidos como el hepático.

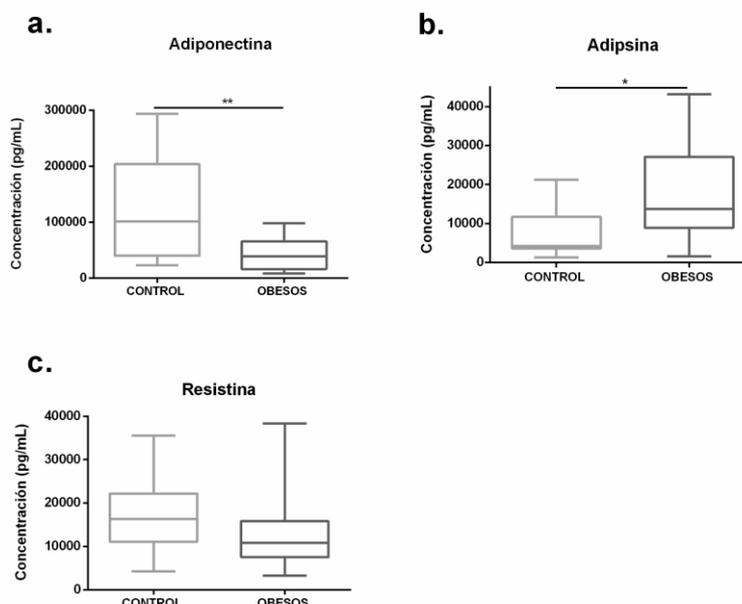


Figura 5. Concentración sérica de adipocinas en niños y adolescentes con obesidad. Los niveles de adipocinas fueron medidos en suero preprandial por citometría de flujo mediante un inmunoensayo multiplex humano de inflamación. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba Mann Whitney. * $p < 0,05$.

Finalmente se llevó a cabo la prueba de correlación Spearman para establecer la relación entre la expresión de PPAR- α y los niveles de citocinas, quimiocinas, adipocinas y parámetros antropométricos de niños en estado de obesidad. En la tabla 4 se observan los análisis obtenidos, en donde se encontró una correlación negativa (-0,58) estadísticamente significativa (0,03883) entre la expresión relativa de PPAR- α y los niveles de TNF- α en niños con obesidad. Sugiriendo un papel antiinflamatorio de este receptor, teniendo en cuenta la actividad inflamatoria que tiene TNF- α .

Tabla 4. Prueba de correlación entre la expresión de PPAR- α y la concentración de citocinas, hormonas y parámetros antropométricos y bioquímicos en niños con obesidad.

Variable	PPAR-α	p
Adiponectina	0,50	0,0623
Adipsina	0,07	0,8801
MCP-1	0,32	0,2050
IP-10	0,37	0,1443
IL-10	-0,13	0,6706
IL-8	0,23	0,3670
IL-6	-0,34	0,2762
IFN- γ	0,13	0,6187
Resistina	0,17	0,5090
TNF- α	-0,58	0,0383 *

La respuesta inflamatoria es un efecto fisiológico generado por el organismo, ante agresiones que pueden ser endógenas o exógenas. Una de las principales características de la obesidad es que presenta inflamación, proceso que se caracteriza por ser crónico y de baja intensidad (46). La inflamación está relacionada con la acción sistémica de algunas citocinas, adipocinas y quimiocinas que regulan este proceso en diferentes tejidos. En el presente trabajo se observó un perfil proinflamatorio en suero de pacientes con obesidad con un aumento significativo en los niveles de adipsina, MCP-1, IL-8, IL-6, IFN- γ y TNF- α . Mientras que en pacientes con normopeso se observaron niveles incrementados de la adipocina antiinflamatoria adiponectina. Moléculas como IP-10, IL-10 y resistina no manifestaron diferencia entre obesidad y control.

El IFN- γ aumenta la función de los macrófagos y las células T, permitiendo que estos puedan controlar agentes patógenos extraños (47). En la obesidad, la hipertrofia e hiperplasia provocada en los adipocitos genera reclutamiento de macrófagos en el tejido

graso (16), que estimulan la secreción de mayor cantidad de proteínas proinflamatorias como TNF- α , MCP-1, IL-6 e IL-12 (46). Proteínas que pueden promover diferentes problemas sistémicos, como resistencia insulínica, inflamación crónica y depósito de grasa hepática (48). En el presente trabajo, encontramos que su concentración fue significativamente mayor ($p= 0,0110$) en pacientes obesos, acompañado de niveles incrementados de TNF- α e IL-6, mostrando una correlación positiva (datos no mostrados) entre estas proteínas y soportando su papel inflamatorio en la obesidad.

Por otro lado, el IP-10 es una quimiocina producida en respuesta a la presencia de IFN- γ , con actividad proinflamatoria. Participa en enfermedades cardiovasculares cuando se presenta en concentraciones elevadas, y en algunos estudios muestra una correlación positiva con el IMC en personas mayores de 25 años (49). Sin embargo, un estudio realizado a partir de muestras de adipocitos humanos demostró que no hay una correlación entre IP-10 y el IMC (50). Nuestros resultados muestran concentraciones similares entre los grupos de estudio ($p= 0,0543$), confirmando que los niveles de IP-10 en suero no tienen relación (datos no mostrados) con el IMC de los niños estudiados.

MCP-1, es otra quimiocina que recluta monocitos y leucocitos en las zonas donde hay inflamación, aumenta la captación de LDL por monocitos, e inhibe la captura de glucosa dependiente de insulina al impedir la expresión del receptor GLUT4 (51). El exceso de MCP-1 conlleva a la acumulación de triglicéridos en el hígado (esteatosis), también conocido como hígado graso, el cual se considera que es provocado a causa de la resistencia insulínica (9). A su vez, esto conlleva a aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (51). Nosotros detectamos en el grupo de pacientes obesos un incremento significativo ($p= 0,0452$) en la concentración de MCP-1 en suero, lo cual coincide con un

aumento de triglicéridos (0,0001), índice aterogénico TG/HDL-c (<0,0001) y en el índice HOMA (<0,0001), apoyando su rol en procesos ateroscleróticos y en la resistencia insulínica

El TNF- α es capaz de disminuir la toma de ácidos grasos por los adipocitos, aumentándolos en la circulación, al mismo tiempo que inhibe la lipólisis (6). Estos ácidos grasos libres incrementan la liberación de glucosa desde el hígado (52). Así mismo, el TNF- α promueve la resistencia insulínica, el inhibir la vía de señalización del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) (48). Además, aumenta la producción de citocinas inflamatorias como la IL-6 y suprime la producción de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina (48). En este trabajo se encontró que la concentración de TNF- α fue significativamente mayor ($p= 0,0004$) en el grupo de pacientes obesos, lo cual muestra un comportamiento coherente con el elevado índice HOMA, los niveles incrementados de IL-6 y la disminución de adiponectina en el grupo obeso.

La adiponectina es una adipocina reconocida por su actividad antiinflamatoria y mejora de la sensibilidad a la insulina, mediante la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α e IL-6 (6). Además, cuando su concentración es baja se favorece la aterogénesis, con mayor probabilidad de infarto al miocardio (6), lo cual sugiere un riesgo cardiovascular temprano en niños y adolescentes con obesidad. Respecto a la IL-6, en la obesidad aumenta la lipogénesis hepática (48), que contribuye a un exceso de triglicéridos y masa grasa (53). Al mismo tiempo, es importante en la homeostasis energética, al actuar inhibiendo la lipoproteína lipasa para impedir la hidrólisis de triglicéridos y captación de ácidos grasos libres (48). También aumenta la inflamación crónica en la obesidad y la resistencia insulínica (48). Nosotros encontramos

una concentración significativamente mayor de IL-6 ($p= 0,0005$) en el grupo de pacientes obesos respecto al grupo control, y también niveles incrementados de triglicéridos e índice HOMA. Así mismo, se evidencia un incremento significativo ($p=<0,0001$) en el porcentaje de grasa de niños obesos en diferentes regiones como brazos, piernas, tronco, androide y ginoide (Tabla 2). En consecuencia, los niveles incrementados de IL-6 pueden también estar contribuyendo al desarrollo de insulinoresistencia y a un aumento en los depósitos de grasa corporales en población pediátrica con obesidad.

Otra interleucina analizada fue la IL-8, conocida por ser un importante marcador de inflamación mediante la estimulación y atracción de neutrófilos, que actúan directamente sobre las zonas inflamatorias, como por ejemplo en los adipocitos hipertrofiados (54). La hipertrofia adipocitaria se caracteriza por el aumento en tamaño y deterioro funcional de los adipocitos existentes, provocando expansión del tejido adiposo y activación de la respuesta inmune (55). Nosotros encontramos una concentración significativamente mayor de IL-8 ($p=0,0081$) en el grupo de pacientes obesos respecto al control. Adicionalmente, encontramos un aumento significativo ($p=<0,0001$) en el porcentaje de grasa de niños obesos en brazos, piernas, tronco, androide y ginoide. Estos hallazgos sugieren que la IL-8 favorece la inflamación en niños, generando expansión del tejido adiposo.

La IL-10 al contrario de las citocinas mencionadas anteriormente, cumple un papel antiinflamatorio en la obesidad al inhibir la producción de proteínas inflamatorias (6). Sin embargo, ésta citocina no presentó diferencias significativas ($p=0,0543$) entre los grupos de estudio. Es importante tener en cuenta que los niveles de IL-10 pueden variar dependiendo de la edad de los pacientes y el sexo (56). En este trabajo el rango de edad

de los participantes fue amplio y al categorizar de acuerdo a las variables sexo y edad no fue posible identificar diferencias en los niveles de esta citocina en los grupos de estudios. Adicionalmente, otro estudio encontró que IL-10 no tiene alguna correlación con variables antropométricas ni bioquímicas en adultos (57), de manera que es posible que en niños esta citocina tenga un comportamiento similar.

Dentro de las adipocinas estudiadas, la adiposina posee una actividad proinflamatoria al activar células del sistema inmune, también participa con la proteína estimuladora de acilación (ASP) en una vía común denominada vía adiposina–ASP. Esta vía media la captación y esterificación de ácidos grasos hidrolizados a partir de triglicéridos por acción de la lipoproteínlipasa (58). De manera que cuanto mayor sea la grasa corporal, habrá mayor concentración de adiposina. En la población estudiada, se presentó una concentración significativamente mayor ($p=0,0397$) de esta adipocina en el grupo de pacientes con obesidad. Coherentemente, el aumento en los niveles de adiposina en población pediátrica obesa también se vio acompañado por un aumento significativo ($p=<0,0001$) en el porcentaje de grasa, en depósitos como tronco, piernas, brazos, región androide y ginoide.

La resistina ha sido involucrada en la resistencia insulínica como consecuencia a la producción de glucosa hepática, al mismo tiempo que disminuye la captación de esta en los adipocitos e impide la diferenciación de los mioblastos para el desarrollo muscular en ratones (6). En humanos, esta es producida principalmente en macrófagos, contribuye a la resistencia a insulina y estimula la inflamación del tejido adiposo (59). En jóvenes entre 12 y 16 años se ha reportado una asociación positiva entre la concentración de esta adipocina y la grasa corporal (60). Sin embargo, aún no ha sido demostrada la relación de

los niveles de resistina circulantes con los problemas de obesidad en la infancia. En la población pediátrica evaluada no se encontró una diferencia significativa ($p= 0,0517$) entre el grupo control y obeso, pero considerando el amplio rango de edad utilizado no es posible descartar que esta adipocina varíe dependiendo de la edad y estado hormonal de los pacientes (60).

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son capaces de participar en el control del proceso inflamatorio producido por la obesidad (61), mediante la modulación de la expresión de citocinas proinflamatorias en tejido adiposo. Sin embargo, otros tejidos pueden contribuir al proceso inflamatorio. En este trabajo identificamos la expresión de PPAR- α y PPAR- β , pero no de PPAR- γ en leucocitos, indicando un rol de estos dos isotipos en la respuesta inmune.

PPAR- α participa en la oxidación de ácidos grasos y se ha demostrado que tiene un papel antiinflamatorio en tejido adiposo. Mediante su activación, utilizando agonistas, puede actuar inhibiendo la expresión de IL-6 y el rendimiento de citocinas inflamatorias como IL-2 y TNF- α (62). Teniendo en cuenta esto, al tener un rol antiinflamatorio se espera que haya una menor expresión de este isotipo en el grupo de pacientes con obesidad. De hecho, nosotros encontramos una expresión de PPAR- α dos veces mayor en el grupo control en comparación con el grupo con obesidad.

Por otro lado, se ha reportado una conexión entre los niveles de triglicéridos, esteatosis hepática, hipertrofia adipocitaria, y disminución en la expresión de PPAR- α en el hígado de ratones con obesidad inducida (63). Aunque no se han evaluado la expresión de este factor de transcripción en tejido sanguíneo, nuestros resultados muestran una expresión

de este factor de transcripción en leucocitos y además que su expresión se ve afectada por el estado de obesidad. La expresión aumentada de PPAR- α en el grupo control, sugiere una relación entre este isotipo y el incremento de aquellas proteínas antiinflamatorias. De manera que este podría regular el proceso inflamatorio producido por la obesidad al disminuir la concentración de aquellas proteínas inflamatorias que favorecen este proceso. A partir del análisis de correlación, se encontró que la expresión PPAR- α se relaciona negativamente con la concentración del TNF- α . De manera que este isotipo podría provocar la disminución de IL-6 y ácidos grasos circulantes, aumentando la sensibilidad a insulina y promoviendo la lipólisis. Convirtiéndose en el isotipo más adecuado para regular el proceso inflamatorio en la obesidad y a su vez repercutir en la hipertrofia del tejido adiposo.

El hecho de que PPAR- α presente menor expresión en leucocitos de niños y adolescentes con obesidad, lo convierte en el isotipo con mayor potencial para modular el proceso inflamatorio de niños obesos. El uso de agonistas para esta proteína permitiría su activación en leucocitos y una disminución en la concentración de citocinas, quimiocinas y hormonas que promueven la inflamación. En consecuencia, PPAR- α contribuiría a evitar el desarrollo de resistencia a insulina, problemas cardiovasculares y dislipidemia, asociados con la condición de obesidad.

Finalmente, aunque PPAR- β ha sido el isotipo menos explorado, estudios han encontrado que, al activarse, disminuye los niveles de triglicéridos en sangre e induce la expresión de genes relacionados con almacenamiento de lípidos y termogénesis (57). Este actúa principalmente en el tejido adiposo y contribuye al mejoramiento de la inflamación por obesidad, regulando la resistencia a insulina y mejorando la sensibilidad hacia esta, de

manera que podría actuar disminuyendo las proteínas que participan en este proceso como IL-6 y TNF- α (62). Sin embargo, PPAR- β no presentó diferencias significativas entre los grupos de estudio. Esto demuestra que a pesar de que este isotipo tenga efectos antiinflamatorios (64), en leucocitos la expresión de este gen no se relaciona con obesidad. Sin embargo, no es posible descartar diferencias en el estado de activación y por ende, en su participación en el proceso inflamatorio provocado en la obesidad, por lo que aún existe la incógnita de su función en este tipo de células.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de las muestras de sangre de niños y adolescentes entre 7 y 17 años con obesidad y normopeso, es posible concluir que:

- Los niños y adolescentes en estado de obesidad presentan un perfil pro-inflamatorio, evidenciado por el aumento de los niveles sericos de IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 y adiposina, y también una disminución de la adipocina anti-inflamatoria adiponectina. Este perfil sugiere una contribución al desarrollo de insulinoresistencia, riesgo cardiovascular e incremento en la acumulacion de grasa soportado por los niveles aumentados de trigliceridos, TG/HDL, porcentaje de grasa e indice HOMA.
- Los leucocitos expresan los isotipos α y β de los factores de transcripcion PPAR, y no muestran niveles detectables del isotipo γ , sugiriendo una participacion de PPAR- α y PPAR- β en procesos inmunologicos.
- La expresión reducida de PPAR- α en leucocitos de niños con obesidad indica una actividad anti-inflamatoria dismuida, lo cual esta asociado de manera inversa con los niveles de TNF- α séricos. Por lo que al activar la expresión de PPAR- α , se podría disminuir los efectos producidos por TNF- α , al mejorar la sensibilidad a insulina, lipólisis, aumentar adiponectina y disminuir IL-6.
- La disminución en la expresión de PPAR- α en leucocitos de niños con obesidad lo postula como un potencial blanco terapeutico para la modulación de la respuesta inflamatoria en la obesidad y por tanto, en las patologias asociadas a esta condición.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación (VCTI) de la Universidad Antonio Nariño (Proyecto 2018207). Agradezco la colaboración del grupo de investigación en Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas de la Facultad de Ciencias. A la profesora Mónica Losada Barragán que estuvo apoyandome desde el principio, me enseñó las técnicas necesarias para completar las partes de este trabajo y tuvo la paciencia necesaria para que todo saliera de la mejor manera. Aclaro mis dudas, corrigió mis errores y siempre me dio ánimo. Ella fue mi guía en este proceso tan extenso y a veces complicado. Por otro lado, a la Universidad Antonio Nariño por proporcionarme cada uno de los elementos necesarios, incluyendo equipos, espacio de trabajo y por apoyar mi proceso educativo. Finalmente quiero agradecer a mi familia y amigos, que también han acompañado mi proceso y me han apoyado en todo momento.

REFERENCIAS

1. Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez, J. C., López-Roa, R. I., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 67(2), 88-97.
2. WHO. Growth reference 5-19 year. 2007. Disponible en https://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/.
3. López, C. P. R., Torres, M. C. G., Salinas, C. A. A., & Medina, O. N. (2017). Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Investigación Clínica*, 58(2), 175-196.
4. Bermejo, E. A. E., Mercado, L. C. F., Egea, E. E., Sanandrés, N. S. P., del Toro Camargo, K. Y., Ordóñez, J., & de Egea, G. G. (2016). Asociación entre niveles séricos de vitamina D, respuesta IgE y variantes génicas del gen del receptor de la vitamina D en niños obesos del caribe colombianos: un estudio de casos y controles. *Medicina*, 38(2), 109-120
5. Yan, Q. W., Yang, Q., Mody, N., Graham, T. E., Hsu, C. H., Xu, Z., ... & Rosen, E. D. (2007). The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes*, 56(10), 2533-2540.
6. Gutiérrez-Ruiz, J., Velázquez-Paniagua, M., & Prieto-Gómez, B. (2011). El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Revista de endocrinología y nutrición*, 19(4), 154-162.
7. Sánchez-Muñoz, F., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F., & Cruz, M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta médica de México*, 141(6), 505-512.

8. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), 313-326.
9. Angelico, F., Del Ben, M., Conti, R., Francioso, S., Feole, K., Fiorello, S., & Violi, F. (2005). Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(3), 1578-1582.
10. Lee, E. Y., Lee, Z. H., & Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, 8(5), 379-383.
11. Kotnik, P., Fischer-Posovszky, P., & Wabitsch, M. (2011). RBP4: a controversial adipokine. *European journal of endocrinology*, 165(5), 703-711.
12. Garza-González, E., Bosques-Padilla, F. J., El-Omar, E., Hold, G., Tijerina-Menchaca, R., Maldonado-Garza, H. J., & Pérez-Pérez, G. I. (2005). Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *International journal of cancer*, 114(2), 237-241.
13. Kim, C. S., Park, H. S., Kawada, T., Kim, J. H., Lim, D., Hubbard, N. E., ... & Yu, R. (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *International journal of obesity*, 30(9), 1347-1355.
14. Suarez-Alvarez, K., Solis-Lozano, L., Leon-Cabrera, S., Gonzalez-Chavez, A., Gomez-Hernandez, G., Quinones-Alvarez, M. S., ... & Zavala-Castillo, J. C. (2013). Serum IL-12 is increased in Mexican obese subjects and associated with low-grade inflammation and obesity-related parameters. *Mediators of inflammation*, 2013.

15. Flynn, J. L., Chan, J., Triebold, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A., & Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*, 178(6), 2249-2254.
16. Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Catalán, V., & Frühbeck, G. (2008). Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Rev Esp Obesidad*, 6(5), 264-79.
17. Rodríguez Scull, L. E. (2004). La obesidad y sus consecuencias clinicometabólicas. *Revista Cubana de Endocrinología*, 15(3), 0-0.
18. Carvajal, K., de la Luz Hernández-Esquivel, M., & Moreno-Sánchez, R. (2007). PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *Archivos de Cardiología de México*, 77(S4), 66-76.
19. Michalik, L., Desvergne, B., Dreyer, C., Gavillet, M., Laurini, R. N., & Wahli, W. (2003). PPAR expression and function during vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology*, 46(1), 105-114.
20. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(4), 236.
21. Vallejo, R. G. (2019). Avances en terapias contra la obesidad: nuevos fármacos y dianas farmacológicas (trabajo de grado). Facultad de farmacia niversidad complutense, Madrid.
22. Fernandez, M. O., Sharma, S., Kim, S., Rickert, E., Hsueh, K., Hwang, V., & Webster, N. J. (2017). Obese neuronal PPAR γ knockout mice are leptin sensitive but show impaired glucose tolerance and

- fertility. *Endocrinology*, 158(1), 121-133.
- 23.** Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future cardiology*, 13(3), 259-278.
- 24.** Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future cardiology*, 13(3), 279-296.
- 25.** Veiga, F. M. S., Graus-Nunes, F., Rachid, T. L., Barreto, A. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Souza-Mello, V. (2017). Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. *Biochimie*, 140, 106-116.
- 26.** Manoharan, I., Suryawanshi, A., Hong, Y., Ranganathan, P., Shanmugam, A., Ahmad, S., & Thangaraju, M. (2016). Homeostatic PPAR α signaling limits inflammatory responses to commensal microbiota in the intestine. *The Journal of Immunology*, 196(11), 4739-4749.
- 27.** Peters, J. M., Hollingshead, H. E., & Gonzalez, F. J. (2008). Role of peroxisome-proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ) in gastrointestinal tract function and disease. *Clinical science*, 115(4), 107-127.
- 28.** Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review. *Nutrition journal*, 13(1), 17.
- 29.** Silva-Veiga, F. M., Rachid, T. L., de Oliveira, L., Graus-Nunes, F., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Souza-Mello, V. (2018). GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 474, 227-237.

- 30.** Polvani, S., Tarocchi, M., Tempesti, S., Bencini, L., & Galli, A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer: *World journal of gastroenterology*. 2016; 22(8), 2441-2459.
- 31.** Akyürek, N., Aycan, Z., Çetinkaya, S., Akyürek, Ö., Yılmaz Ağladioğlu, S., & Ertan, Ü. Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-gamma concentrations in childhood obesity: *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2013; 73(4), 355–360.
- 32.** Kyrou, I., Randeve, H. S., Tsigos, C., Kaltsas, G., & Weickert, M. O. (2018). Clinical problems caused by obesity. In *Endotext [Internet]*. MDText. com, Inc..
- 33.** Chen, S. B., Lee, Y. C., Ser, K. H., Chen, J. C., Chen, S. C., Hsieh, H. F., & Lee, W. J. (2009). Serum C-reactive protein and white blood cell count in morbidly obese surgical patients. *Obesity Surgery*, 19(4), 461-466.
- 34.** Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T. S., Tamborlane, W. V., Taksali, S. E., Yeckel, C. W., ... & Sherwin, R. S. (2004). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *New England journal of medicine*, 350(23), 2362-2374.
- 35.** Chang, C. J., Jian, D. Y., Lin, M. W., Zhao, J. Z., Ho, L. T., & Juan, C. C. (2015). Evidence in obese children: contribution of hyperlipidemia, obesity-inflammation, and insulin sensitivity. *PLoS One*, 10(5).
- 36.** Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53(1), 409-435.
- 37.** Lohman, T. G., Roche, A. F., & Martorell, R. (1988). *Anthropometric standardization reference manual* (Vol. 177, pp. 3-8). Champaign: Human kinetics books.
- 38.** Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of*

quantitative PCR, 1, 89-113.

39. Chiarpenello, J., Guardia, M., Pena, C., Baella, A., Riccobene, A., Fernández, L., & Strallnicoff, M. (2013). Complicaciones endocrinometabólicas de la obesidad en niños y adolescentes. *Rev Méd Rosario*, 79, 112-7.
40. Aguirre, M., Briceño, Y., Gómez-Pérez, R., Zerpa, Y., Camacho, N., & Paoli, M. (2018). Relación triglicéridos/colesterol de la lipoproteína de alta densidad como indicador de riesgo cardiometabólico en niños y adolescentes de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 65(2), 74–83.
41. Cuartero, B García, C García Lacalle, C Jiménez Lobo, and A González Vergaz. 2007. Índice HOMA y QUICKI , Insulina y Péptido C En Niños Sanos . Puntos de Corte de Riesgo Cardiovascular. *Anales de Pediatría* 66 (5): 481–90.
42. ADA. 2014. “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.” *Diabetes Care* 37 (SUPPL.1): 81–90.
43. NCEP. 1991. “National Cholesterol Education Program: Report of the Expert Panel on Population Strategies for Blood Cholesterol Reduction: Executive Summary. *Archives of Internal Medicine* 151 (6): 1071–84.
44. Braissant, O. L. I. V. I. E. R., Foufelle, F., Scotto, C. H. R. I. S. T. I. A. N., Dauça, M. I. C. H. E. L., & Wahli, W. A. L. T. E. R. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha,-beta, and-gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
45. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., ... & Brewer, H. B. (2001). PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature medicine*, 7(1), 53-58.

46. Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*.
47. Alwarawrah, Y., & MacIver, N. J. (2018). Immune Function in Obesity. In *Pediatric Obesity* (pp. 363-378). Humana Press, Cham
48. Rodríguez-Hernández, H., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Ramírez, G., & Reyes-Romero, M. A. (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *International journal of endocrinology*.
49. Herder, C., Baumert, J., Thorand, B., Koenig, W., De Jager, W., Meisinger, C., & Kolb, H. (2006). Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984–2002. *Diabetologia*, 49(5), 921.
50. Herder, C., Hauner, H., Kempf, K., Kolb, H., & Skurk, T. (2007). Constitutive and regulated expression and secretion of interferon- γ -inducible protein 10 (IP10/CXCL10) in human adipocytes. *International journal of obesity*, 31(3), 403-410.
51. Bastarrachea, R. A., López-Alvarenga, J. C., Bolado-García, V. E., Téllez-Mendoza, J., Laviada-Molina, H., & Comuzzie, A. G. (2007). Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta médica de México*, 143(6), 505-512.
52. Galgani, J., & Diaz, E. (2000). Obesity and fatty acids in the etiology of insulin resistance. *Revista medica de Chile*, 128(12), 1354-1360.
53. Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., & Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 282(1), E46-E51.

- 54.** Bickel, M. (1993). The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology*, 64(5 Suppl), 456-460.
- 55.** Remesh, A. M. B. I. L. I. (2013). Obesity: Pathophysiology and management-A pharmacological perspective. *Asian J Pharm Clin Res*, 6(1), 11-3.
- 56.** Tam, C. S., Garnett, S. P., Cowell, C. T., Heilbronn, L. K., Lee, J. W., Wong, M., & Baur, L. A. (2010). IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. *Hormone research in paediatrics*, 73(2), 128-134.
- 57.** Loria Kohen, V., Gómez Candela, C., Fernández Fernández, C., Zurita Rosa, L., Palma Milla, S., Urbieto, M., & Bermejo López, L. M. (2011). Parámetros hormonales e inflamatorios en un grupo de mujeres con sobrepeso/obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, 26(4), 884-889.
- 58.** Sniderman, A. D., & Cianflone, K. (1994). The adiponin-ASP pathway and regulation of adipocyte function. *Annals of medicine*, 26(6), 389-393.
- 59.** Qatanani, M., Szwegold, N. R., Greaves, D. R., Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2009). Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), 531-539.
- 60.** Moreno, L. O., Segura, C. G., & Guillén, L. S. (2014). *Relación de los niveles de resistina y de sus variantes gnéticas con parámetros metabólicos en niños* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- 61.** Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases: *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2011; 2(4), 236-240.
- 62.** Carvajal, K., de la Luz Hernández-Esquivel, M., & Moreno-Sánchez, R. (2007).

PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *Archivos de Cardiología de México*, 77(S4), 66-76.

63. D'Angelo Carlo Magliano, T. C., Bargut, L., de Carvalho, S. N., Aguilá, M. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Souza-Mello, V. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One*, 8(5).
64. Bishop-Bailey, D., & Bystrom, J. (2009). Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(2), 141–150.

Documento realizado por: Alicia Romero
Modificado por: Diana Martínez Pachón
2019-II