

# **Diferencias de los adipocitos entre personas normales y personas obesas.**

**Alejandra M. Jerez V**

**Universidad del Valle  
Facultad de Salud  
Cali, octubre 17 de 2015**



# **Diferencias de los adipocitos entre personas normales y personas obesas.**

(Estudio Omega- Financiación por Colciencias).

**Alejandra M. Jerez V MD.**

Estudiante de Maestría en Ciencias  
Biomédicas.

Tesis dirigida por el Dr. Oscar Gutierrez.

**Universidad del Valle  
Facultad de Salud  
Cali, octubre 17 de 2015**



**A MIS PADRES, HERMANOS Y SERES QUERIDOS POR SU APOYO, AMIGOS Y EN ESPECIAL A MI QUERIDO PROFE... OSCAR GUTIERREZ, POR SU FE EN MI Y SUS ENSEÑANZAS.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Valle, Laboratorio In Vitro, a Jaime Muñoz por sus enseñanzas y paciencia, a mis profesores y compañeros. A COLCIENCIAS por su patrocinio y a la Fundación Cardiovascular de Colombia, en especial al Dr. Marcos López.

## CONTENIDO

	PAG
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEORICO	8
OBJETIVOS	15
METODOLOGIA	
- Captación de pacientes	16
- Toma de muestras	17
- Proceso de extracción, cultivo, tratamiento y preservación de los adipocitos	18
- Reto	19
- Medición de adipocinas, citocinas y función Mitocondrial	19
- Manejo de datos	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

## RESUMEN

El adipocito es una célula muy activa con una función endocrina importante, producir sustancias llamadas adipocinas que intervienen en la regulación del metabolismo, en funciones inmunológicas, hormonales, reproductivas, etc, La producción de estas hormonas, están directamente influenciado por la cantidad de tejido adiposo visceral y subcutáneo, siendo más activo en la producción de estas sustancias el tejido visceral; por esta razón determinar obesidad central por medio de perímetro de cintura da una visión más acertada sobre el comportamiento del adipocito en la producción de adipocinas y su influencia sobre los diferentes aspectos metabólicos. Este trabajo describió el comportamiento metabólico del adipocito en una población de pacientes que se les practicó cirugía laparoscópica abdominal programada en 2 instituciones de la ciudad de Cali, divididos en 3 grupos, grupo 1: pacientes no obesos por IMC y perímetro de cintura, grupo 2: pacientes con diagnóstico de obesidad pero sin comorbilidad asociada; grupo 3: pacientes con obesidad y comorbilidad (HTA y/o DM tipo 2 y/o dislipidemia) y tratamiento farmacológico (Biguanidas y Estatinas. Se evidenció diferencias en el comportamiento del adipocito en personas no obesas y personas con obesidad y adicionalmente, se encontró una modulación en la producción de citocinas inflamatorias y función mitocondrial en el grupo con obesidad con comorbilidad y tratamiento farmacológico y se observó una asociación entre el uso de estos fármacos y disminución de la respuesta inflamatoria.

## INTRODUCCION

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) en su reporte de 2008, en el mundo hay aproximadamente 1400 millones de personas adultas con sobrepeso, de las cuales, 200 millones de hombres y 300 millones de mujeres presenta obesidad, pero lo más alarmante, es la expectativa que se tenía con población infantil para el 2010 con 40 millones de niños menores de 5 años con sobrepeso. La obesidad no tiene distinción de género, ubicación geográfica, edad, condición económica, todos los países con altos o bajos ingresos padecen esta epidemia, solo que se ve más reflejado en los países de mayores ingresos, por la facilidad de adquisición. Estados Unidos presenta un problema de salud pública, con una población de más de 40 millones de personas en situación de obesidad y en América Latina, México es quien muestra la problemática en todo su esplendor, lo más preocupante es la población infantil que padece esta condición y va en aumento. Colombia no se queda atrás, aunque no presenta este problema como México pero las cifras van en aumento y la manifestación de las consecuencias de esta condición no se hace esperar. En Colombia se realizó en el 2010 una Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (Ensin), donde muestra un aumento de la población en condición de obesidad, donde los hombres son los que presentan más esta condición. La encuesta se realizó en 258 municipios de Colombia y se pudo estimar la prevalencia de los principales problemas nutricionales con el objetivo de desarrollar políticas adecuadas para la intervención de dichos problemas<sup>24</sup>.

La relación de obesidad y Enfermedad Cardiovascular se ha demostrado en diversos estudios entre los cuales uno clásico como el Estudio Framingham<sup>3</sup>, en donde se relaciona el aumento de IMC con aumento del riesgo cardiovascular, sin embargo, esta asociación no es suficiente como lo demuestran estudios posteriores, donde describen el comportamiento metabólico del adipocito visceral y el adipocito subcutáneo, los cuales son diferentes en la producción de adipocinas y su efecto sobre el riesgo cardiovascular.<sup>6,16</sup> Estos estudios llevó a la importancia de la obesidad central, la cual se puede determinar por medio de una medida indirecta como es el perímetro de cintura, que nos da una idea sobre la cantidad de adipocitos que rodean los órganos<sup>4</sup>. El adipocito visceral está relacionado con la producción de más sustancias pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otros, los cuales están relacionados con el mantenimiento del estado inflamatorio sistémico de bajo grado<sup>6</sup> y este estado es el que se encuentra relacionado con aumento en el riesgo de presentar eventos cardiovasculares y Diabetes Mellitus tipo 2, cáncer y otras patologías.<sup>10,11</sup>

## MARCO TEORICO

La obesidad es un trastorno metabólico crónico, de causas multifactoriales (genéticas, ambientales), caracterizado por acumulación excesiva de tejido adiposo (tejido adiposo subcutáneo y visceral). La causa principal de este trastorno es el desequilibrio energético, donde las calorías consumidas superan el gasto calórico y se deben a diversos factores como una ingesta rica de alimentos hipercalóricos (grasas, azúcares, etc.), sedentarismo, predisposición genética (metabolismo de ahorro), medicamentos, patologías asociadas, entre otras causas<sup>1,12</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), da el concepto de obesidad como una acumulación excesiva o anormal de grasa y se determina clínicamente por el Índice de masa corporal ( $IMC = \text{peso en Kilogramos}/(\text{estatura en metros})^2$ )  $\geq 30$ <sup>1,2</sup>, aunque este parámetro nos da una idea, pero se queda limitada la definición, porque hay casos en los que no se puede hacer aplicación de dicho parámetro, por ejemplo, una persona fisicoculturista, donde su IMC es alto pero no es un indicador acertado de tejido adiposo, solo sería un IMC a expensas de tejido muscular y no estaría acorde con la definición de obesidad, por lo tanto, existen otros indicadores utilizados para determinar obesidad central como el perímetro de cintura el cual se mide la circunferencia a nivel de ombligo, en donde una cintura  $\geq 88$  cm en mujeres y  $\geq 102$  cm en hombres se ha asociado con un incremento del riesgo de Enfermedad Cardiovascular (ECV)<sup>1,5,7</sup>. IDF (Internacional Diabetes Federación), propone para el diagnóstico de Síndrome Metabólico en Latinoamérica otras medidas para el Perímetro de cintura, debido a las diferencias en las medidas antropométricas de la población caucásica, siendo la población latinoamericana más semejante a los asiáticos, disminuyendo las medidas dadas por el ATP III y muestran para hombres de  $\geq 90$  cm y para mujeres  $\geq 80$  cm como la medida de partida para riesgo cardiovascular y dar diagnóstico de obesidad central<sup>21</sup>.

Los problemas asociados a la obesidad van desde aumento del riesgo cardiovascular, cáncer (cáncer de mama y colorrectal)<sup>17,18</sup>, defectos en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos (Diabetes Mellitus tipo 2, Resistencia a la insulina, Dislipidemia), trastornos musculoesqueléticos, infertilidad, entre otros<sup>13,14,15,19,20</sup>.



## TEJIDO ADIPOSO:

Está compuesto por adipocitos maduros, pre-adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, mastocitos, macrófagos, etc y su función hasta hace unos años se consideraba solo un tejido de almacenaje de triglicéridos, pero en la actualidad este concepto hay cambiado totalmente y se conoce al tejido adiposo como un tejido muy activo, es un órgano endocrino, productor de diversas sustancias que tienen efecto sobre el metabolismo, función inmunológica, apetito, etc. Las sustancias producidas por este tejido se encuentran: Interleucinas como IL-6, IL-1B, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), angiotensina II, Angiotensinógeno, factores de crecimiento, entre otras, además de adipocinas como por ejemplo: resistina, leptina, adiponectina, etc <sup>25</sup>, estas sustancias producidas tiene acción sobre el sistema nervioso central (mesencéfalo, cerebelo, otras) y modulan funciones como el apetito, el gasto energético y actúan sobre otros órganos como páncreas, músculos , entre otros.<sup>51</sup>

En condiciones de desbalance energético, donde hay poco gasto y más almacenaje, se produce cambios en el tamaño del adipocito (hipertrofia) y en el número de células (hiperplasia), aumentando el riesgo de mayor acumulación ectópica del tejido. Así como aumenta el tamaño y el número de células, aumenta la funcionalidad, con mayor liberación de citocinas pro-inflamatorias y adipocinas que modifican el metabolismo y adicionalmente hay infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, lo cual refuerza la producción de sustancias inflamatorias<sup>26</sup>, creando un estado inflamatorio crónico de bajo grado.

Los mecanismos por los cuales el tejido adiposo se hipertrofia y/o hiperplasia no están bien dilucidados, solo se ha observado que en presencia de altos niveles de insulina y corticoesteroides se presenta un aumento en la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos maduros. Adicionalmente se ha visto la relación de algunos factores de crecimiento como por ejemplo Factor de crecimiento insulinoide (IGF)-1, hormonas como la de crecimiento y la hormona tiroidea, que en estudios in vitro, han demostrado su actividad sobre el adipocito, produciendo una diferenciación más rápida y notoria de los preadipocitos a adipocitos maduros. Otro punto a resaltar son los factores de transcripción que influyen en la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros como por el ejemplo PPAR- $\gamma$  (Receptor gamma proliferador de peroxisoma activado) receptor nuclear que afecta al adipocito en su tamaño, proliferación y redistribución<sup>27</sup>.

El aumento de interleucinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, contribuyen al estado de inflamación crónica subclínica, estimulando al hígado a la producción de Proteína C reactiva (PCR), la cual está asociada a cambios en la señalización celular, afectando funcionalidad de receptores de insulina y Leptina, y por lo tanto

afecta a diversas vías metabólicas y trayendo consigo las consecuencias como resistencia a la insulina y resistencia a la leptina.

Las principales adipocinas o sustancias producidas por el adipocito son:

#### ADIPONECTINA:

Es una proteína de 244 aminoácidos y un peso molecular de 30 KDa, es una proteína formada por una porción globular y otra de colágeno (la porción globular es muy semejante a la estructura del TNF- $\alpha$ ). Su función es modular diversos procesos como por ejemplo el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y respuesta del receptor de insulina, adicionalmente se ha encontrado una relación directa en procesos antiinflamatorios y antiteratogénicos y resistencia a la insulina.

La adiponectina para que tenga su funcionalidad biológica, debe estar debidamente hidroxilada y glicosilada, lo cual trae como consecuencia diferentes isoformas de esta proteína. Adicionalmente, los receptores responsables de la actividad son los AdipoR1 (localizado especialmente en músculo esquelético) y AdipoR2 (localizado especialmente en hígado), estos son acoplados a proteínas G y según su ubicación tienen participación en diversas funciones.

Estudios con ratones knockout AdipoR1/R2, muestran la participación de la adiponectina en la respuesta de los receptores de insulina, ya que estos ratones manipulados genéticamente al no presentar acción de los receptores de adiponectina, presentan resistencia a la insulina y en otros estudios lo que provocaron fue una sobreexpresión de dichos receptores, obteniendo como respuesta una mejoría en el metabolismo de la glucosa<sup>28</sup>.

La relación es inversa entre los niveles de Adiponectina y el Índice de Masa Corporal (IMC), por lo tanto en obesidad, se encuentran niveles bajos, y hay una relación a niveles bajos de esta adipocina, se presenta mecanismos de resistencia a la insulina y aterosclerosis e inflamación<sup>28</sup>.

Los niveles normales de adiponectina en sangre se encuentra entre 5-10  $\mu\text{g/mL}$ , pero este nivel puede variar por factores como por ejemplo (sexo, edad, presencia de enfermedades cardiovasculares, obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2, entre otras). Según estudios en cultivos de adipocitos viscerales y subcutáneos, se disminuye la producción de Adiponectina más en adipocitos viscerales que en subcutáneos y parece estar ligado con la producción de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), teniendo una relación inhibitoria en la producción de adiponectina.

La adiponectina está relacionada con algunos mecanismos que pueden explicar la pérdida de sensibilidad a la insulina. El efecto de esta adipocina a niveles normales está involucrado en varios aspectos metabólicos, como por ejemplo la activación de los receptores PPAR- $\alpha$ , que participan en procesos de oxidación de ácidos grasos, producción de moléculas transportadoras de ácidos grasos reflejándose esta actividad con una disminución de triglicéridos en hígado y músculo esquelético y especialmente en la modulación de la señal de insulina, mejorando la sensibilidad de la misma; así que, cuando existe disminución de los niveles de Adiponectina, se ven afectadas todas estas rutas metabólicas por lo cual se traduce en pérdida a la sensibilidad a la insulina, obesidad, dislipidemia, estado de inflamación subclínico crónico y patologías como Diabetes Mellitus y enfermedad cardiovascular<sup>29,30</sup>.

#### LEPTINA:

Proteína de 146 aminoácidos, con un peso molecular de 16 KDa, producida principalmente por los adipocitos y su producción depende de la cantidad de los mismos. Los niveles en sangre en una persona sana se encuentran en el rango de 5 a 10 ng/mL y en personas con obesidad pueden llegar hasta 100 ng/mL, pero también es secretada por otros tejidos como por ejemplo, placenta, glándula mamaria, hipotálamo, ovarios, testículos, estomago, entre otros<sup>36</sup>. Esta adipocina está implicada en la regulación del gasto energético y la saciedad<sup>31</sup>, sus receptores se encuentran ubicados en el hipotálamo y tallo cerebral controlando apetito, funciones neuroendocrinas y gasto energético. En obesidad los niveles de leptina tiende a aumentar, lo que ocasionaría según sus efectos, disminución del apetito y gasto energético alto, pero lo que se observa es lo contrario, lo que nos demuestra una resistencia y una muy baja funcionalidad de la misma<sup>32</sup>, además se aprecia un aumento de la actividad simpática y una de las manifestaciones es el aumento de la resistencia periférica<sup>33</sup>.

En obesidad, como se mencionó anteriormente, se relaciona con un estado inflamatorio crónico y se encuentran reactante de fase aguda aumentados como por ejemplo la proteína C reactiva, esta proteína al parecer se une a la leptina impidiendo su señalización y su función y esta es una de las causas por las cuales en obesidad se puede encontrar personas con niveles de leptina altos y sin modificación en el apetito y bajo consumo energético. Otras de la causas que se sugieren para la resistencia a la leptina, es que cuando esta llega a niveles altos es posible que se presente una saturación en el transporte en sangre y sobre todo

su paso al sistema nervioso central y donde se encuentra una gran cantidad de receptores a nivel de hipotálamo, por lo tanto, sus efectos se verían afectados o los receptores presentan cambios que no permiten la funcionalidad de los mismos, lo que daría como resultado aumento de peso por pérdida del control del apetito y disminución del gasto energético<sup>34</sup>.

Los receptores de Leptina ObRa y ObRb, están presentes en el sistema nervioso central a nivel de hipotálamo, logrando regulación metabólica. Se conocen seis isoformas de receptor, aunque el único activo ObRb son muy semejantes estructuralmente a las citocinas (sistema JAK2-STAT3 – Tirosina cinasa)<sup>37</sup>. En el sistema nervioso central se encuentran el mayor número de receptores ObRb localizados en varios núcleos del hipotálamo como los núcleos arcuado, paraventricular, los ventromediales y dorsomediales, los cuales tienen como función el control del apetito y el gasto energético.

Los niveles de leptina en sangre varían según las condiciones del individuo como por ejemplo procesos infecciosos o inflamatorios donde se aumentan citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1, los cuales estimulan la producción de Leptina, por lo que se caracteriza estados de anorexia y de mayor consumo de energía, pero en estados de estrés o de ejercicio intenso, se observa disminución de los niveles de Leptina, por lo que aumenta el apetito para compensar el alto consumo energético<sup>42</sup>.

La relación entre la leptina y la insulina, es una relación que ha causado mucha curiosidad, ya que en los pacientes obesos con alteraciones del metabolismo de los carbohidratos se encuentran afectadas ambas señales. Ambas hormonas se regulan mutuamente, se ha observado que el aumento de los niveles de leptina en sangre inhibe a las células beta del páncreas en la producción de insulina y por el contrario, los niveles altos de insulina, afectan al adipocito, estimulando la producción de leptina.<sup>42</sup>

#### RESISTINA:

Adipocina formada por 108 aminoácidos en el humano, rica en cisteína e identificada por primera vez en ratones obesos. Tanto en humanos como en ratones, los niveles en sangre aumentan en presencia de obesidad y adicionalmente, se ha encontrado en otros tejidos como por ejemplo, placenta, estómago, glándula tiroidea, timo, útero, entre otros.

En humanos se ha identificado una mayor expresión en tejido adiposo blanco que en el pardo y además es expresada por los macrófagos. Esta adipocina se relaciona con las complicaciones de la obesidad favoreciendo el estado inflamatorio crónico subclínico y es determinante en el mecanismo de resistencia a la insulina<sup>35</sup>.

#### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ ):

Citocina que se caracteriza por ser un marcador inflamatorio asociado a obesidad y factor de riesgo cardiovascular, es una proteína transmembranal no glicosidada con un peso molecular de 26 kDa. Tiene 2 tipos de receptores (tipo 1 y 2), que se expresan en diferentes tejidos como por ejemplo, el adipocito<sup>36</sup>. Esta citocina es secretada por monocitos, macrófagos (especialmente), linfocitos T y B, células NK, polimorfonucleares, y los mismos adipocitos, además está involucrada en varios procesos (inflamación, apoptosis, resistencia a la insulina, entre otros)<sup>36</sup>. En las personas con obesidad, en donde existe aumento del tejido adiposo e invasión de macrófagos a este tejido, se ha observado en diferentes trabajos el aumento de los niveles de FNT- $\alpha$ , tanto los niveles séricos como la expresión mRNA en tejido adiposo<sup>37</sup> y su relación con la resistencia a la insulina, a través de su efecto sobre el receptor de insulina, produciendo inhibición de IRS-1, evitando la fosforilación en el residuo de tirosina, disminuyendo o parando la señalización celular, con lo cual da como producto resistencia a la insulina<sup>38</sup>.

#### IL-6:

Citocina sintetizada por varias células del sistema inmunológico, tejido adiposo, fibroblastos, entre otros. Sintetizada como producto de la respuesta inflamatoria y estrés. Se ha observado un aumento de las concentraciones de esta citocina en personas obesas, al parecer su síntesis, se debe en una gran parte al tejido adiposo, por lo tanto es una relación directa en cantidad de tejido adiposo y la concentración de IL-6. Se ha observado que el aumento de TNF- $\alpha$ , aumenta hasta unas 60 veces la concentración de IL-6 en cultivos in vitro de adipocitos y se han reportado en estudios la relación directa del aumento del TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>39</sup>.

#### IL-1 $\beta$ :

Citocina secretada por el tejido adiposo y el sistema inmunológico, es una proteína de 17 kDa y se secreta en respuesta a inflamación y respuesta inmunológica. se

ha relacionado con disfunción y muerte de las células beta del páncreas, ya que activa diversas vías para la producción de resistencia a la insulina y vías apoptóticas<sup>40,41</sup>.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la producción de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ) y adipocinas (Leptina, Adiponectina, Resistina) y función mitocondrial en adipocitos viscerales cultivados in vitro, provenientes de pacientes sin diagnóstico de obesidad y obesidad sin comorbilidad y obesidad asociado a comorbilidad y tratamiento farmacológico.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Describir las características clínicas de un grupo de pacientes sin diagnóstico de obesidad, Obesidad sin comorbilidad y obesidad asociado a comorbilidad y tratamiento farmacológico.
- Evaluar la función mitocondrial y la liberación de adipocinas (Leptina, Adiponectina, Resistina) y citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ) en pre-adipocitos viscerales cultivados, provenientes de pacientes sin diagnóstico de obesidad, Obesidad sin comorbilidad y obesidad asociado a comorbilidad y tratamiento farmacológico.
- Cuantificar la producción y liberación de adipocinas (Leptina, Adiponectina) y citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ) en pre-adipocitos viscerales cultivados en un medio rico en glucosa provenientes de pacientes sin diagnóstico de obesidad, Obesidad sin comorbilidad y obesidad asociado a comorbilidad y tratamiento farmacológico.

## **METODOLOGIA**

### **- Captación de pacientes:**

Se convocaron pacientes en la consulta pre-quirúrgica y se les invitó a participar en el proyecto, se les explicó claramente los criterios, 14 no aceptaron participar, 8 se descartaron por no cumplir con los criterios de inclusión y 5 por cambios en la cirugía, por patologías asociadas y complicaciones pre-operatorias.

Se realizó un estudio experimental que incluía pacientes no obesos, pacientes obesos sin comorbilidad asociada y pacientes obesos con comorbilidad (Hipertensión arterial y/o Diabetes Mellitus tipo 2 y/o dislipidemia) y tratamiento farmacológico. Se denominó obesidad a los pacientes que presentaron un  $IMC \geq 30$  y un perímetro abdominal  $\geq 80$  para mujeres y  $\geq 90$  para hombres, y sometidos a cirugía laparoscópica abdominal en la clínica Rey David y Clínica de los Remedios de Cali.

La selección de la población de estudio se llevó a cabo cuando los pacientes realizaron su valoración prequirúrgica, se les explicó el estudio, se les invitó a participar y se les presentó el consentimiento informado. Para la elección de los pacientes participantes del estudio además de su consentimiento y aceptación voluntaria a participar se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección:

#### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

1. Hombres y mujeres mayores de 18 años con capacidad de decisión.
2. Pacientes que hayan dado su consentimiento informado por escrito
3. Pacientes con y sin diagnóstico de Obesidad por IMC y perímetro de cintura.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSION:**

1. Diagnóstico previo de cáncer
2. Diagnóstico previo de enfermedad renal o hepática
3. Mujer en estado de embarazo
4. Diagnóstico de enfermedad inmunológica activa
5. Diagnóstico de proceso infeccioso en cavidad abdominal
6. Cirugía general reciente (30 días previos a la inclusión del estudio)

La valoración inicial se realizó por médico general quien verificó el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión. En la consulta pre-quirúrgica se realizó



una historia clínica completa, se tomaron datos personales del paciente (nombre, edad, sexo, estatus socioeconómico, nivel educativo), antecedentes quirúrgicos, farmacológicos, patológicos, factores de riesgo personales, familiares, estilo de vida, todo en un Formato de recolección de datos. En la misma consulta se tomaron las medidas antropométricas (peso, talla, Índice de Masa Corporal – IMC, Perímetro de Cintura – PC, Presión Arterial – PA, Frecuencia cardiaca, FC).

La toma de las diferentes medidas se realizó de forma estandarizada. En la toma de medidas antropométricas se solicitó al paciente la utilización de ropa ligera o bata de cirugía, sin zapatos y el peso registrado aproximándolo a los 200 gramos más cercanos. La báscula fue estandarizada y calibrada en cada toma de medida. La talla se utilizó una cinta métrica de material no deformable, con el paciente recto de espalda a la pared y el valor que marcaba se guiaba con una regla colocada horizontalmente sobre la cabeza del paciente de forma perpendicular. El Índice de Masa Corporal - IMC = PESO (Kg)/ TALLA (metros)<sup>2</sup>. Perímetro de cintura se tomó en 2 ocasiones. El paciente se ubicó de frente al examinador, de pie, con los brazos a los lados y con la utilización de una cinta métrica no elástica. Esta cinta se aplicó en la cintura de manera horizontal en un punto medio entre la cresta iliaca y el borde costal y se confirmó que no se presentaron diferencias mayores a 0.5 cm entre las medidas. La Presión Arterial (PA), fue tomado con un esfigmomanómetro de mercurio en 2 ocasiones diferentes en el brazo derecho. La primera toma se realizó después de 15 minutos del ingreso del paciente a la consulta y la segunda toma 5 minutos posterior a la primera toma. Se ubicó al paciente de forma cómoda, sentado. La presión sistólica fue determinada por el primer sonido (Korotkoff fase 1). La presión diastólica fue determinada cuando desaparecieron los sonidos (Korotkoff fase 5).

- **Toma de muestras:**

Durante la cirugía, antes de ingresar al procedimiento se tomó muestra de sangre (la toma de sangre fue realizado por el personal de enfermería que participaba del procedimiento quirúrgico) para toma de hemograma completo y perfil lipídico (Colesterol total, HDL, LDL, Triglicéridos), glicemia en ayunas.

Durante el procedimiento quirúrgico, se extrajo tejido adiposo proveniente de epiplón, aproximadamente 2 cm de longitud y se depositaron en vial con medio de cultivo para adipocitos, se refrigeró hasta que se llevó al laboratorio de *IN VITRO* de la Universidad del Valle. Entre la extracción del tejido y el proceso en el

laboratorio no se pasó más de 2 horas y así se garantizó la viabilidad del tejido extraído.

- **Proceso de extracción, cultivo, tratamiento y preservación de los adipocitos:**

El tratamiento del tejido adiposo, extracción, cultivo y preservación de los adipocitos se realizó mediante los pasos a seguir según el POE No Adipocitos 002 del Laboratorio de Cultivo Celulares In-Vitro – Universidad del Valle, bajo la coordinación de Laboratorio del Bacteriólogo Jaime Muñoz y Dirigido por el Dr. José Oscar Gutiérrez.

El proceso de cultivo se inició pasando el tejido adiposo de epiplón de los viales de transporte a la caja de petri en Solución salina buferada de Hanks - HBSS. Con una tijera y bisturí se retiró la mayor cantidad de tejido conectivo y vasos sanguíneos sin dañar el tejido. Posterior a la limpieza del tejido con mas solución de HBSS, se cortó el tejido en pedazos pequeños con tijeras y luego se pasó a un E. Meyer con magneto y se agregó colagenasa Tipo I (GIBCO) -(por cada gramo de tejido se agregó 10 mL de colagenasa), se dejó que se disociara el tejido por 30 minutos aproximadamente. Al terminar este tiempo se tomó en una placa de microscopio 1 gota de la sustancia y se le agregó 1 gota de azul de tripan (SIGMA T-6146 al 0,4%) para medir viabilidad celular. Posterior a este procedimiento se tomó el tejido disociado en 2 tubos y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y solo se trabajó con el pellet (en el sobrenadante se encontraron los adipocitos maduros y la colagenasa, mientras que en el pellet los preadipocitos). Se tomó el pellet en 2 frascos y se completó con HBSS, se centrifugó de nuevo a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se tomó el pellet y se resuspendió en solución de Lisis de eritrocitos, se guardó por 5 a 10 minutos en la incubadora, se extrajo la solución de lisis y el pellet que quedó es el que se utilizó para cultivo, pero antes de cultivar se tomó una gota con azul de tripan y se realizó el conteo celular y viabilidad celular. En caja de cultivo se agregó el pellet y 5 ml de medio de cultivo de pre-adipocitos PBM-2 (Lonza; Cat. No. PT-8202), se dejó por 24 horas en incubadora (CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C y 95% humedad), se realizó recambio de medio de cultivo o se observó la formación de monocapa de células. Estos cambios de medio se realizaron cada 2 días.

A las 2 semanas se realizó el primer subcultivo. Para la realización de este subcultivo se descartó el medio de cultivo y se utilizó solución de lavado HBSS (500 mL) + 5 mL de Gentamicina, estreptomina, penicilina, y Anfotericina, se dejó

por 5 minutos y se repitió la operación. Posterior a esto, se adicionó a la botella de cultivo 2 mL de Tripsina/EDTA (SIGMA T-4799 y E-6635) al 0.025%, se incubó por 5 minutos a 37°C. Se llevaron las botellas al microscopio para verificar el desprendimiento de las células. Se tomaron las células y se guardaron en frascos y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se tomaron un 30% del pellet para criopreservar, 70% se tomaron para hacer el pase 2 de cultivo.

Se realizaron los pases 1 y 2 del cultivo, se sembraron de nuevo los pre-adipocitos y se hizo recambio de medio cada 2 días. El cambio de pase 2 y 3 se requirió aproximadamente 2 semanas (15 días) en cada pase y se logró una confluencia aceptable del número de células. Algunos cultivos requirieron una a dos semanas más para lograr la confluencia aceptable.

Para la criopreservación se requirió de un medio especial PGM-2 Bulletkit con 10% de DMSO (SIGMA D-2650) 10% SFB (Suero fetal bovino), se realizó el procedimiento de desprendimiento de células con Tripsina/EDTA y se pasaron a tubos de criopreservación debidamente marcados. Se dejaron los crioviales con las células y el medio a -80°C y se pasaron a nitrógeno líquido a -196°C, para su posterior utilización. Este procedimiento se realizó con cada pase (3 pases de cultivo).

- **RETO: Cultivo de adipocitos en medio rico de glucosa y triglicéridos:**

Se realizó el reto de estrés metabólico del adipocito, en donde se tomó el pase 3 de cultivo y las líneas celulares se dividieron en 2 grupos de acuerdo a las condiciones de cultivo. El primer medio de cultivo con niveles de glucosa bajos (50 mg/dL), segundo medio de cultivo con niveles altos de glucosa (100 mg/dL), controles con HBSS y células en medio de cultivo y se dejaron por 2 semanas.

- **Medición de producción de citocinas, adipocinas y función mitocondrial por parte del adipocito *In vitro*.**

Se trasladaron las muestras a la Fundación Cardiovascular de Colombia en la Ciudad de Bucaramanga-Santander y se realizaron las diversas pruebas de medición de citocinas y adipocinas y función mitocondrial de los pases 1,2 y 3 de cultivo y el reto metabólico. Por medio de la tecnología de Luminex una plataforma basada en los principios de citometría de flujo, en donde se puede identificar y cuantificar varios analitos al mismo tiempo, para ello, se utilizaron

diversos kits como: MILLIPLEX MAP Human Adipokine Magnetic, se determinó la concentración de Adiponectina, Leptina y Resistina, MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic determinó las concentraciones de las diferentes citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ), y la concentración de citocromos y funcionalidad mitocondrial con el Kit MILLIPLEX MAP Human Oxidative Phosphorylation millipore de Merk. Se determinaron las concentraciones de cada una de las adipocinas y citocinas en los 3 pases de cultivo y en el reto metabólico (cultivo de pre-adipocitos en medio con alta y baja concentración de glucosa y así verificar los cambios significativos en la concentración de las diversas sustancias producidas por el adipocito en circunstancias diferentes como el estrés metabólico.

- **Manejo de los datos:**

Los datos se guardaron en formato Excel y luego se extrapolaron al programa Stata versión 13. Debido a los pocos datos, solo se realizaron cuadros descriptivos sin utilización de otra herramienta estadística.

## RESULTADOS:

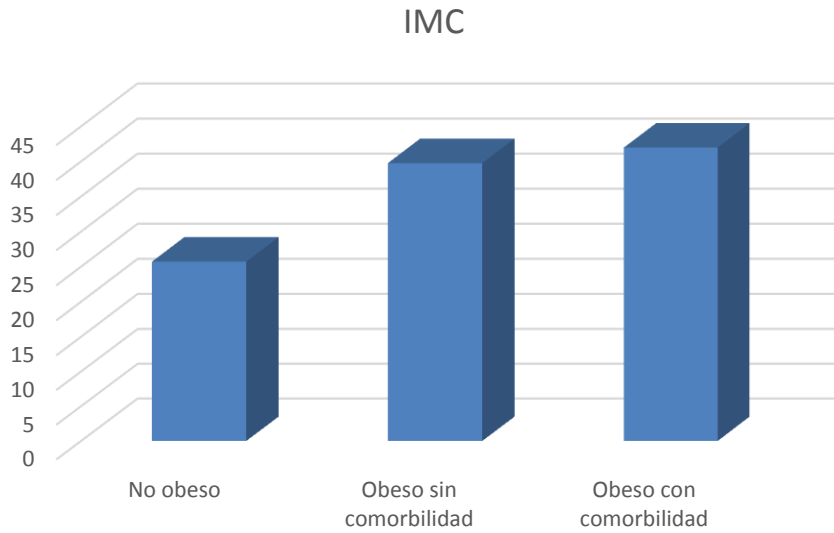
Los pacientes no obesos, se tomaron 8 muestras totales, de las cuales se perdieron 2 muestras por demora en la entrega del tejido de cirugía y no se procesaron en el laboratorio por muerte celular, 2 muestra se perdieron por contaminación y 2 muestras no crecieron, en total de muestras viables y que se llevó a cabo el proceso de este grupo: **3 muestras**.

En el grupo de obesos sin comorbilidad asociada se tomaron 7 muestras de las cuales solo se perdió una muestra por no crecimiento de las células, el total de muestras viables: **6 muestras**.

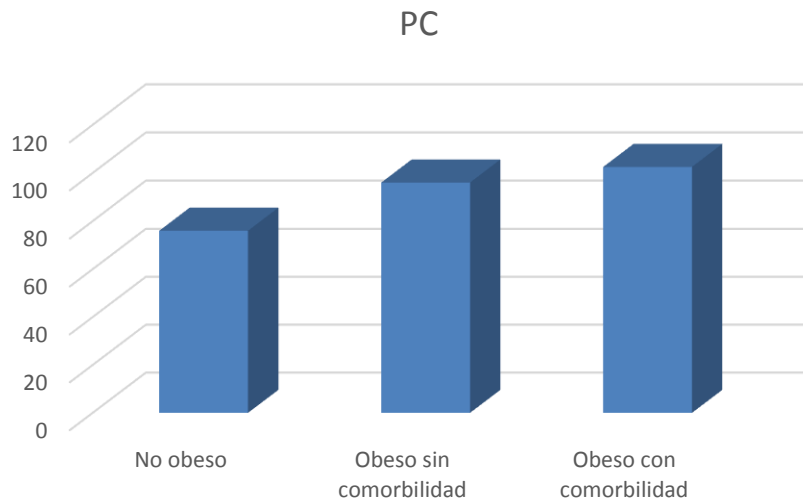
Del grupo de obesos con comorbilidad y tratamiento farmacológico se tomaron 9 muestras, 2 muestras se perdieron por daño en el laboratorio, 1 se contaminó con *S.aureus* y 2 se perdieron por no crecimiento celular. Total de este grupo **4 muestras viables**.

**CUADRO 1: DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO**

CONDICION	No obeso	Obeso sin comorbilidad	Obeso con comorbilidad
<b>n TOTAL</b>	3	6	4
<b>SEXO</b>			
Femenino	3	5	3
Masculino	0	1	1
<b>EDAD (años)</b>			
Min	21	22	58
Mediana	35	39,5	60
Max	41	58	61
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>			
Min	24,5	35,54	40,87
Mediana	25,7	39,75	41,96
Max	29,4	56,45	48,1
<b>PC (cm)</b>			
Min	74	91	94
Mediana	76	96	102,5
Max	80	150	120
<b>ANT. PATOL</b>			
HTA	0	0	3
DM TIPO 2	0	0	2
Dislipidemia	0	0	4
<b>FARMACOS</b>			
Estatinas	0	0	5
Metformina	0	0	2
<b>CIRUGIA</b>			
COLELAP	3	0	0
BYPASS GAST	0	6	4



IMC: Índice de masa corporal –  $\text{Peso en kg}/(\text{talla en metros})^2$



PC: Perímetro de cintura en cm.

Todos los pacientes participantes del proyecto se les realizó cirugía laparoscópica programada, en los pacientes no obesos, la cirugía que se les realizó fue COLELAP, mientras en los dos grupos de pacientes con obesidad (obesos con y sin comorbilidad asociada), la cirugía que se les practicó fue una laparoscopia abdominal para realización de Bypass gástrico por primera vez en cada uno de los pacientes. La mayoría de los pacientes que participaron fueron mujeres, pero esto se presentó de forma aleatoria, no hubo una razón para que se presentaran más mujeres que hombres.

El IMC (Índice de masa corporal), para el grupo de no obesos de 24.5 mínima y máxima de 29,4 (todos se encontraban en sobrepeso), los obesos sin comorbilidad asociada el mínimo fue de 35,54 y el máximo de 56,45 y el grupo de obesos con comorbilidad asociada el mínimo fue de 40,87 y el máximo de 48,1.

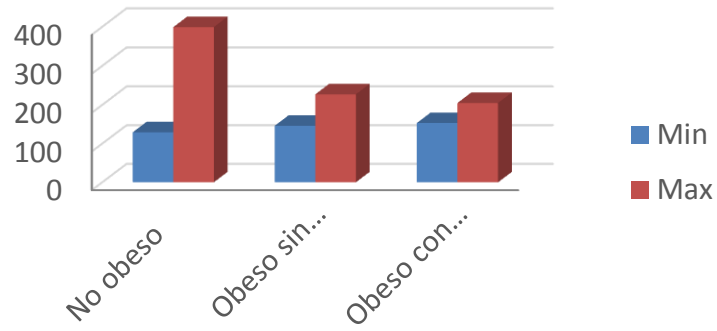
El perímetro de cintura era otro criterio para determinar obesidad, en el grupo de no obesos, el mínimo fue de 74cm y el máximo de 80cm, en el grupo de obesidad sin comorbilidad el mínimo fue de 91 y el máximo de 150 cm. En el grupo de obesidad con comorbilidad el mínimo fue de 94 cm y el máximo de 120cm.

Las comorbilidades asociadas solo para el grupo de obesidad son Hipertensión arterial, Diabetes Mellitus tipo 2 y dislipidemia, en el resto de grupos no se presentaron comorbilidades.

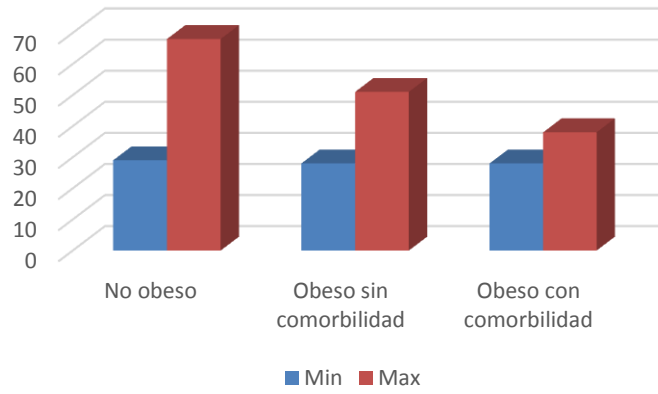
#### PERFIL LIPIDICO Y GLICEMIA EN AYUNAS:

CONDICION	No obeso	Obeso sin comorbilidad	Obeso con comorbilidad
<b>n TOTAL</b>	3	6	4
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>			
Min	129	146	153
Mediana	264	186.5	179
Max	399	227	205
<b>HDL(mg/dl)</b>			
Min	29	28	28
Mediana	48.5	39.5	39
Max	68	51	38
<b>LDL(mg/dl)</b>			
Min	87	90	87
Mediana	202	122.5	114.5
Max	317	155	142
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>			
Min	64	96	124
Mediana	88	246	148
Max	112	396	172
<b>Glicemia pre (mg/dl)</b>			
Min	59	58	87
Mediana	67.5	79	117.5
Max	76	100	148

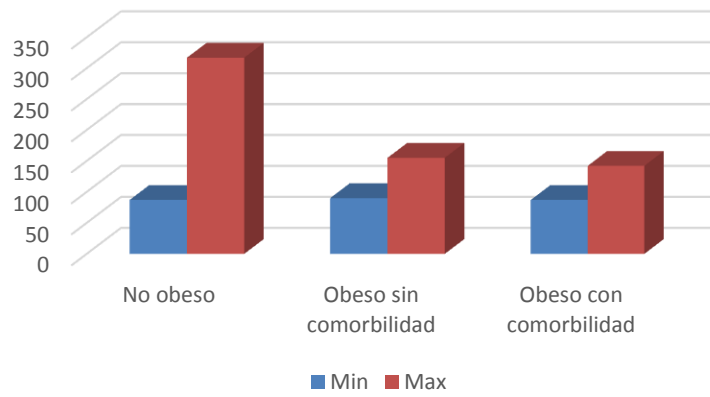
## Colesterol total



## HDL

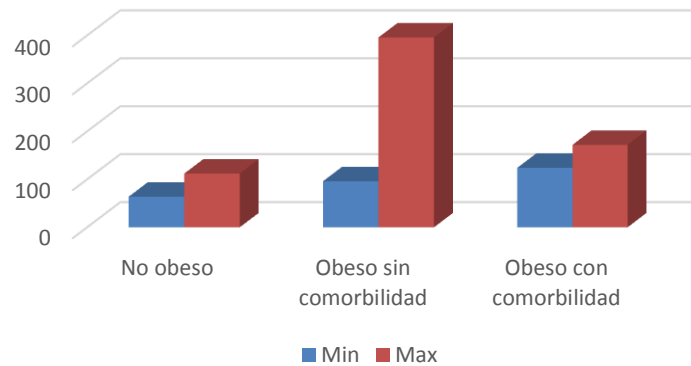


## LDL

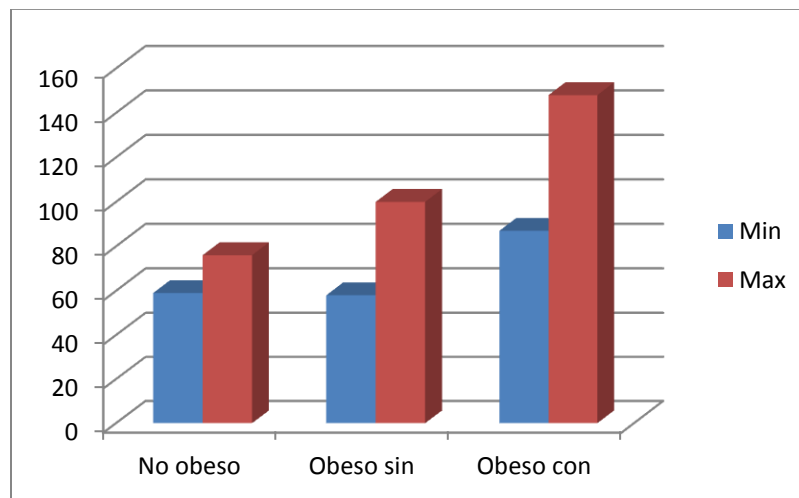




### Triglicéridos



### Glicemia pre

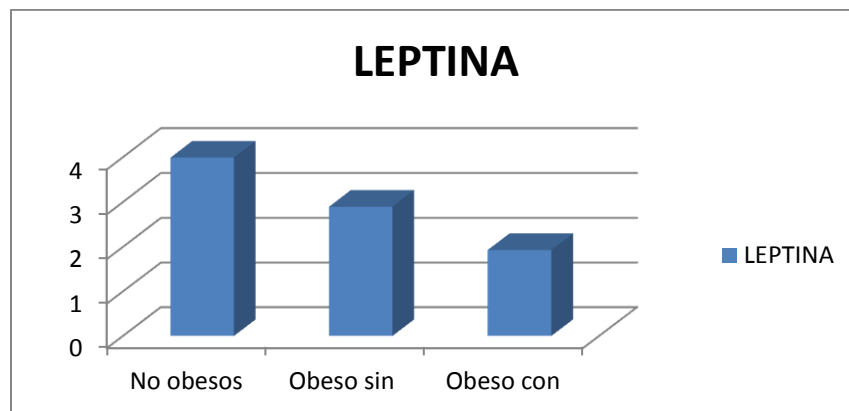


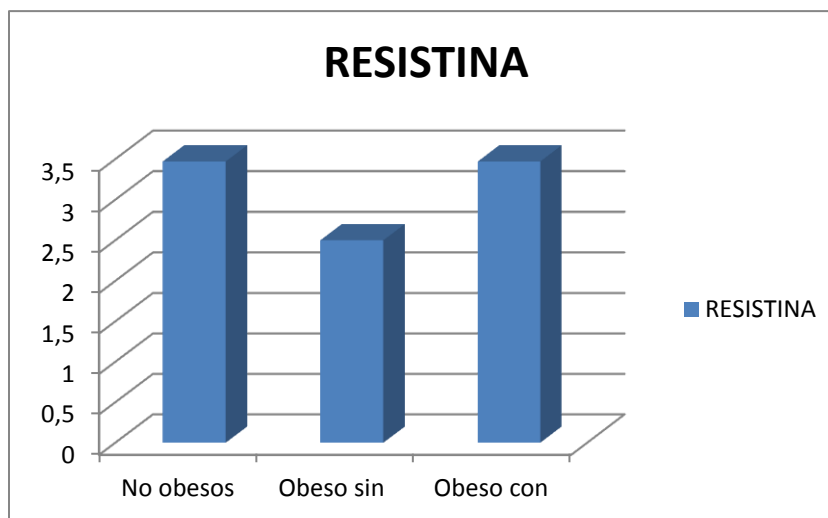
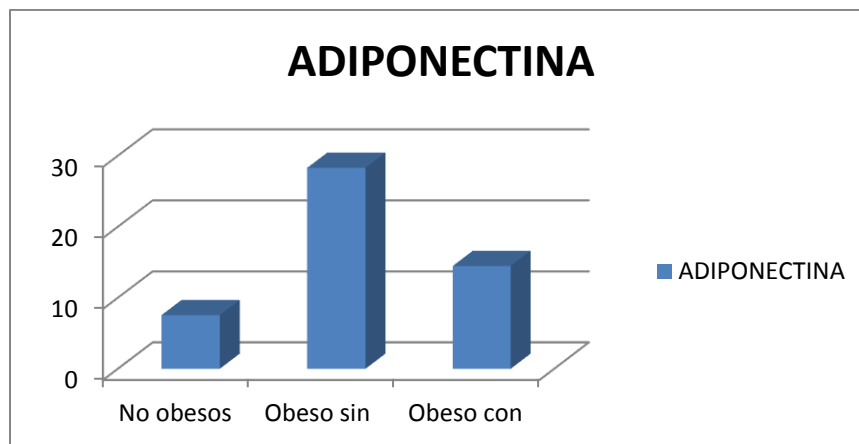
Se midió perfil lipídico completo y glicemia en ayunas en todos los pacientes, antes del acto quirúrgico. El paciente con obesidad y comorbilidad asociada, presentaron en común el uso de fármacos como Estatinas y Biguanidas (Metformina), las cuales por el mecanismo de acción pueden afectar los resultados.

## NIVELES DE ADIPOCINAS (LEPTINA, ADIPONECTINA Y RESISTINA)

CONDICION	No obesos	Obeso sin	Obeso con
<b>LEPTINA</b>			
MIN	3,99	0,2	1,51
MEDIANA	3,99	2,895	1,93
MAX	3,99	5,59	2,35
<b>ADIPONECTINA</b>			
MIN	7,56	2,94	7,56
MEDIANA	7,56	28,3	14,475
MAX	53,62	136,4	154,78
<b>RESISTINA</b>			
MIN	2,5	1,54	1,54
MEDIANA	3,47	2,5	3,47
MAX	6,4	3,47	5,42

CUADRO 2: NIVELES DE ADIPOCINAS (LEPTINA-ADIPONECTINA Y RESITINA)



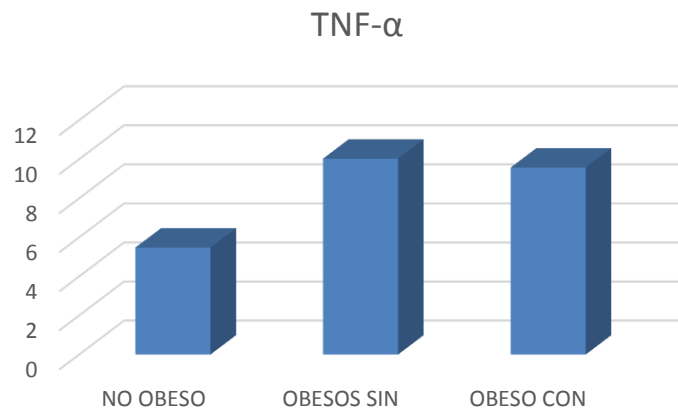
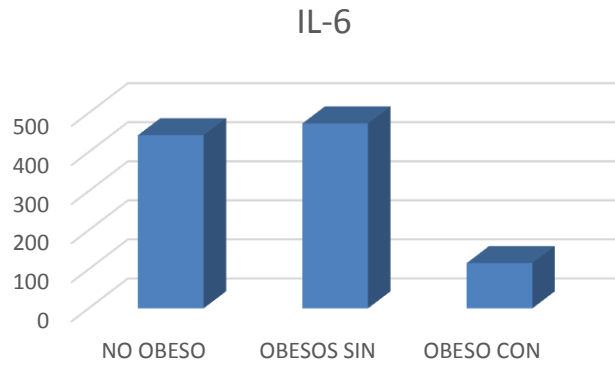


Se cuantificó la producción de adipocinas por los pre-adipocitos cultivados en los 3 grupos de pacientes.

#### NIVELES DE CITOCINAS (IL-6- TNF- $\alpha$ )

CONDICION	NO OBESO	OBESOS SIN	OBESO CON
<b>IL-6</b>			
MIN	68,15	155,84	112,82
MEDIANA	443,21	473,16	115,87
MAX	513,71	730,72	839,22
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
MIN	3,27	0,7	6,34
MEDIANA	5,48	10,03	9,575
MAX	7,69	18,09	12,81

**CUADRO 3: NIVELES DE CITOCINAS (IL-6 – TNF- $\alpha$ )**



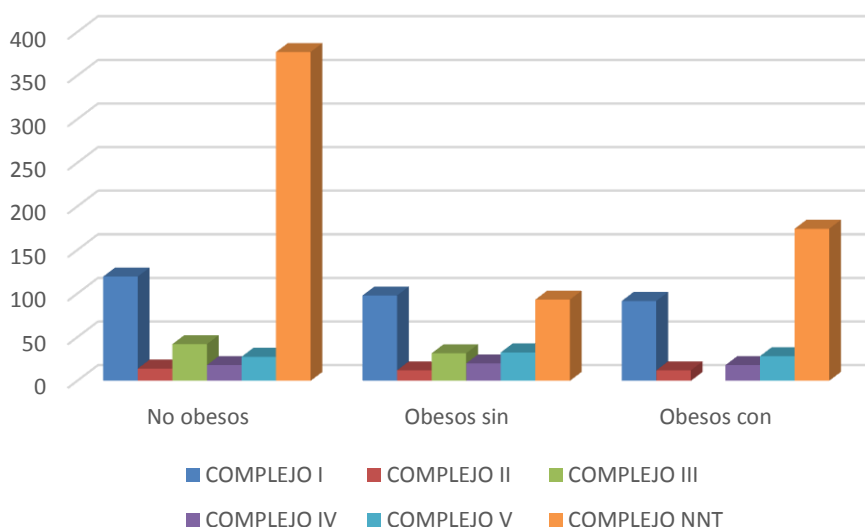
Se cuantificó la producción de Citocinas (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) por los pre-adipocitos cultivados en los 3 grupos de pacientes.

## COMPLEJOS MITOCONDRIALES: FUNCIÓN MITOCONDRIAL

condición	No obesos	Obesos sin	Obesos con
<b>COMPLEJO I</b>			
MIN	60	46,5	52
MEDIANA	119,5	97,75	91,5
MAX	573,5	146	109,5
<b>COMPLEJO II</b>			
MIN	12	11,5	10
MEDIANA	14	12	12
MAX	27,5	13	13
<b>COMPLEJO III</b>			
MIN	25,5	25,5	
MEDIANA	42	31,5	
MAX	48	40	
<b>COMPLEJO IV</b>			
MIN	17	18	14
MEDIANA	18	20	18
MAX	51	23,5	20
<b>COMPLEJO V</b>			
MIN	24	19	21,5
MEDIANA	27,5	32,5	28,25
MAX	124	42	45,5
<b>COMPLEJO NNT</b>			
MIN	59	54	29,5
MEDIANA	377	93	174,25
MAX	3221	377	220

**CUADRO 4: COMPLEJOS MITOCONDRIALES (COMPLEJO I: NADH-ubiquinona oxidorreductas), (COMPLEJO II: ubiquinona succinato oxido-reductasa), (COMPLEJO III: ubiquinona citocromo c oxidorreductasa), (COMPLEJO IV: citocromo c oxidasa), (COMPLEJO V: ATP sintasa), (NNT: nicotinamida nucleotido transhidrogenasa)**

## COMPLEJOS MITOCONDRIALES



Se midieron los complejos I – IV de la cadena respiratoria mitocondrial y la ATP sintasa que es complejo V y la nicotinamida nucleotido transhidrogenasa, solo se tomó el pase 1 para realizar la comparación, ya que la mayor producción de citocinas, adipocinas y función mitocondrial se observó en el paso 1 y se disminuyó drásticamente con cada pase y se observó que los niveles más bajos se presentaron en el pase 3.

El complejo III en el grupo de obesos con comorbilidad asociada y tratamiento farmacológico, no lo captó el equipo o no se produjo este complejo.

**EL RETO: CULTIVO DE PRE-ADIPOCITOS EN MEDIOS CON BAJO Y ALTO NIVEL DE GLUCOSA.**

El reto, se realizó cultivando los preadipocitos en diferentes condiciones del medio (glicemia baja-50mg/dL y glicemia alta-100mg/dL) y los controles fueron medio de cultivo de pre-adipocitos y HBSS, en los diferentes grupos de estudio, obteniéndose los siguientes datos.

CONDICION	NO OBESOS		OBESOS SIN		OBESOS CON	
	ALTA	BAJA	ALTA	BAJA	ALTA	BAJA
RETO GLUCOSA						
<b>LEPTINA</b>						
MIN	74,94		19,22		1101,5	
MEDIANA	74,94		937,11		1356,7	
MAX	74,94		1855		1611,9	
<b>ADIPONECTINA</b>						
MIN	17433	31,06	55990	2131	2622,3	17843
MEDIANA	17433	3635,03	55990	8333	8578,65	17843
MAX	17433	7239	55990	14535	14535	17843

**CUADRO 5: RETO – NIVELES DE ADIPOCINAS EN CULTIVO DE ADIPOCITOS EN ESTRÉS.**

Cuadro de niveles de adipocinas (Leptina, Adiponectina y Resistina) de adipocitos cultivados en diversos medios. 1. Medio con glucosa baja, 2. Medio con glucosa alta y 2 controles PBSS y medio de cultivo de adipocitos.

El equipo no captó o no se produjo leptina en condiciones de bajo nivel de glucosa en el medio de cultivo en los 3 grupos de estudio.

CONDICION	NO OBESOS		OBESOS SIN		OBESOS CON	
	ALTA	BAJA	ALTA	BAJA	ALTA	BAJA
RETO GLUCOSA						
<b>IL-6</b>						
MIN	0,34	50,4	0,3	1,49	0,3	27,4
MEDIANA	0,38	60,84	0,39	38,3	0,32	37,14
MAX	0,68	168,5	0,46	94,3	0,38	95
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>						
MIN	0,72	0,65	0,61		0,69	0,54
MEDIANA	1,11	0,9	0,61		0,83	0,79
MAX	1,19	1,27	0,61		1	0,92

Cuadro 6 son los resultados de las mediciones de los niveles de citocina pro-inflamatorias en adipocitos cultivados en estrés (medio normoglucémico, hipoglucémico) con controles de medio de cultivo de pre-adipocitos y HBSS.

El equipo no captó o no se produjo TNF- $\alpha$  en el grupo de obesos sin comorbilidad en los adipocitos cultivados en baja concentración de glucosa.

## DISCUSIÓN

La obesidad es considerada una condición crónica producida por múltiples factores que van desde la carga genética, hasta las condiciones ambientales con repercusiones sistémicas que pueden ir desde condiciones limitantes por el mismo aumento de peso en la personas: como daño en las articulaciones, dificultad para la movilidad, problemas psicológicos, autoestima baja, problemas respiratorios (ej: apnea del sueño), asociación con aumento de riesgo para diferentes tipos de cáncer como el cáncer de mama y colonrectal, hasta trastornos metabólicos como: dislipidemia, resistencia a la insulina, Diabetes Mellitus tipo 2.

El tejido adiposo ya no es visto como un tejido de solo almacenaje de triglicéridos y ácidos grasos, sino, que es un tejido endocrino sumamente activo, productor de diversas sustancias (adipocinas), la cuales tienen como función la regulación del metabolismo, función del sistema inmunológico, función hormonal y reproductivo, además, producción de citocinas inflamatorias como: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, entre otras, aunado al aumento en número y tamaño del adipocito (hipertrofia e hiperplasia), que producen un estímulo mayor sobre estas células aumentando la producción de dichas sustancias y produciendo efectos mayores sobre los sistemas mencionados; por lo tanto, las personas en condición de obesidad pueden presentar 2 tipos de respuesta: un grupo, que a pesar de tener un IMC por encima de 30 y un perímetro de cintura por encima de 88 cm en mujeres y 102 en hombres, no presentan una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, ni patologías asociadas a la obesidad (se les denomina “obesos sanos”) y un segundo grupo, los pacientes con IMC por encima de 30 con perímetro de cintura alto, que si presentan dicha respuesta inflamatoria crónica, con mayor respuesta sistémica como cambios a nivel metabólico (resistencia a la insulina, dislipidemia, aumento de riesgo cardiovascular, etc)<sup>42</sup>.

Los participantes de este proyecto se clasificaron en 3 grupos: Grupo 1: (no obesos), Grupo 2 (Obesos pero sin comorbilidad asociada u “obesos sanos”) y Grupo 3 (Obesos con comorbilidad asociada y tratamiento farmacológico), a los cuales se tomaron muestra de tejido adiposo de epiplón (tejido visceral), que según la literatura es más activo en la producción de adipocinas que el adipocito subcutáneo<sup>43</sup>. Este tejido se cultivó y se realizaron 3 pases observándose una disminución en la producción de adipocinas a medida que se realizan los pases, la mayor cantidad de las sustancias producidas por el adipocito in vitro se encontró en el pase I y disminuye notablemente con cada pase, por esta razón se tomó para hacer los cuadros descriptivos solo los resultados con el pase 1. En los pacientes se encontró, al examen físico, todos estaban controlados en cuanto a



sus signos vitales Frecuencia cardiaca, Frecuencia respiratoria, Tensión Arterial, Temperatura sin alteraciones evidentes, en los paraclínicos realizados, Hemograma, ningún paciente presentó cifras fuera de lo normal, sin alteraciones en la línea blanca y roja, todos los resultados aptos para la realización de la cirugía.

Los pacientes que participaron en el proyecto, todos cumplían con los criterios de inclusión, los del grupo de obesos presentaron un IMC por encima de 30 y un perímetro de cintura en hombres  $\geq 90$  cm y las mujeres  $\geq 80$  cm y los del grupo no obeso presentaron IMC por debajo de 30 (se catalogaron en sobrepeso) y el perímetro de cintura por debajo de lo solicitado para el grupo de obesidad. Se tomó Perfil lipídico en donde se pudo observar alteraciones tales como:

En el grupo no obeso se encontraron niveles altos de colesterol total y de LDL, por encima de los grupos con obesidad, pero los niveles de HDL fueron más altos en este grupo que los grupos con obesidad. Los niveles de triglicéridos y glicemia en ayunas, estuvieron por debajo comparado con los grupos con obesidad y patología asociada.

En los grupos con obesidad, si se observa una diferencia grande, los niveles de colesterol total, LDL, y triglicéridos, hay una disminución bien marcada en estos niveles en el grupo de obesidad con comorbilidad y tratamiento farmacológico, comparado con el grupo de obesidad sin comorbilidad, pero aquí hay que destacar el uso de medicamentos como las Estatinas, que pudieron intervenir en los resultados de estos paraclínicos, ya que las Estatinas son un grupo de fármacos que tiene por mecanismo de acción la inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA), enzima importante en la síntesis de colesterol y es utilizada en tratamiento de dislipidemia, disfunción endotelial, entre otras patologías, y se han demostrado en varios estudios su acción en la reducción en los niveles de colesterol total, los niveles de LDL y en menor medida en los niveles de triglicéridos<sup>52</sup>.

Los resultados en la medición de los niveles de las diferentes adipocinas (Leptina, Adiponectina y Resistina), se encontró lo siguiente:

La Leptina es una adipocina secretada por varios tejidos pero especialmente es producida por el tejido adiposo y sus funciones intervienen varios sistemas y en el metabolismo, aumentando el consumo de energía y disminuyendo la ingesta (anorexia), por lo tanto, lo característico en personas delgadas era encontrar niveles altos y niveles bajos en personas con obesidad, pero la sorpresa fue al encontrar que en algunas personas con obesidad presentaban niveles altos de la hormona, lo cual se explicó la poca o nula funcionalidad de la hormona en estas

personas con mecanismos de resistencia. En este estudio se encontró que los niveles más altos de Leptina se observaron en el grupo no obeso y entre los grupo con obesidad, los niveles más bajos estaba en el grupo con obesidad asociado a comorbilidad y tratamiento farmacológico, lo cual concuerda con lo encontrado en literatura, pero sin mecanismos de resistencia<sup>33,34,42</sup>.

La adiponectina es otra hormona producida especialmente por el adipocito, su acción es participar en varios procesos del metabolismo, efectos antiinflamatorios, antiteratogenicos y disminución de los mecanismos de resistencia a la insulina. Sus niveles son inversamente proporcionales al IMC, por lo tanto, se encuentran niveles bajos en pacientes con obesidad y está muy asociado a enfermedad cardiovascular (ateroesclerosis), Diabetes Mellitus tipo 2, dislipidemia, etc. En esta investigación, la producción de Adiponectina en el grupo de pacientes con obesidad se presentó una diferencia marcada. El grupo de obesidad sin comorbilidad, los niveles fueron más altos comparados con el grupo de obesidad con comorbilidad asociada y los pacientes de este grupo presentan patologías como Diabetes Mellitus tipo 2, Dislipidemia e Hipertensión, lo cual demostraría la asociación entre la presencia de dichas patologías y la disminución de los niveles de esta hormona<sup>28,29,30</sup>.

La Resistina, es una hormona que poco se conoce, participa en los mecanismos de resistencia a la insulina y su tendencia es aumentar sus niveles en los pacientes con obesidad<sup>35</sup>. En este estudio, no se observaron cambios importantes en los niveles entre los diferentes grupos de estudio.

La citocina producidas por el adipocito que se midieron en este estudio fueron TNF- $\alpha$  e IL-6. En obesidad, el aumento por número y tamaño del adipocito, aumenta la producción de todas las citocinas, por lo cual, se puede apreciar un estado inflamatorio crónico de bajo grado, esto se debe a la producción de sustancias pro-inflamatorias y adicionalmente, varios estudios muestran la invasión de macrófagos al tejido adiposo por la producción de la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) y se ha demostrado un aumento en el número de macrófagos de un 10 a un 40%, aumentando la producción de TNF- $\alpha$ <sup>44</sup>. En este proyecto se encontró que los niveles más altos de TNF- $\alpha$ , estaban en los grupos con obesidad, comparados con el grupo de no obesos, lo cual nos demuestra la correlación entre tejido adiposo y aumento de los niveles de esta citocina. Entre los grupos de obesos, hay una leve diferencia entre el grupo de obesos con comorbilidad y tratamiento farmacológico, en donde hay una ligera disminución de los niveles de esta citocina comparada con el grupo de obesidad sin comorbilidad. Esto se podría explicar por los efectos pleiotróficos de los fármacos utilizados por el primer grupo (Estatinas y Biguanidas)<sup>45</sup>.

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria producida por el adipocito y su producción es directamente proporcional al IMC, en este estudio se encontró una diferencia grande entre los grupos de pacientes con obesidad, encontrándose niveles muy inferiores en el grupo de obesidad con comorbilidad asociada y tratamiento farmacológico, comparado con el grupo de obesidad sin comorbilidad. Esto se explicaría por los efectos de los fármacos utilizados por estos pacientes (Estatinas y Biguanidas-Metformina), los cuales afectan notablemente el estado inflamatorio subclínico crónico. La explicación de cómo estos fármacos pueden afectar el estado inflamatorio se ha planteado en varios estudios, uno de estos estudios es el estudio de Gomez-Garcia en el cual dividió en 3 grupos de pacientes tratados con diferentes fármacos, un grupo de pacientes tratados con Rosuvastatina, otro grupo con Metformina y otro grupo con placebo. Se midieron parámetros como perfil lipídico el cual mejoró notablemente con Rosuvastatina más que con Metformina, pero adicionalmente se observó los efectos pleiotrofos de ambos fármacos con reducción en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  y en enzimas que intervienen en la producción de estrés oxidativo y antioxidantes como Glutation reductasa (GSH), Glutation peroxidasa (GPx) con disminución de estas 2 enzimas y aumento de la antioxidante Superóxido dismutasa (SOD); adicionalmente, se encontró que los pacientes que utilizaron estos fármacos presentaron una reducción de peso significativa que ayudaría a la disminución del estado inflamatorio, pero se identificó además la asociación de los efectos de cada fármaco, como por ejemplo, la disminución de la actividad del factor nuclear kappa  $\beta$  (NF-kB) el cual se asocia con la expresión de genes relacionados con inflamación y estrés oxidativo<sup>45</sup>. Esto puede explicar lo observado en este trabajo en los resultados sobre el grupo 3 (grupo de pacientes con obesidad y patología asociada y tratamiento farmacológico- Estatinas y Metformina) donde se obtuvo unos niveles más adecuados de perfil lipídico, disminución en los niveles de citocina inflamatorias y diferenciación en la producción de adipocinas, comparado con los otros 2 grupos (grupo 1: no obesos y grupo 2: obesos sin comorbilidad).

La mitocondria es una fuente en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que en ella se realizan procesos fisiológicos como la fosforilación oxidativa, la cual produce hasta el 90% de ATP necesario para la supervivencia celular<sup>49</sup>, pero adicionalmente se produce ROS intracelulares, como resultado de la reducción parcial de oxígeno molecular. La fosforilación oxidativa se conforma por 4 complejos (I-IV), NADH- ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), óxido-reductasa ubiquinona succinato (complejo II), ubiquinona citocromo c oxidorreductasa (complejo III), el citocromo c oxidasa (complejo IV). A partir del ciclo de Krebs se produce intermediarios (NADH Y FADH<sub>2</sub>), dichos electrones ingresan al complejo I o II, pasan al complejo III y IV y posterior al oxígeno como aceptor final, la energía liberada produce un gradiente electroquímico de

hidrogeno en la membrana interna mitocondrial y por último se produce ATP gracias al (complejo V) ATP sintetasa. La nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT), con funciones antioxidantes<sup>50</sup>. Los lugares principales para la generación de ROS, ejemplo, peróxido de hidrogeno, superoxido e hidroxilos, son los complejos I y III, tanto por exceso o disminución de flujo de electrones pueden estimular a la producción de ROS. Normalmente, los ROS son neutralizados por enzimas antioxidantes como por ejemplo Mn-superoxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa, entre otras, pero cuando hay superproducción de ROS o disminución en los antioxidantes es cuando se presenta la disfunción mitocondrial causando daños en lípidos de membranas, daños en DNA, alteraciones en la producción y funcionalidad de proteínas, entre otros efectos<sup>50</sup>.

En este proyecto se cuantificó la expresión de los complejos que participan en la fosforilación oxidativa, y se observó que los complejos I y III asociados a una mayor producción de ROS se expresaron mucho más en el grupo de no obesos comparado con los grupos de pacientes con obesidad. Entre los grupos de obesidad, existe una leve diferencia, se observó una producción menor de estos 2 complejos en el grupo de pacientes con obesidad con comorbilidades y tratamiento farmacológico comparado con el grupo de pacientes obesos sin comorbilidad asociada. La expresión del complejo NNT (complejo asociado a la actividad antioxidante), se observó unos niveles muy altos y una contundente diferencia en el grupo de no obesos frente a los grupos de pacientes con obesidad, lo cual puede indicar mecanismos de compensación entre la producción de ROS y el efecto antioxidante, evitando los daños producidos por el desbalance entre la producción de ROS y producción de agentes antioxidantes.

En los grupos con obesidad, la expresión del complejo NNT, se presentó una diferencia entre los grupos, en el grupo con obesidad con comorbilidades asociadas y tratamiento farmacológico se observó una expresión mayor de este complejo, comparado con el grupo de obesidad sin comorbilidades, lo cual se puede explicar al efecto pleiotrófico de los fármacos utilizados (Estatinas y Metformina), que disminuyen el estado inflamatorio crónico y aumenta la expresión de este complejo que está asociado a efectos antioxidantes, disminuyendo o contrarrestando los efectos de los ROS sobre las estructuras celulares.

En el reto, se dieron unas condiciones de estrés al medio de cultivo de los adipocitos, sembrándose en medios con niveles de glucosa baja y glucosa alta,. Según la literatura el exceso de almacenamiento de lípidos y glucosa puede llevar a disfunción del adipocito, especialmente, de su retículo endoplásmico (RE) y mitocondria, llevando a alteraciones en la síntesis de proteínas (daño en el plegamiento y modificación de proteínas), almacenaje de lípidos y glucosa en el

citósol de las células que puede producir disfunción de organelas y disfunción celular en general. Lo que se puede correlacionar clínicamente con esteatosis hepática, resistencia a la insulina, incremento de concentración de lípidos y glucosa circulantes<sup>46</sup>.

Al presentarse mediadores inflamatorios como por ejemplo TNF- $\alpha$  e IL-6 entre otros y aumento en las concentraciones de glucosa y lípidos circulantes, tienen efectos sobre cinasas como las JNK, esto se evidenció en estudios con ratones a los cuales los ponían en dichas condiciones para estresar el adipocito y mirar la respuesta del mismo. Lo que se observó es que el receptor de insulina presentaba cambios como fosforilación en una serina en IRS-1 e IRS-2, reduciendo la respuesta a la insulina por parte del receptor<sup>47</sup>, pero los efectos de las JNK no solo afecta al adipocito y su respuesta a la sensibilidad a la insulina, sino que afecta a tejidos como hígado, músculo esquelético y páncreas, llevando a un estado de resistencia a la insulina<sup>47,50</sup>.

En este trabajo, se presentó un inconveniente grande para la realización del objetivo del reto (cultivar los adipocitos en 2 medios diferentes –glucosa baja y glucosa alta), las muestras se analizaron en la Ciudad de Bucaramanga en La Fundación Cardiovascular de Colombia, pero desafortunadamente, las muestras sufrieron en el traslado descongelación, pero, se encontraron en el medio las citocinas y adipocinas liberadas por los adipocitos. Posterior a esto, el Luminex, equipo utilizado tuvo una falla y solo hasta el otro día se pudo realizar la medición de la adipocinas, pero el kit para dicha medición exponía que no podría pasarse de determinado tiempo y realmente no se pudo cumplir con los tiempos estipulados para la medición, por lo cual no se obtuvo la cantidad de datos esperados, y fue imposible apreciar el comportamiento del adipocito cultivado en medios diferentes y su comportamiento en estrés. Lo que la literatura muestra es que a mayor cantidad de ácidos grasos en la dieta y exceso de carbohidratos, lleva a hipertrofia e hiperplasia del adipocito, con aumento en la producción de citocinas inflamatorias, disfunción celular en diferentes tejidos, activación de mecanismos de resistencia a la insulina, y esto se esperaría en los adipocitos cultivados en medios de glucosa alta<sup>48</sup>, pero desafortunadamente, no se puede apreciar los resultados en este trabajo.

## CONCLUSIONES

- Niveles más altos de citocinas inflamatorias en los grupos de obesidad pero con una disminución marcada en los niveles de citocinas (especialmente IL-6) en el grupo de pacientes con obesidad y tratamiento farmacológico (Estatinas y Biguanidas); Existe una asociación entre los mecanismos de acción de estos fármacos y la disminución del estado inflamatorio crónico subclínico y disminución de los efectos de dicho estado?.
- Se observó una disminución en los niveles de leptina en los grupos con obesidad, especialmente, en el grupo de obesidad con comorbilidad y tratamiento farmacológico.
- El nivel de adiponectina se encontró bajo en el grupo de obesidad con comorbilidad asociada y existe una relación directa entre los niveles bajos de adiponectina y fenómenos como: resistencia a la insulina, dislipidemia, etc, que clínicamente se expresan con patologías como Diabetes Mellitus tipo 2, dislipidemia, entre otras.
- En la función mitocondrial, se observó mayor expresión de los complejos I Y III (asociados con mayor producción de ROS) en el grupo no obeso, pero niveles más altos del Complejo NNT(asociado actividad antioxidante), en el mismo grupo.
- En los grupos con obesidad, se apreció una mayor expresión del complejo NNT, en el grupo obeso con comorbilidades y tto. Farmacológico Biguanidas y Estatinas, posiblemente dado por la acción de los fármacos.
- Apenas recientemente, se enfoca la obesidad como una consecuencia multifactorial que depende de factores genéticos y ambientales.
- No existe uniformidad de criterios en cuanto las causas y mucho menos respecto al tratamiento.

- No existen marcadores bioquímicos o genéticos de la obesidad y determinar que personas tendrán un comportamiento de “obesos sanos “ y cuales presentarán todas las consecuencias y las patologías asociadas a la condición de inflamación crónica subclínica
- La comprensión de todos los componentes involucrados en la obesidad, permitirá desarrollar biomarcadores no solo para diagnóstico sino para seguimiento del tratamiento de la obesidad.
- Este estudio aportó una estandarización en la técnica de cultivo para adipocitos, construcción de protocolos para las diferentes pruebas y medios cultivos para mantenimiento, supervivencia, funcionalidad y conservación de los adipocitos.

## RECOMENDACIONES

- Realización de más estudios sobre el comportamiento del metabolismo del adipocito, para poder evaluar las diferencias en la respuesta metabólica (Obesos sanos – Obesos enfermos).
- Buscar marcadores prematuros para determinar que población presentará las patologías asociadas a la obesidad y cuales no.
- Realización de más estudios *in vitro* e *in vivo*, sobre la acción de los fármacos en el metabolismo del adipocito.
- Realización de más pruebas que pongan en estrés al adipocito para tener una mejor visión sobre el comportamiento del adipocito en dichas condiciones.



## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva: World Health Organization 1997
2. Fox C, Massaro J, Hoffmann U, Mou K, Maurovich-Horvat P, Liu C, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments. *Circulation* 2007; 116:39-48
3. Molenaar E, Hwang S, Fox C. Burden and rates of treatment and control of cardiovascular disease risk factors in obesity. Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2008. 31(7):1367-1372.
4. Poirier P, Despres JP. Waist circumference, visceral obesity, and cardiovascular risk. *J Cardiopulm Rehabil*. 2003; 23: 161–169.
5. Poirier P, Lemieux I, Mauriège P, Dewailly E, Blanchet C, Bergeron J, Després J. Impact of Waist Circumference on the Relationship Between Blood Pressure and Insulin: The Quebec Health Survey. *Hypertension*. 2005;45:363-367
6. Fontana L, Eagon J, Trujillo M, Scherer P, Klein S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *DIABETES*, 2007. 56(4): 1010(3)
7. Pasternak RC. Report of the Adult Treatment Panel III: the 2001 National Cholesterol Education Program guidelines on the detection, evaluation and treatment of elevated cholesterol in adults. *Cardiol Clin*, 2003 Aug;21(3):393-8.
8. Garcia R, Cifuentes A, Caballero R, Sanchez L, Lopez-Jaramillo P. A proposal for an appropriate central obesity diagnosis in Latin American population. *Int. J. Cardiol*. 2006; 110(2): 263-4
9. Perez M, Casas JP, Cubillos-Garzon LA, et al. Using waist circumference as a screening tool to identify Colombian subjects at cardiovascular risk. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2003;10:328–35.
10. Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, Capeau J, Bastard JP. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF alpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(8): 993-997
11. Bastarrachea R, Curran J, Bolado V, Kent J, López-Alvarenga J, Téllez-Mendoza J, et al. Vinculando la respuesta inflamatoria, la obesidad y la diabetes con la sobrecarga (estrés) del retículo endoplásmico a través de las acciones de la selenoproteína S. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2006;14(2):89-101
12. Bougne`res P. Genetics of Obesity and Type 2 Diabetes. Tracking Pathogenic Traits

During the Predisease Period. *Diabetes*, 2002; 51(3).

13. Joshi RK, Lee SA. Obesity related adipokines and colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(1):397-405

14. Alexopoulos N, Katriasis D, Raggi P. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 233(1):104-112

15. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(11):2792-800.

16. Hamdy O, Porramatikul S, Al-ozairi E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev*. 2006; 2(4):367-73.

17. Dalamaga M. Obesity, insulin resistance, adipocytokines and breast cancer: New biomarkers and attractive therapeutic targets. *World J Exp Med*. 2013. 20;3(3):34-42.

18. Ashktorab H, Paydar M, Yazdi S, Namin HH, Sanderson A, Begum R, et al. BMI and the risk of colorectal adenoma in African-Americans. *Obesity (Silver Spring)*. 2014.

19. Jungheim ES1, Travieso JL, Hopeman MM. Weighing the impact of obesity on female reproductive function and fertility. *Nutr Rev*. 2013;71 Suppl 1:S3-8

20. Widmyer M, Utturkar G, Leddy H, Coleman J, Spritzer C, Moorman C, et al. High body mass index is associated with increased diurnal strains in the articular cartilage of the knee. *Arthritis Rheum*. 2013;65(10):2615-22.

21. Alberti K, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23: 469-480

22. Guías ALAD 2006 de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Organización Mundial de la Salud.

23. Garcia R, Cifuentes A, Caballero R, Sanchez L, Lopez-Jaramillo P. A proposal for an appropriate central obesity diagnosis in Latin American population. *International Journal of Cardiology* 110 (2006) 263 – 264

24. ENSIN: Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia. República de Colombia Ministerio de la Protección Social - Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. 2010

25. Recasens M, Ricart W, Fernandez-Real JM. Obesidad e Inflamación. *Rev Med Univ Navarra/vol48 N° 2*. 2004, 49-54

26. Carrasco F, Galgani J, Reyes M. Síndrome de Resistencia a la Insulina. Diagnóstico y manejo.

27. Ferranti S, Mozzafarian F. La tormenta perfecta: Obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. *Clinical Chemistry*. Vol 34. 2009, 95-108
28. Hye Y, Kyung C. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes* 2014; 5(3): 357-363
29. Reyes, C. Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2007;15(3):149-155
30. Sewon L, Hyo-Bum K. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2014;10(2):54-59
31. Lau D, Dhillon B, Yan H, Szmitko P, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *The American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2005; 288(5): 2031-2014
32. Kaur J. A comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*. 2014.
33. Carlyle M, Jones B, Kuo J, Hall E. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension* 2002; 39(2): 496-401.
34. Morales M, Carvajal C. Obesidad y Resistencia a la Leptina. *Gaceta Médica Boliviana*. 2010; 33(1).
35. Kusminski C, McTernan P, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and type II diabetes. *Clinical Science* 2005 109, 243-256
36. Ramirez M, Sanchez C. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , la resistencia a la insulina, el metabolismo de la lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutr Hosp* 2012; 27(6): 1751-1757
37. AL-Suhaimi and Shehzad. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *European Journal of Medical Research* 2013, 18:12
38. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, et al. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Research and clinical practice* 77S(2007) S161-S164.
39. Recasens M, Ricart W, Fernandez-Real JM. Obesidad e Inflamación. *Rev Med Univ Navarra/vol 48, N° 2, 2004, 49-54.*
40. Mandrup-Poulsen T<sup>1</sup>, Pickersgill L, Donath MY. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Mar;6(3):158-66

41. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010; 17(4):314-21
42. Sanchez J. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica*, Vol 36, No 1(2005).
43. Nicklas BJ, Penninx BW, Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Kanaya AM, et al. Association of Visceral Adipose Tissue with Incident Myocardial Infarction in Older Men and Women : the Health, Aging and Body Composition Study. *Am J Epidemiol.* 2004; 160(8):741-9
44. Weisberg SP, McCann K, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin Invest* 2003, 112: 1796-1808
45. Gomez A, Martinez G, Ortega L, Rodriguez E, Alvarez C. Rosuvastatina y metformina reducen la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con hipertensión y dislipidemia. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:1242-9
46. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007; 48:1905-14
47. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 2002; 420: 333-6
48. Ramirez M, Sanchez C. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutr Hosp.* 2012; 27(6): 1751-1757.
49. Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radica Biology and Medicine* 2012;59(6):1252-63
50. Zuluaga A, Gaviria D. Una Mirada al estrés oxidativo e la célula. *Rev médica de Risaralda.* 2012;18(2): 145-154
51. Cordova N, Hernandez-Valencia M. La adiponectina en diferentes estados metabólicos. *Perinatol Reprod Hum* 2008; 22: 70-78.
52. Fernandez-Aguilar O, García-Ulloa A, Torres-Viloria A, Zacarías-Castillo R. Aspectos terapéuticos de las estatinas y su participación multiorgánicas. *Rev. Endocrinología y Nutrición* 2008; 16(3): 120-127.

