



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la
Salud y Biomedicina (CICSaB)**



**FRECUENCIA Y FENOTIPO DE CÉLULAS LINFOIDES
INNATAS (ILC) EN TEJIDO ADIPOSO DE SUJETOS SANOS
Y CON DISLIPIDEMIA**

TESIS QUE PRESENTA

L.N. CARLOS ADRIAN GONZÁLEZ CORTÉS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ESTHER LAYSECA ESPINOSA

Septiembre 2023



Frecuencia y fenotipo de células linfoides innatas (ILC) en tejido adiposo de sujetos sanos y con dislipidemia por Carlos Adrian González Cortés se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

CREDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en la Sección de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la tutoría de la Dra. Esther Layseca Espinosa, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que otorgó la beca para estudios de Maestría con número 1009118. El financiamiento para la realización de este trabajo fue otorgado por CONACYT a la Dra. Adriana Monsiváis a través del proyecto con registro A1-S-43425.

Tesis que presenta:

L.N. CARLOS ADRIAN GONZÁLEZ CORTÉS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Esther Layseca Espinosa

ASESORES INTERNOS

Dra. Adriana Monsiváis Urenda

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

ASESOR CLÍNICO

Dr. Carlos David Escobedo Uribe

JURADO

Presidenta de sinodales: Dra. Patricia Cossío Torres

Secretaria de sinodales: Dra. Adriana Monsiváis Urenda

Sinodal: Dra. Othir Galicia Cruz

Sinodal: Dr. Carlos Escobedo Uribe

Septiembre 2023

RESUMEN

Introducción: Las células linfoides innatas (ILC) constituyen un grupo de células de la inmunidad innata que se caracterizan por la ausencia de receptores específicos de antígeno y son activadas por citocinas. Las ILC se han clasificado en tres grupos con base en los factores de transcripción necesarios para su desarrollo y las citocinas producidas. Estudios murinos han demostrado su participación en la homeostasis metabólica y en la inflamación crónica. Sin embargo, la presencia y actividad de las ILC en el tejido adiposo de sujetos con dislipidemia, un trastorno de relevancia epidemiológica y clínica, ha sido poco estudiada.

Objetivo: Evaluar la frecuencia y fenotipo de las ILC en sujetos sanos y con dislipidemia.

Metodología: Se obtuvieron 10 muestras de tejido adiposo provenientes de sujetos sometidos a un proceso de abdominoplastia, además de 11 muestras de sangre venosa periférica de sujetos voluntarios. Los individuos se clasificaron en sujetos sanos o con dislipidemia con base en el perfil lipídico. Se aislaron células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de densidad y en el caso del tejido adiposo se realizó previamente una digestión enzimática. La identificación de subpoblaciones de ILC a partir de las CMN se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo.

Resultados: Las frecuencias de las diferentes subpoblaciones de ILC y células NK de sangre periférica fueron similares entre los sujetos control y con dislipidemia. En contraste, el análisis descriptivo de estas poblaciones en tejido adiposo mostró diferencias entre los grupos de estudio.

Conclusión: El presente estudio describe por primera vez que los pacientes con dislipidemia muestran cambios en las proporciones de ILC en tejido adiposo. Futuros estudios permitirán corroborar el posible papel de estas células de la inmunidad innata en dicha patología.

Palabras clave: células linfoides innatas, tejido adiposo, dislipidemia

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es un órgano altamente activo que integra funciones no sólo metabólicas, sino también endocrinas e inmunes, contribuyendo a la homeostasis corporal. El tejido adiposo está compuesto por diferentes tipos de células, principalmente los pre-adipocitos, los adipocitos y células inmunes residentes de tejido. De acuerdo con las características y funciones de los adipocitos que lo conforman, el tejido adiposo ha sido clasificado en: blanco, marrón/café y beige (1,2). Las principales funciones de los adipocitos blancos son el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos y la producción de adipocinas. En cambio, los adipocitos marrones tienen como función principal la termogénesis. Por último, los adipocitos beige son adipocitos blancos que han adquirido funciones y morfología similares a los adipocitos marrones con propiedades termogénicas (2,3).

Las células inmunes residentes de tejido adiposo constituyen otra parte importante después de los adipocitos debido a sus características y funciones. Las células inmunes residentes se han clasificado de acuerdo con su origen: mieloide y linfoide. Entre las células de origen mieloide encontramos macrófagos, células dendríticas, mastocitos y granulocitos; mientras que entre las de origen linfoide encontramos linfocitos B, T y células natural killer (NK) (4).

En condiciones normales, los diferentes tipos de células inmunes residentes intervienen en el equilibrio y mantenimiento del tejido llevando a una homeostasis tisular. De la inmunidad innata participan eosinófilos, células NK, macrófagos M2, así como células linfoides innatas (ILC) 1 y 2; por otra parte, de la inmunidad adaptativa intervienen a las células B, células B reguladoras, células T reguladoras y células NKT (4).

En condiciones en las que existe una acumulación excesiva de tejido adiposo se altera la homeostasis del tejido, afectando la cantidad y actividad de la gran mayoría de las células inmunes residentes y promoviendo el reclutamiento de otro tipo de células inmunes (4). Dicho desequilibrio, condiciona al desarrollo del efecto conocido como inflamación de bajo grado, donde existe un incremento en la infiltración de células inmunes periféricas en el tejido adiposo, aunado a una producción disminuida de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) y una

secreción de factores proinflamatorios (TNF- α , IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1) en la circulación sanguínea, generando un efecto local y sistémico (4-6).

Debido a esto, uno de los campos de investigación que ha cobrado interés es la identificación y papel de ciertas células inmunes residentes del tejido adiposo como son los macrófagos y las ILC.

Las ILC pertenecen a un grupo de linfocitos recientemente identificados de la inmunidad innata con características específicas: 1) carecen de un receptor antigénico específico, 2) se derivan de un progenitor linfoide común (CLP) y 3) su activación depende de señales de estrés y citocinas. Además, son equivalentes a las células T de la inmunidad adaptativa, de manera funcional y transcripcional (7-10). Las ILC han sido clasificadas en varias subpoblaciones de acuerdo con los factores de transcripción necesarios para su desarrollo y a las citocinas producidas: grupo 1 de las ILC (ILC1), grupo 2 de las ILC (ILC2), grupo 3 de las ILC (ILC3); así como las células NK y las células inductoras de tejido linfoide (LTi) (9).

Las ILC1 están definidas por la expresión del factor de transcripción T-bet y la producción de IFN- γ como la citocina efectora principal. Las ILC2 expresan los factores de transcripción GATA-3 y ROR α , y producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Las ILC3 expresan el factor ROR γ t y producen IL-17 e IL-22. (7-10). En humanos, las ILC1 se encuentran principalmente en pulmón y en intestino; las ILC2 en intestino, pulmón y piel, y las ILC3 mayoritariamente en microbiota intestinal. En razón de su localización, cada subgrupo de ILC participa en diversas respuestas de homeostasis y defensa (9).

Otra subpoblación de interés de ILC son las células NK que además de compartir características con ILC1 (expresión de factor T-bet y producción de IFN- γ), expresan el factor de transcripción EOMES y producen otras citocinas como TNF- α y GM-CSF (9). Las células NK se han dividido en dos principales poblaciones funcionales: las células CD56^{dim} CD16⁺ y las células CD56^{bright}CD16⁻. La primera subpoblación comprende el 90% del total de células NK de sangre periférica y juega un papel importante en los procesos de citotoxicidad natural y citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Por otro lado, las células NK CD56^{bright}CD16⁻ se caracterizan por la producción de citocinas (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) en respuesta a la estimulación.

Esta subpoblación, que comprende solo el 10% del total de células NK de sangre periférica, se localiza principalmente en órganos linfoides secundarios y tejidos no linfoides como el útero, el hígado, el páncreas y el tejido adiposo.

En años recientes se ha evaluado el papel de las ILC en la inflamación crónica y se ha encontrado que pueden contribuir a la patogénesis de aterosclerosis y la resistencia a la insulina. En modelos murinos, se ha encontrado que las ILC1 son residentes del tejido adiposo y que en presencia de IL-12 son activadas llevando a resistencia a la insulina asociada a obesidad, contribuyendo a un estado patológico más que actuar como regulador o protector del tejido (11).

Diversos estudios señalan que las ILC2 contribuyen a la regulación de la adiposidad y el gasto energético. Se ha propuesto que las ILC2 inducen la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos beige mediante la producción de IL-4 e IL-13 (12). Además, se ha reportado que ILC2 residentes del intestino están involucradas en la inducción de la obesidad inducida por la dieta a través de la producción y señalización de IL-2, característica que no es compartida por las ILC2 residentes del tejido adiposo (13).

En comparación con los estudios realizados en modelos murinos para la identificación de las ILC en tejido adiposo, el estudio de las ILC (ILC1, ILC2 y células NK) en este tejido en humanos es reciente. Además, de acuerdo a algunos autores no se ha confirmado si las ILC3 se encuentran en tejido adiposo, si son residentes de tejido o se reclutan de la periferia, y su rol en condiciones de inflamación crónica (14).

En resumen, la existencia de un exceso de tejido adiposo condiciona un desequilibrio e infiltración de células inmunes al mismo tejido, lo que genera una secreción de moléculas proinflamatorias que contribuyen a un proceso de inflamación local y sistémica. Lo anterior aunado a factores de riesgo como la dislipidemia aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (6).

Son pocos los estudios que existen acerca de los diferentes grupos de las ILC y subpoblaciones en tejido adiposo humano, así como su rol y comportamiento en un ambiente de inflamación de bajo grado crónico, siendo uno de ellos y de amplia relevancia epidemiológica y clínica, la dislipidemia. La dislipidemia se ha definido

como un aumento anormal en la concentración de lípidos en plasma. Esta enfermedad multifactorial incrementa el riesgo de presentar alguna enfermedad cardiovascular (ECV), las cuales representan una de las primeras causas de muerte en nuestro país y a nivel mundial (15,16). De acuerdo con la encuesta de salud y nutrición (ENSANUT) del 2018, el 19.5% de la población de 20 años y más presentaron cifras elevadas de colesterol y triglicéridos en México (17). Además, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el año 2018 las enfermedades del corazón y enfermedades cerebrovasculares fueron la 1° y 6° causa de muerte en México y en el estado de San Luis Potosí, representando un 40.5% del total de muertes reportadas en dicho año (18). Con base en lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia y fenotipo de las células NK, ILC1, ILC2 e ILC3 en tejido adiposo y sangre venosa periférica de sujetos sanos y con dislipidemia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos y muestras. Se incluyeron diez individuos que se sometieron a un proceso de abdominoplastia cosmética en hospitales y clínicas privadas (Clínica del Parque, Hospital Ángeles y la clínica de Cirugía Plástica Estética Reconstructiva) de San Luis Potosí, México, durante los meses de febrero a julio del 2021. Las características clínicas se muestran en la **Tabla 1**, los sujetos se dividieron en dos grupos, con y sin dislipidemia, con base en los datos del perfil lipídico recabados de la historia clínica. De cada individuo se obtuvo una muestra de aproximadamente 50 g de tejido adiposo. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis, el cual se llevó a cabo en las primeras 48 horas posteriores a la cirugía. Además, se reclutaron 11 individuos a los que se les tomó una muestra de sangre venosa periférica de 40 ml, tras un ayuno de 8-10 horas. De esta muestra, 30 ml se recolectaron en tubos que contenían EDTA como anticoagulante y 10 ml fue colectada en un tubo rojo. La primera muestra se procesó de manera inmediata para el análisis de las subpoblaciones de ILC y la segunda se envió al Laboratorio de Especialidades Médicas de la Facultad de Medicina de la UASLP para la determinación del perfil de lípidos. Se tomaron medidas antropométricas para evaluar el estado nutricional y la composición corporal. Las características clínicas se describen en la **Tabla 2**, los individuos se dividieron en dos grupos, con y sin dislipidemia, con base en los datos del perfil de lípidos determinado en el Laboratorio de Especialidades Médicas. No se incluyeron individuos con diagnóstico, por historia clínica, de Diabetes Mellitus tipo 2, cáncer, enfermedad tiroidea, enfermedades autoinmunes, infartos previos, infecciones recientes o bajo tratamiento con estatinas. El presente estudio forma parte del proyecto “Identificación de macrófagos metabólicamente activados en tejido adiposo, y evaluación de su posible papel en la diferenciación de adipocitos”, el cual fue aprobado por el Comité de ética de los Servicios de Salud del estado de San Luis Potosí con registro estatal SLP/04-2021. Todos los individuos aceptaron participar de manera voluntaria y firmaron la carta de consentimiento informado.

Puntos de corte para dislipidemia. Para identificar a los individuos con dislipidemia, se utilizaron los puntos de corte del ATP III: colesterol LDL (>130mg/ml), colesterol total (>200mg/dl), colesterol HDL (<40mg/dl hombres, <50mg/dl mujeres), triglicéridos (>150mg/dl) (19).

Aislamiento de células mononucleares a partir de tejido adiposo. Las muestras de tejido adiposo fueron lavadas con solución amortiguadora fosfato salino (PBS) y cortadas en pequeños fragmentos para eliminar el exceso de tejido conectivo, el procedimiento se realizó 3 veces hasta obtener la muestra limpia. A la muestra se le añadió una solución de colagenasa II al 0.03% en medio RPMI (1.5% suero bovino fetal (SBF), 200 µg penicilina/estreptomicina) relación 1:1, y fue incubada en agitación mecánica a 37°C por 1 hora. Posterior a la digestión enzimática se recuperó el precipitado celular, que corresponde a la fracción vascular del estroma (SFV), y se pasó por un filtro celular de 100 µm (FALCON™). Las células mononucleares (CMN) de tejido adiposo se aislaron mediante centrifugación por gradientes de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare, Wilmington, MA, USA). Se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el análisis de la exclusión de azul de tripano por microscopía, obteniendo un porcentaje superior al 85% en todas las muestras.

Aislamiento de células mononucleares de sangre venosa periférica.

Las CMN de sangre venosa periférica (SVP) se aislaron mediante centrifugación por gradientes de densidad con Ficoll-Paque (GE Healthcare, Wilmington, MA, USA). A partir de las CMN se realizó una selección positiva inmunomagnética utilizando el kit II de selección positiva de células humanas CD14 EasySep™ (STEM CELL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células deseadas se marcaron con complejos de anticuerpos anti-CD14 y partículas magnéticas. Las células marcadas magnéticamente se separaron de las células CD14-negativas intactas usando un imán EasySep™. La porción CD14- se utilizó para el análisis de las ILCs mientras que la población CD14+ fue usada para otro estudio. Se evaluó la viabilidad mediante el contador celular CORNING® y el programa CytoSMART™.

La viabilidad celular fue superior al 90% en todas las muestras.

Análisis inmunofenotípico de las subpoblaciones de ILC por citometría de flujo multiparamétrica.

La identificación de subpoblaciones de ILC a partir de CMN de tejido adiposo y de sangre venosa periférica se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo.

En primer lugar, se realizó el bloqueo de receptores Fc mediante la incubación de las CMN con suero autólogo durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, las CMN se incubaron con distintas combinaciones de anticuerpos para la identificación de las diferentes subpoblaciones de ILC: **células NK**: CD3 PerCP, CD56-PE y CD16-FITC; **ILC1 e ILC3**: cocktail de linaje 1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD127-PE-Cy7, CD117-PerCP-eFluor 710 y NKp44 Alexa Fluor 647; **ILC2**: cocktail de linaje 1-FITC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD127-PE-Cy7 y CRTH2 PerCP-Cy5.5. Adicionalmente, para el marcaje de las CMN provenientes de tejido adiposo se agregó un anticuerpo anti-CD45-PE. Transcurrido un periodo de incubación de 30 minutos a 4°C, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con para-formaldehído (PFA) al 1%. De cada marcaje se adquirieron un millón de eventos en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) utilizando el software FACSDiva (Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Finalmente, el análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR). Los niveles de corte para autofluorescencia se definieron con base en la estrategia FMO (fluorescence minus one).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son presentados como mediana y rango intercuartilico. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) y IBM SPSS 22. La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de medias entre grupos se evaluó mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Se evaluó la correlación de los datos

mediante la prueba de correlación de Spearman. Se consideró estadísticamente significativo, valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características clínicas de los sujetos estudiados

Los individuos sometidos a abdominoplastia, de quienes se obtuvo una muestra de tejido adiposo, se dividieron en dos grupos con base en los niveles de colesterol total (CT) de acuerdo con lo descrito en la sección de Material y Métodos: individuos sanos ($n=7$) e individuos con dislipidemia ($n=3$). Las características clínicas se muestran en la **Tabla 1**. Como se esperaba, los niveles de colesterol total fueron significativamente más altos en los pacientes con dislipidemia ($p=0.0218$); sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a la edad y las medidas antropométricas analizadas (peso, talla, IMC).

De igual manera, los individuos de los cuales se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica fueron divididos en dos grupos con base al perfil lipídico: individuos sanos ($n=5$) e individuos con dislipidemia ($n=6$), observándose niveles séricos significativamente más altos de CT, C-LDL y triglicéridos ($p < 0.05$) en el último grupo (**Tabla 2**). La comparación de los grupos respecto a la edad y a los distintos parámetros antropométricos evaluados no mostró diferencias significativas (**Tabla 2**).

Comparación de la frecuencia de subpoblaciones de ILC en muestras de sangre venosa periférica y tejido adiposo de sujetos sanos y con dislipidemia.

Se analizó la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de ILC mediante citometría de flujo. La estrategia de análisis para la sangre venosa periférica se muestra en la **Fig. 1**, la frecuencia de cada subpoblación se estableció con relación a los singletes. En la **Fig. 2** se describe la estrategia de análisis para el tejido adiposo, en este caso el porcentaje de cada subpoblación se estableció con base

en la población de células CD45+. Los datos se reportaron como la mediana y el rango intercuartílico (**Tablas 3 y 4**).

La frecuencia de ILC1 en sangre periférica de individuos con dislipidemia (0.680, [0.453-0.975]) fue menor a la observada en el grupo de sujetos sanos (1.112 [0.617-1.744]); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Fig. 3A, Tabla 3**). En contraste, el análisis en tejido adiposo sugiere que esta subpoblación se encuentra en mayor frecuencia en sujetos con dislipidemia en comparación con los individuos sanos (**Fig. 3B**).

El porcentaje de las subpoblaciones ILC2 e ILC3 en sangre periférica fue similar entre los grupos de individuos sanos y con dislipidemia (**Fig. 4A y Fig. 5A**); mientras que el análisis en tejido adiposo sugiere que estas subpoblaciones de ILCs se encuentran en mayor frecuencia en individuos con dislipidemia en comparación con los sujetos sanos (**Fig. 4B y Fig. 5B**).

Comparación de la frecuencia de células NK en muestras de sangre venosa periférica y tejido adiposo de sujetos sanos y con dislipidemia.

La frecuencia de diferentes subpoblaciones de células NK en las muestras de sangre venosa periférica y de tejido adiposo se evaluó mediante citometría de flujo. En las **figuras 6 y 7**, se describen las estrategias de análisis llevadas a cabo en sangre venosa periférica y tejido adiposo, respectivamente. Se evaluaron las células CD56⁺CD3⁻ y las subpoblaciones: CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁻ y CD56^{dim}CD16⁺. El porcentaje de cada subpoblación se estableció con relación a los singletes, los datos se reportaron como la mediana y el rango intercuartílico (**Tablas 5 y 6**).

La subpoblación de células NK CD56^{dim}CD16⁺ fue la que se encontró en mayor proporción en las muestras de sangre venosa periférica. Se observó una menor frecuencia de esta subpoblación en individuos con dislipidemia (8.48 [4.41-24.41]) en comparación con los sujetos sanos (14.58 [8.22-16.79]); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**Fig. 8A**). La frecuencia de estas

células en tejido adiposo, subpoblación que se observó en menor proporción en este tejido, fue similar entre sujetos con dislipidemia e individuos sanos (**Fig. 8B**).

La frecuencia de las células NK CD56^{dim}CD16⁻ (**Fig. 9**) y CD56^{bright}CD16⁻ (**Fig. 10**) fue similar entre los grupos de individuos sanos y con dislipidemia, tanto en tejido adiposo como en sangre venosa periférica.

Correlación entre el porcentaje de ILC y células NK en tejido adiposo y los parámetros clínicos y de laboratorio.

Además, se analizó si existía correlación entre la frecuencia de ILC y células NK y los parámetros clínicos de los sujetos estudiados (peso, talla, IMC, colesterol total). Como se muestra en la **Fig. 11**, se encontró una correlación negativa entre las células NK CD56⁺CD3⁻ y los niveles séricos de colesterol total ($R = -0.899$, $p = 0.015$), así como entre la subpoblación CD56^{dim}CD16⁻ y los niveles de colesterol total ($R = -0.899$, $p = 0.015$). No se encontró una correlación significativa entre las demás subpoblaciones y los diferentes parámetros clínicos.

Correlación entre la frecuencia de ILC y células NK en sangre periférica y los parámetros clínicos y de laboratorio.

Finalmente, se analizó si existía alguna correlación entre las ILC y las células NK de sangre periférica y los parámetros clínicos evaluados. Como se muestra en la **Fig. 12**, se encontró una correlación significativa entre la frecuencia de algunas subpoblaciones celulares y la circunferencia de cuello (CCu). Se observó una correlación negativa entre el porcentaje de ILC2 y la CCu ($R = -0.673$, $p = 0.023$). Por otro lado, se observó una correlación positiva entre la subpoblación de células NK CD56^{dim}CD16⁺ y la CCu ($R = 0.721$, $p = 0.019$). No se encontró una correlación significativa entre las demás subpoblaciones y los diferentes parámetros clínicos.

DISCUSIÓN

Se ha descrito que las ILC incluyendo las células NK, tienen una participación en la inmunidad innata: son importantes reguladores de la homeostasis tisular, inflamación y reparación (9). El posible papel de estas células en sujetos con dislipidemia, un trastorno de relevancia epidemiológica y clínica, ha sido poco estudiado. El objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia y fenotipo de las células NK, ILC1, ILC2 e ILC3 en tejido adiposo y en sangre venosa periférica de sujetos sanos y con dislipidemia.

Nuestros resultados mostraron la presencia de las diferentes poblaciones de ILC tanto en tejido adiposo como en sangre venosa periférica. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha evaluado a las ILC en presencia de dislipidemia, por lo que nuestros resultados resultan novedosos en este aspecto.

De acuerdo con distintos trabajos realizados, se ha detectado la presencia de ILC1 en tejido adiposo omental e inclusive se ha determinado que existe una mayor frecuencia de estas células en aquellos sujetos con DM2 y obesidad en comparación con aquellos sujetos sin DM2 y con un peso normal (14, 20). En concordancia con nuestros resultados se observó una mayor frecuencia en aquellos sujetos con dislipidemia en comparación con aquellos sanos, aunque no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). La dislipidemia al igual que la DM2 son enfermedades crónicas no trasmisibles que alteran el metabolismo celular y que están relacionadas con la inflamación de bajo grado crónico derivado de la obesidad, en conjunto son factores de riesgo para el desarrollo de ECV (21).

En el estudio realizado por el grupo de Boulenouar y cols. en 2017, evaluaron las células NK ($CD56^+CD3^-$) en tejido adiposo omental y encontraron que los sujetos con obesidad presentaron una menor frecuencia de estas células en comparación con los individuos con normopeso. Además, evaluaron a un grupo de pacientes obesos antes y después de una cirugía bariátrica y observaron que tras la pérdida de peso originada por la disminución en la ingesta calórica hubo un aumento significativo de la frecuencia de células NK en sangre venosa periférica (22). Nuestros resultados coinciden con esta información ya que se observó que las células NK $CD3^-CD56^{total}$ de nuestras muestras (tanto tejido visceral $n=1$, como

subcutáneo n=1) presentaron una menor frecuencia en aquellos sujetos con dislipidemia en comparación con los sanos, aunque no fue estadísticamente significativo ($p > 0.005$). Si bien se ha descrito que las células NK son residentes de tejido adiposo y tienen un papel importante en la inflamación de bajo grado junto con otras células de la inmunidad innata, el número de estas células dependerá del tipo de tejido ya que se ha observado una mayor presencia en tejido adiposo visceral, en comparación con el tejido adiposo subcutáneo (23).

Asimismo, en nuestros resultados se observó una correlación negativa de dos subpoblaciones de células NK con CT. Las células NK tienen un rol importante en enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, y en diferentes enfermedades como la enfermedad arterial del corazón en la cual se ha encontrado una disminución de células NK y a su vez se ha relacionado con la inflamación de bajo grado; donde el CT es una de las causas principales de dicha enfermedad (24). En otro estudio publicado en 2017, Brestoff y cols. mostraron la presencia de ILC2 residentes en tejido adiposo subcutáneo abdominal. Además, describieron que la frecuencia de ILC2 en este tejido se encuentra disminuida en individuos con obesidad en comparación con los sujetos con normopeso (25). En nuestros resultados se puede observar una mayor frecuencia en sujetos con dislipidemia en comparación con los sanos. Cabe recalcar que ningún participante presentó obesidad de acuerdo con la fórmula del IMC, caso contrario a lo que se ha reportado en diferentes estudios. Se ha pronunciado que el tejido adiposo sano contiene de manera normal ILC2 que en conjunto con otras células de la inmunidad innata mantienen un ambiente anti inflamatorio el cual se ve afectado y cambia a pro inflamatorio en presencia de obesidad (23).

En el caso de ILC3, recientemente un estudio identificó su presencia en muestras de tejido adiposo abdominal y tejido adiposo omental (ILC3: CD56⁺ CD127⁺ CRTH2⁺ CD117⁺ NKp44⁺) sin embargo la frecuencia de estas células fue demasiado pequeña en comparación con la frecuencia encontrada en otros tejidos como íleon, colon y yeyuno (26). Nuestros resultados coinciden ya que la frecuencia encontrada de ILC3 en este tipo de tejido es muy pequeña en comparación con las otras poblaciones de ILC. Correspondiente a lo documentado en la literatura, ILC3

se encuentra en mucosas e intestino mayoritariamente (9, 26).

En el caso de las muestras de sangre venosa periférica se ha descrito que de igual manera la frecuencia de ILC1 se ve incrementada en presencia de obesidad y aún más en DM2 (14, 20). De acuerdo a nuestros resultados se observó una mayor frecuencia en aquellos sujetos sanos en comparación con aquellos con dislipidemia, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). De acuerdo con un estudio, las ILC1 de SVP podrían actuar como un marcador circulante de disfunción adiposa y DM2, además de su posible contribución al desarrollo de la DM2 en presencia de obesidad en humanos (14).

En el estudio realizado por Ortega-Rodríguez y cols. en el año 2020 evaluaron la frecuencia de células NK en pacientes que sufrieron infarto agudo al miocardio y observaron que el porcentaje de células NK CD56^{bright} y CD56^{dim} se encuentra aumentado en sangre periférica de individuos con infarto agudo al miocardio (IAM) (27). Además, otro estudio reportó que al evaluar a un grupo de pacientes obesos antes y después de una cirugía bariátrica observaron que tras una pérdida de peso originada por la disminución en la ingesta calórica hubo un aumento significativo de la frecuencia de células NK en sangre venosa periférica (22). En nuestros resultados se observó una menor frecuencia en aquellos sujetos con dislipidemia en comparación con los sanos. Se ha observado que la función citotóxica de las células NK de SVP se encuentra disminuida en presencia de obesidad y que al existir una pérdida de peso se restablece (28).

Asimismo, se observó una correlación negativa de ILC2 con CCu y una correlación positiva en una subpoblación de células NK de igual manera con la CCu. Hasta el momento no hay registros de estudios donde hayan evaluado ILC y su relación con CCu. Sin embargo, la CCu ha sido utilizada como un marcador indirecto, fácil y práctico para evaluar el riesgo cardiovascular en población pediátrica, así como indicador de % grasa corporal y de obesidad en adultos (29).

Otras correlaciones de importancia clínica encontradas en la literatura son: ILC1 de sangre venosa periférica con marcadores de DM2 (HbA1C, glucosa en ayunas, índice HOMA, índice de resistencia a la insulina del tejido adiposo, ácidos grasos libres) (14) y niveles posprandiales de glucosa (20) $p < 0.005$. Y en tejido adiposo:

ILC1 con IMC, índice HOMA e índice de resistencia a la insulina del tejido adiposo (14).

La diferencia de los resultados obtenidos, así como las características de los pacientes realzan la importancia del período subclínico del modelo de la historia natural de la enfermedad. Se ha definido como historia natural de la enfermedad al proceso o evolución que toma una enfermedad en el tiempo. Dentro de dicho modelo se considera los diferentes períodos, antes de la enfermedad, durante y su posible desenlace; así como los niveles de prevención para dichos períodos. Dentro de estos períodos, se ha demostrado que existe un estado preclínico donde los agentes causantes de las enfermedades han interactuado con el ambiente y el individuo y el resultado de esta interacción genera cambios traducidos como daños y modificaciones a nivel tisular aún sin causar signos y síntomas en el individuo (30). Al analizar cuantitativamente nuestros resultados podrían no mostrar resultados consistentes, sin embargo, al realizar un análisis más descriptivo nos permite reafirmar que los daños en tejidos ocurren de manera más rápida en comparación con la sangre periférica y que, aunque solo se padezca con alguna patología (dislipidemia) sin algún otro factor de riesgo asociado (obesidad) ya existen cambios que alteran la homeostasis. Resaltando así que existen marcadores de daño tisular temprano en tejido adiposo y las ILC son uno de ellos.

CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias al evaluar las subpoblaciones de ILC en sangre venosa periférica entre los sujetos sanos y aquellos con dislipidemia. Sin embargo, el estudio descriptivo de estas poblaciones muestra diferencias en el tejido adiposo entre los dos grupos de estudio. Asimismo, a diferencia de otros estudios se analizó y se identificó la presencia de ILC3 en tejido adiposo.

Dentro de las principales fortalezas de este estudio fue contar con muestras provenientes de sujetos en etapa temprana del curso natural de la enfermedad, lo que realza la importancia de la detección de ILC en tejido adiposo como marcadores potenciales de daño tisular temprano.

REFERENCIAS

1. Cinti S. The adipose organ at a glance. *Diseases Models & Mechanisms*. 2012; 5: 588-594
2. Thyagarajan B, Foster MT. Being of White adipose tissue as a therapeutic strategy for weight lost in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2017; 20170016
3. Giralt M, Villarroya F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions?. *Endocrinology*. 2013, 154(9): 2992-3000
4. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015, 309: E691-E714.
5. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *Journal of Endocrinology*. 2014; 222:3. R113-R127
6. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular Research*, 2017. 113: 1009-1023
7. Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016. 138 (5); 1265-1276.
8. Montaldo E, Vacca P, Vitale C, Moretta F, Locatelli F, Mongari MC, et al. Human innate lymphoid cells. *Immunology letters*. 2016. 179: 2-8.
9. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G. Innate lymphoid cells: 10 years on. *Cell*. 2018. 174: 1054-1066.
10. Nagasawa M, Spits H, Romero-Ros X. Innate lymphoid cells (ILCs): cytokine hubs regulating immunity and Tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. doi: 10.1101/cshperspect.a030304
11. O'Sullivan TE, Rapp M, Fan X, Weizman O-E, Bhardwaj P, Adams NM, et al. Adipose-resident group 1 innate lymphoid cells promote obesity-associated insulin resistance. *Immunity*. 2016. 45: 428-441.

12. Lee MW, Odegaard JI, Mukundan L, Qiu Y, Molofsky AB, Nussbaum JC. Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*. 2015. 160 (0): 74-87.
13. Sasaki T, Moro K, Kubota T, Kubota N, Kato T, Ohno H, et al. Innate lymphoid cells in the induction of obesity. *Cell Reports*. 2019. 28: 202-217.
14. Wang H, Shen L, Liu F, Feng W, Jiang C, Chu X, et al. Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity. *Nature communications*. 2019, 10:3254
15. Rivas-Gomez B, Almeda-Valdéz P, Tussié-Luna MT, Aguilar-Salinas CA. Dyslipidemia in Mexico, a call for action. *Rev Invest Clin*. 2018; 70:2011-6
16. Canalizo-Miranda E, Favela-Pérez E, Salas-Anaya JA, Gómez-Díaz R, Jara-Espino R, Torres-Arreola LdelP, et al. Diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2013; 51(6): 700-9
17. Romero-Martínez M, Shamah T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: presentación de resultados. *Salud Publica Mex*. 2019;61(1):917-23.7
18. INEGI, (2019). Nota técnica sobre las estadísticas de defunciones registradas 2018. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/mortalidad/doc/defunciones_registradas_2018_nota_tecnica.pdf
19. Lippy RJ. The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *J Manag Care Pharm*. 2003;9 (1 Suppl):2-5. doi: 10.18553/jmcp.2003.9.s1.2
20. Liu F, et al. Type 1 innate lymphoid cells are associated with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.08.005>
21. She Y, Mangat R, Tsai S, Proctor SD, Richard C. The Interplay of Obesity, Dyslipidemia and Immune Dysfunction: A Brief Overview on Pathophysiology, Animal Models, and Nutritional Modulation. *Front. Nutr*. 2022; 9:840209. doi: 10.3389/fnut.2022.840209

22. Boulenouar S, Michelet X, Duquette D, Alvarez D, Hogan AE, Dold C, et al. Adipose type one innate lymphoid cells regulate macrophage homeostasis through targeted cytotoxicity. *Immunity*, 2017;46:273-286.
23. Michailidou Z, Gomez-Salazar M, Alexaki VI. Innate immune cells in the adipose tissue in health and metabolic disease. *J Innate Immun*. 2022; 14:4-30.
24. Backetman K, Ernerudh J, Jonasson L. Natural killer (NK) cell déficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2013; 175:104-112
25. Brestoff JR, Kim BS, Saenz SA, Stine RR, Monticelli LA, Sonnenberg GF. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of adipose and limit obesity. *Nature*, 2015. 519 (7542): 242-246
26. Yudanin NA, Schmitz F, Flamar AL, Thome J, Tait-Wojno E, Moeller JB, et al. Spatial and temporal mapping of human innate lymphoid cells reveals elements of tissue specificity. *Immunity*. 2019; 50(2): 505–519.e4.
27. Ortega-Rodríguez AC, Marín-Jáuregui LS, Martínez-Shio E, Hernández-Castro B, González-Amaro R, Escobedo-Uribe CD, et al. Altered NK cell receptor repertoire and function of natural killer cells in patients with acute myocardial infarction: A three-month follow-up study. *Immunobiology*. 2020; 225(3): 151909
28. O'Rourke RW, Gaston GD, Meyer KA, White AE, Marks DL. Adipose tissue NK cells manifest an activated phenotype in human obesity. *Metabolism*. 2013; 62(11).
29. Hingorjo MR, Qureshi MA, Mehdi A. Neck circumference as a useful marker of obesity: a comparison with body mass index and waist circumference. *J Pak Med Assoc*. 2012;62: 36–40
30. Organización Panamericana de la Salud. Módulos de principios de epidemiología para el control de enfermedades (MOPECE): Unidad 2: Salud y enfermedad en la población. 2011: 2da Edición.

TABLAS

Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio de individuos de quienes se obtuvo una muestra de tejido adiposo.

Parámetro	Individuos sanos	Individuos con dislipidemia	<i>p</i>
n	7	3	-
Edad (años)	41.0 (28.0-45.0)	47.0 (45.0-67.0)	0.0657
Sexo (M/F)	0/7	2/1	-
Peso (kg)	66.1 (57.5-74.0)	73.0 (65.0-81.5)	0.3605
Talla (m)	1.62 (1.58-1.63)	1.64 (1.58-1.68)	0.3545
IMC (kg/m²)	25.2 (23.0-29.2)	28.9 (24.2-29.2)	0.4928
CT (mg/dl)	122.0 (117.0-126.0)	219.0 (219.0-236.0)	0.0218

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney. IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total.

Tabla 2. Características clínicas y de laboratorio de individuos de quienes se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica.

Parámetro	Individuos sanos	Individuos con dislipidemia	<i>p</i>
n	5	6	-
Edad (años)	31.0 (26.5-47.0)	50.5 (30.7-52.2)	0.3602
Sexo (M/F)	3/2	1/5	-
Peso (kg)	68.20 (60.5-78.8)	64.5 (56.9-89.1)	0.9307
Talla (m)	1.69 (1.58-1.73)	1.65 (1.60-1.70)	0.8545
IMC (kg/m²)	24.2 (22.3-27.7)	24.6 (21.2-30.5)	1.0
CC (cm)	82.8 (74.8-89.8)	84.5 (78.9-101.3)	0.6623
CCu (cm)	36.5 (33.0-38.3)	35.1 (32.1-39.1)	0.9307
Grasa (%)	24.5 (19.2-38.0)	34.9 (27.5-40.9)	0.2468
Músculo (%)	37.0 (30.1-40.3)	27.0 (22.9-30.0)	0.0823
Grasa visceral (in)	6.0 (4.0-9.0)	8.0 (4.5-12.0)	0.6466
CT (mg/dl)	140.0 (130.5-158.0)	227.0 (207.8-261.0)	0.0043
C-HDL (mg/dl)	66.8 (45.3-79.3)	62.45 (35.7-71.1)	0.7922
C-LDL (mg/dl)	62.7 (59.6-79.3)	148.0 (104.1-178.2)	0.0043
TG (mg/dl)	104.0 (78.5-112.0)	175.0 (116.5-212.0)	0.0303

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney. IMC: índice de masa corporal; CC: circunferencia de cintura; CCu: circunferencia de cuello; CT: colesterol total; C-HDL: colesterol HDL; C-LDL: colesterol LDL; TG: triglicéridos.

Tabla 3. Comparación del porcentaje de ILC en muestras de sangre venosa periférica de individuos sanos y con dislipidemia.

Parámetro	Individuos sanos	Individuos con dislipidemia	<i>p</i>
n	5	6	
ILC1 (NKp44⁺)	0.120 (0.099-0.293)	0.115 (0.053-0.172)	0.5368
ILC1 (NKp44⁻)	0.998 (0.479-1.477)	0.572 (0.417-0.832)	0.4286
ILC2 (CRTH2⁺)	0.171 (0.096-0.286)	0.144 (0.063-0.190)	0.6623
ILC3 (NKp44⁺)	0.012 (0.005-0.024)	0.011 (0.007-0.019)	0.7922
ILC3 (NKp44⁻)	0.114 (0.060-0.140)	0.105 (0.069-0.138)	0.9307

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney.

Tabla 4. Comparación del porcentaje de ILC en muestras de tejido adiposo de individuos sanos y con dislipidemia.

Subpoblación de ILC	Individuos Sanos n=3	Individuos con dislipidemia n=2	<i>p</i>
ILC1 (CD127⁺CD117⁻)	0.710 (0.370-1.185)	1.226 (0.721-1.731)	0.400
ILC2 (CD127⁺CRTH2⁺)	0.072 (0.047-0.190)	0.099 (0.096-0.102)	0.800
ILC3 (CD127⁺CD117⁻)	0.022 (0.004-0.039)	0.164 (0.009-0.320)	0.800

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney.

Tabla 5. Comparación del porcentaje de células NK en muestras de sangre venosa periférica de individuos sanos y con dislipidemia.

Parámetro	Individuos sanos	Individuos con dislipidemia	<i>p</i>
n	5	5	-
CD56^{total}	16.40 (8.72-19.70)	7.99 (5.61-11.27)	0.190
CD56^{bright}CD16⁻	0.21 (0.12-0.30)	0.19 (0.13-0.23)	0.904
CD56^{dim}CD16⁻	0.08 (0.06-0.19)	0.07 (0.01-0.08)	0.685
CD56^{dim}CD16⁺	14.58 (8.22-16.79)	8.48 (4.41-24.41)	0.420

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney

Tabla 6. Comparación del porcentaje de células NK en muestras de tejido adiposo de individuos sanos y con dislipidemia.

Subpoblación de células NK	Individuos Sanos (n=4)	Individuos con dislipidemia (n=2)	<i>p</i>
CD56⁺ CD3⁻	0.760 (0.449-1.252)	0.475 (0.298-0.652)	0.266
CD56^{bright} CD16⁻	0.188 (0.173-0.288)	0.257 (0.184-0.288)	0.555
CD56^{dim} CD16⁻	0.168 (0.105-0.370)	0.292 (0.164-0.529)	0.485
CD56^{dim} CD16⁺	0.059 (0.003-0.088)	0.035 (0.029-0.042)	0.800

Los datos se presentan como la mediana y el rango intercuartílico. El análisis se llevó a cabo mediante U de Mann Whitney.

PIES DE FIGURA

Figura 1. Estrategia análisis de ILC en muestras de sangre periférica por citometría de flujo. La identificación de las subpoblaciones de ILC a partir de CMN de sangre periférica se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron con base en los parámetros de tamaño y complejidad, y se identificaron los singletes. Posteriormente, se seleccionó la población de células LIN⁻CD127⁺ y a partir de ésta se identificaron las poblaciones CD117⁻ (ILC1) y CD117⁺ (ILC3). La población de ILC2 fue definida como CRTH2⁺.

Figura 2. Estrategia de análisis de ILC en muestras de tejido adiposo por citometría de flujo. La identificación de las subpoblaciones de ILC a partir de CMN de tejido adiposo se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron con base en los parámetros de tamaño y complejidad, se identificaron los singletes y a partir de éstos la población CD45⁺. Posteriormente, se seleccionaron las células LIN-CD127⁺ y a partir de éstas se identificaron las poblaciones CD117⁻ (ILC1) y CD117⁺ (ILC3). La población de ILC2 fue definida como CRTH2⁺.

Figura 3. Comparación del porcentaje de ILC1 en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos. La frecuencia de la subpoblación de ILC1 (LIN⁻CD127⁺CD117⁻) en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de ILC1 en sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. $P > 0.05$. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de ILC1 en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 4. Comparación de la frecuencia de ILC2 en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos. La frecuencia de la subpoblación de ILC2 (LIN⁻CD127⁺CRTH2⁺) en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de ILC2 en

sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. $P > 0.05$. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de ILC2 en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 5. Comparación del porcentaje de ILC3 en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos.

La frecuencia de la subpoblación de ILC3 (LIN⁻CD127⁺CD117⁺) en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de ILC3 en sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. $P > 0.05$. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de ILC3 en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 6. Estrategia de análisis de las células NK en muestras de sangre periférica.

La identificación de subpoblaciones de células NK a partir de CMN de sangre periférica se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron con base en los parámetros de tamaño y complejidad, se identificaron los singletes y a partir de éstos la población CD3⁻. Posteriormente, se seleccionaron las células CD56⁺ y se identificaron diferentes subpoblaciones de células NK con base en la expresión de CD56 y CD16: CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁻ y CD56^{dim}CD16⁺.

Figura 7. Estrategia de análisis de las células NK en muestras de tejido adiposo.

La identificación de subpoblaciones de células NK a partir de CMN de tejido adiposo se llevó a cabo mediante un análisis multiparamétrico por citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron con base en los parámetros de tamaño y complejidad, se identificaron los singletes y a partir de éstos la población CD3⁻. Posteriormente, se seleccionaron las células CD56⁺ y se identificaron diferentes subpoblaciones de células NK con base en la expresión de CD56 y CD16: CD56^{bright}CD16⁻, CD56^{dim}CD16⁻ y CD56^{dim}CD16⁺.

Figura 8. Comparación del porcentaje de células NK CD56^{dim} CD16⁺ en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos.

La frecuencia de la subpoblación de células NK

CD56^{dim} CD16⁺ en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁺ en sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. P>0.05. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de células NK CD56^{dim} CD16⁺ en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 9. Comparación de la frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁻ en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos. La frecuencia de la subpoblación células NK CD56^{dim} CD16⁻ en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁻ en sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. P>0.05. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de células NK CD56^{dim} CD16⁻ en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 10. Comparación del porcentaje de células NK CD56^{bright} CD16⁻ en muestras sangre venosa periférica y de tejido adiposo de individuos con dislipidemia y sujetos sanos. La frecuencia de la subpoblación de células NK CD56^{bright} CD16⁻ en las muestras de sangre periférica y tejido adiposo fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Frecuencia de células NK CD56^{bright} CD16⁻ en sangre periférica de individuos sanos y con dislipidemia. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. P>0.05. **B)** Diagramas de puntos representativos del análisis de células NK CD56^{bright} CD16⁻ en tejido adiposo de un sujeto sano y uno con dislipidemia.

Figura 11. Comparación del porcentaje de células NK en muestras de sangre periférica de individuos con dislipidemia y sujetos control. La frecuencia de diferentes subpoblaciones de células NK en las muestras de sangre periférica de sujetos control y con dislipidemia fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. Se muestran las

subpoblaciones: **A)** CD56⁺CD3⁻, **B)** CD56^{bright}CD16⁻, **C)** CD56^{dim}CD16⁻ y **D)** CD56^{dim}CD16⁺. Los datos son presentados como porcentaje de los singletes. Se muestra la mediana y el rango intercuartílico. Sanos: n=5, dislipidemia: n=5. $p \geq 0.05$ en todos los casos.

Figura 12. Análisis de correlación entre el porcentaje de ILC y de células NK de sangre periférica y los parámetros clínicos. La frecuencia de diferentes subpoblaciones de ILC y células NK en las muestras de sangre periférica de sujetos control y con dislipidemia fue determinada por citometría de flujo multiparamétrica, como se describió anteriormente. **A)** Análisis de correlación entre el porcentaje de células NK CD56⁺CD3⁻ y la circunferencia de cuello. **B)** Análisis de correlación entre el porcentaje de células NK CD56^{dim}CD16⁺ y la circunferencia de cuello. El análisis se llevó a cabo mediante la prueba de correlación de Spearman, se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$. CCu: circunferencia de cuello.

Figura 1.

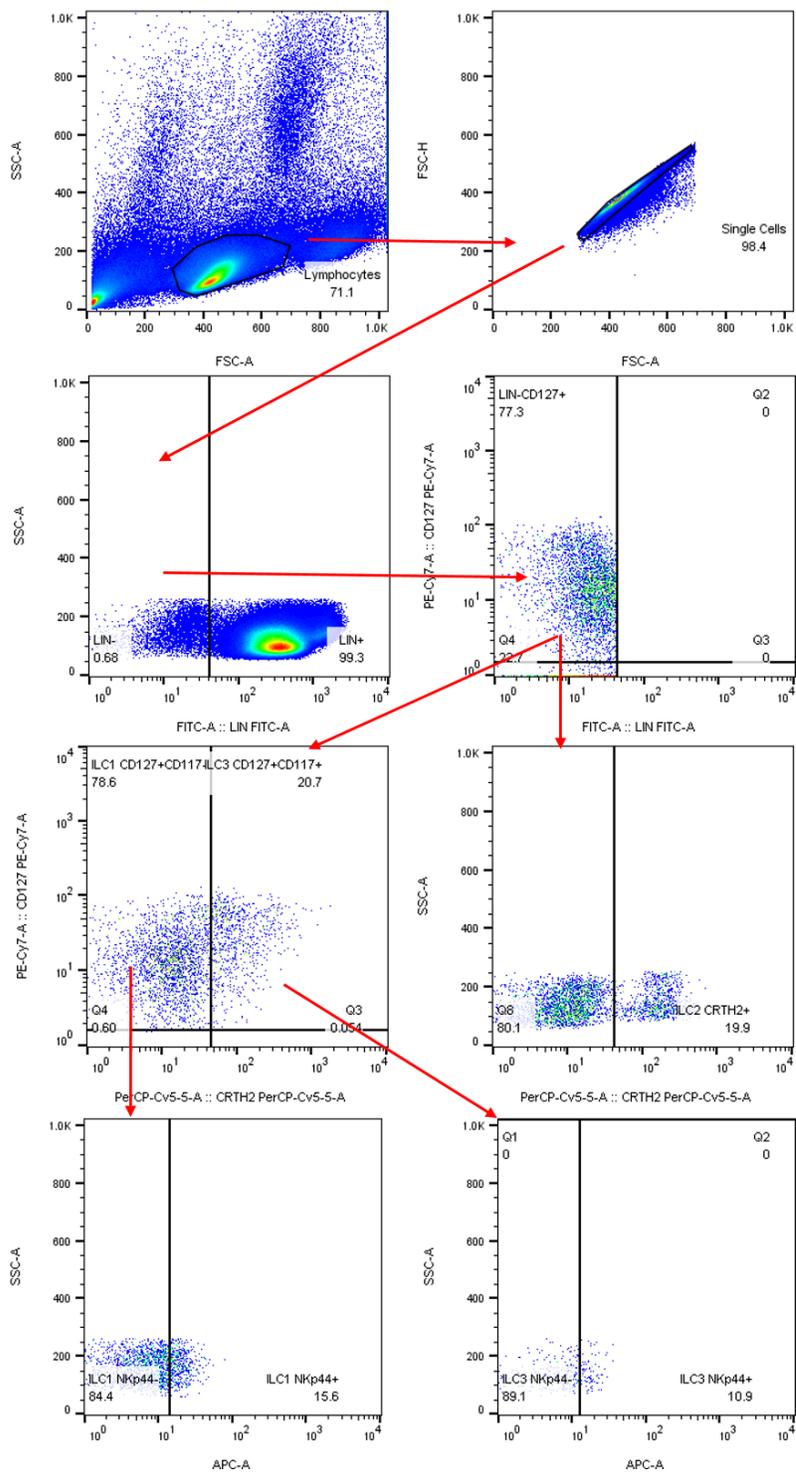


Figura 2.

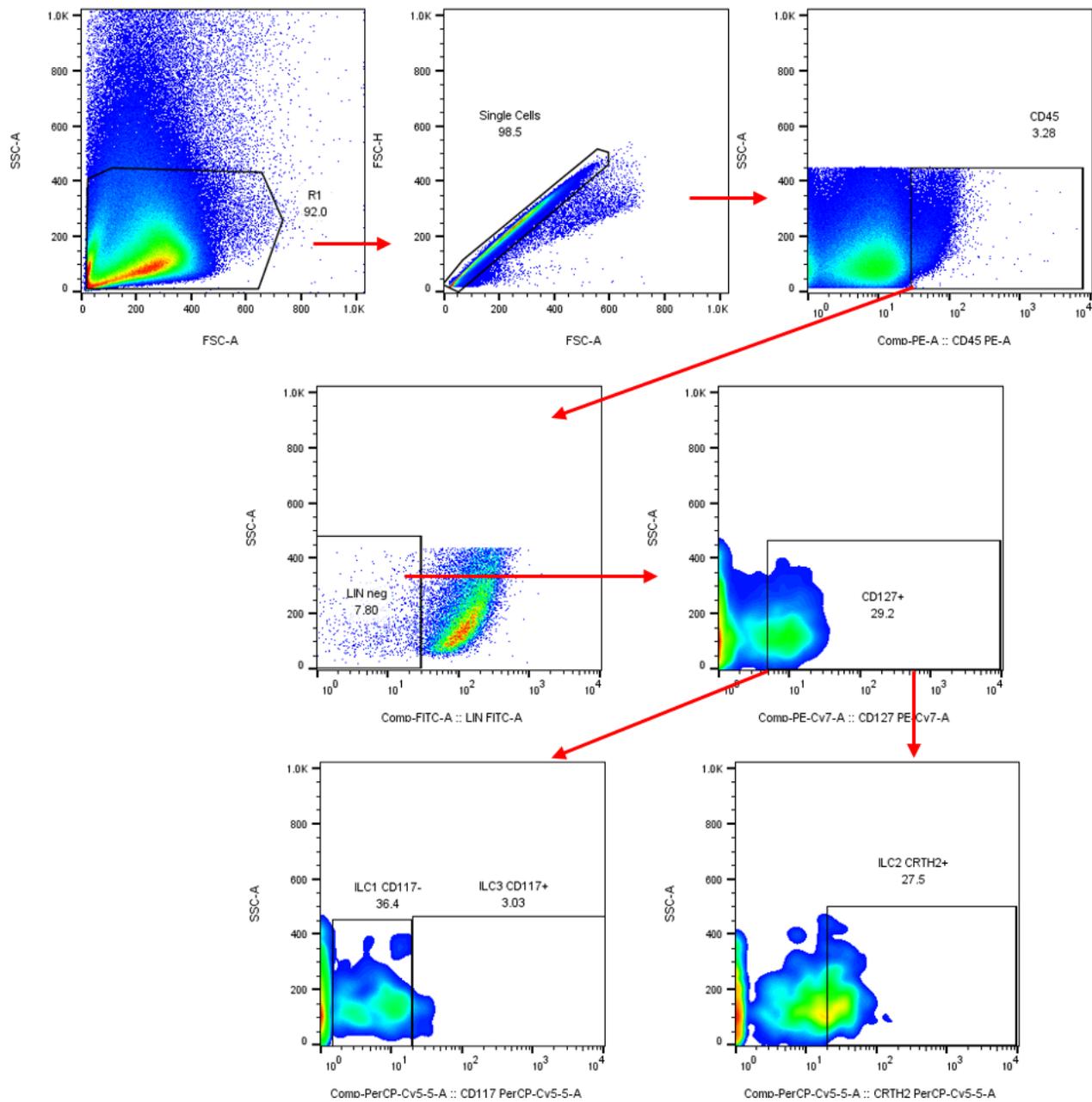


Figura 3.

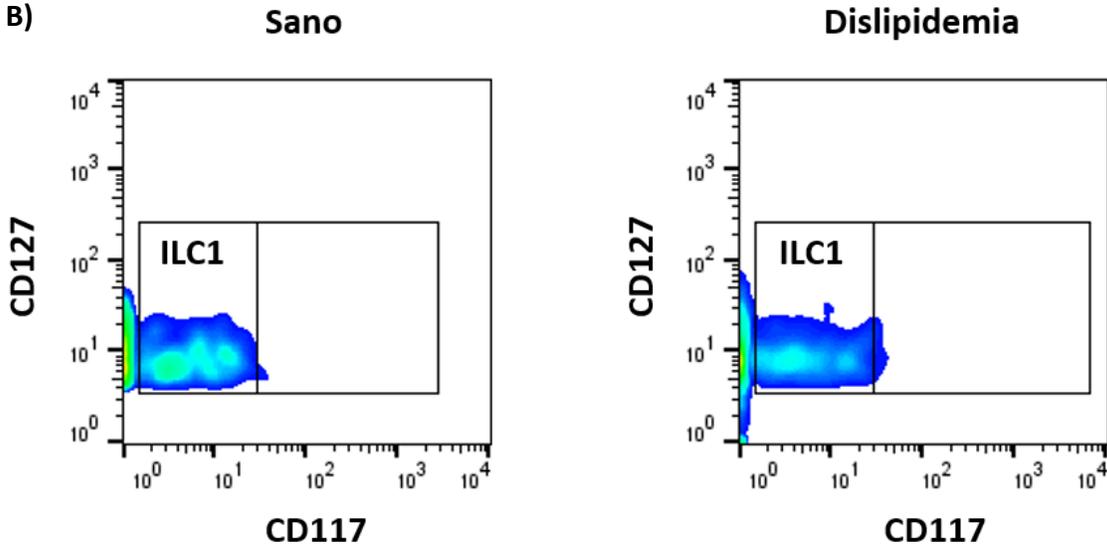
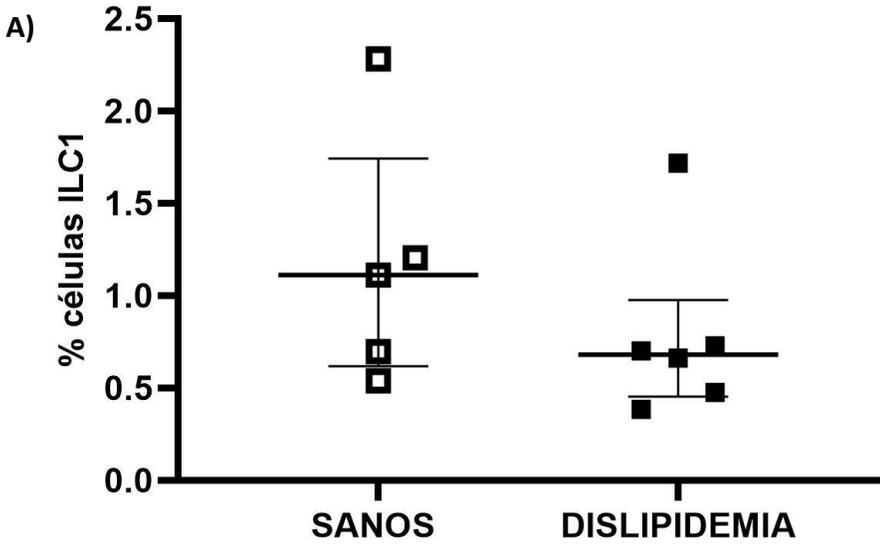


Figura 4.

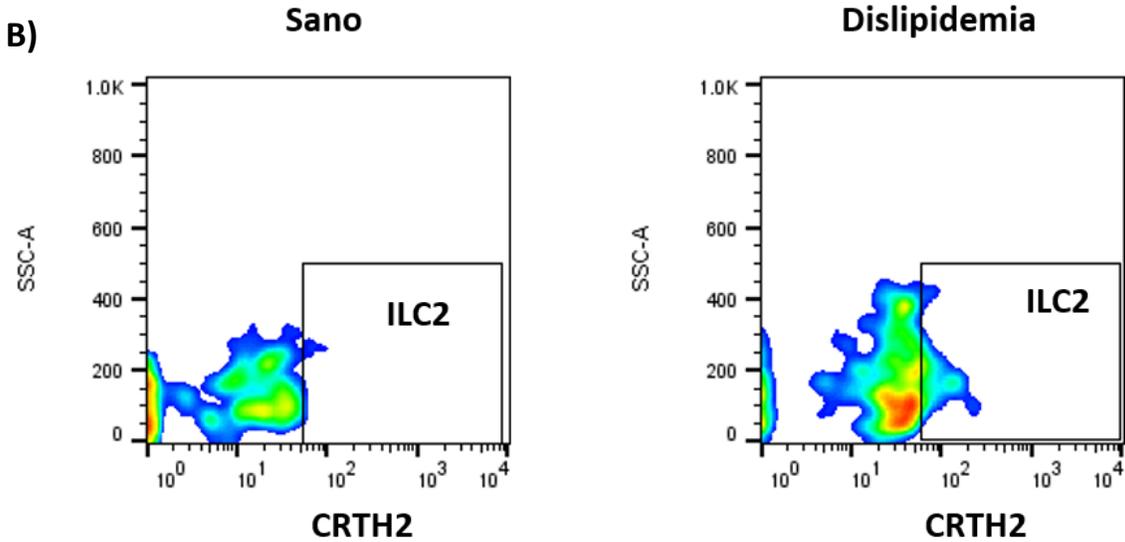
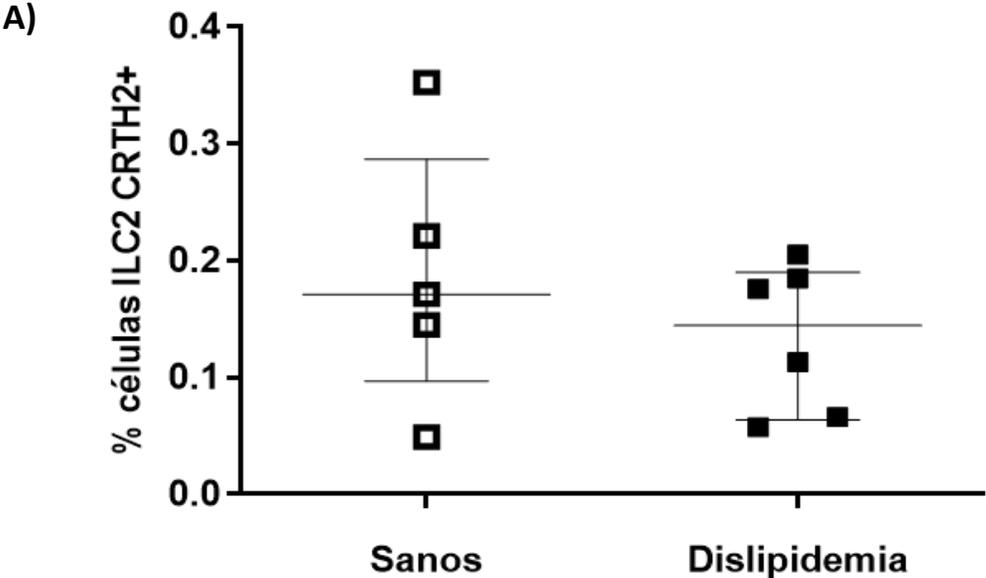


Figura 5.

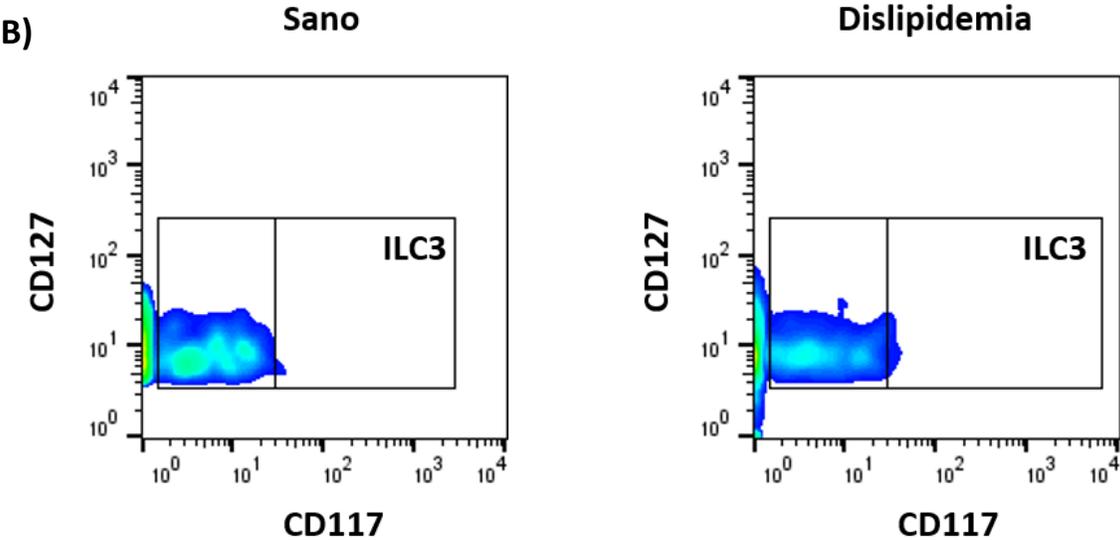
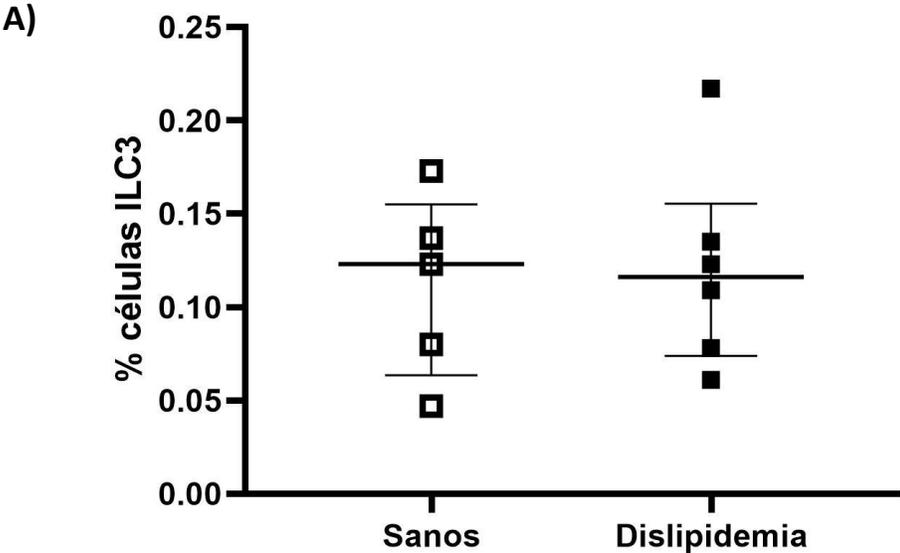


Figura 6.

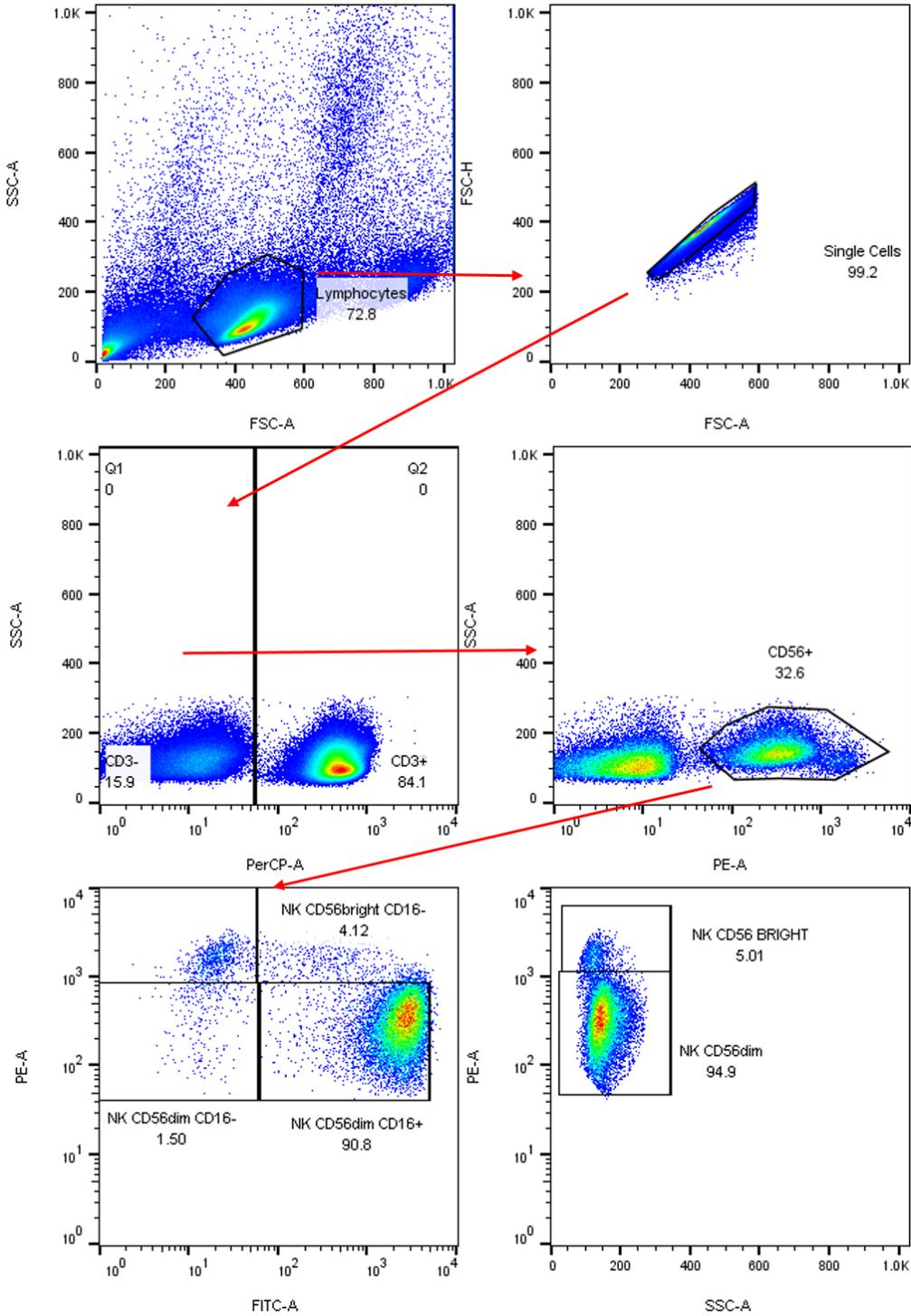


Figura 7.

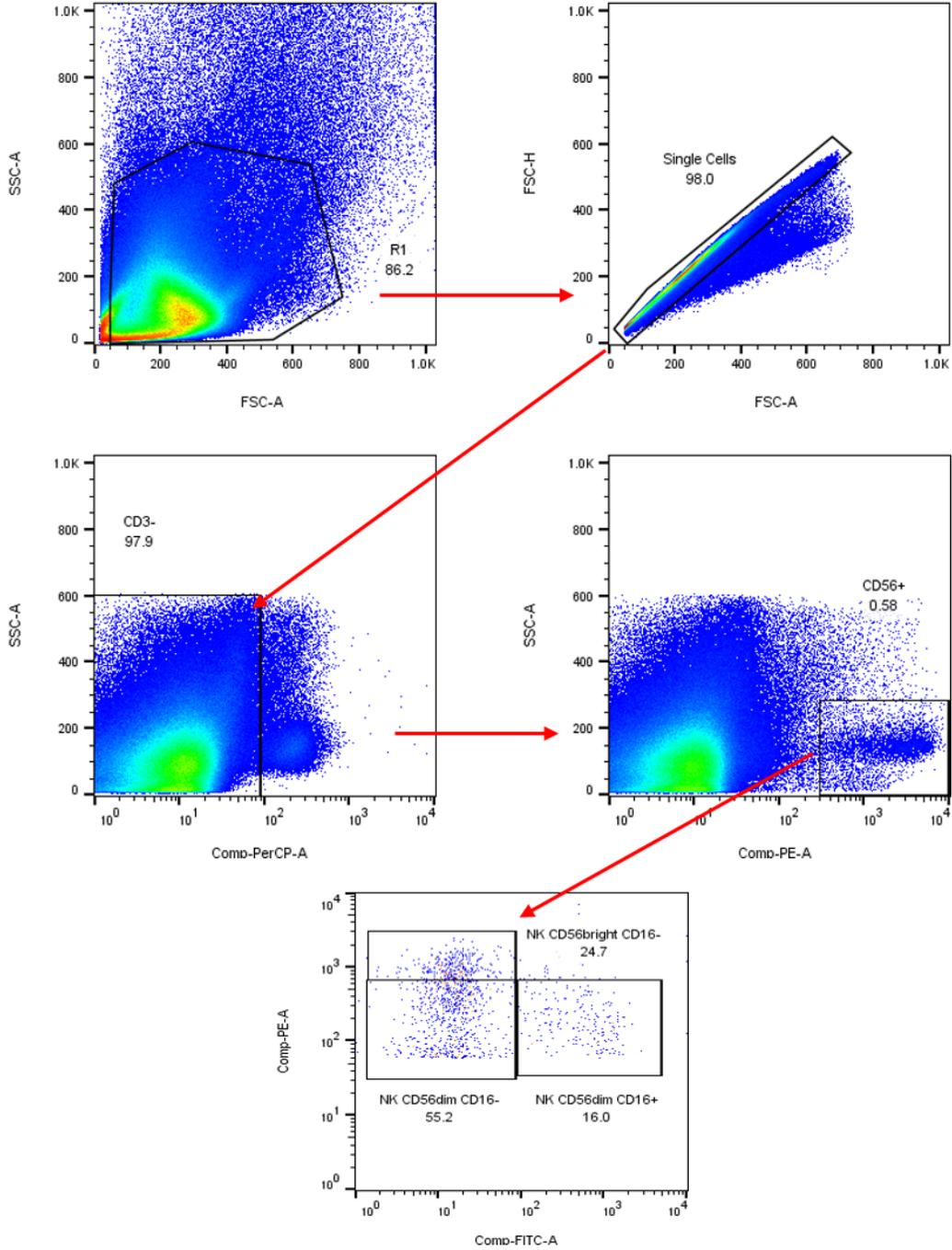


Figura 8.

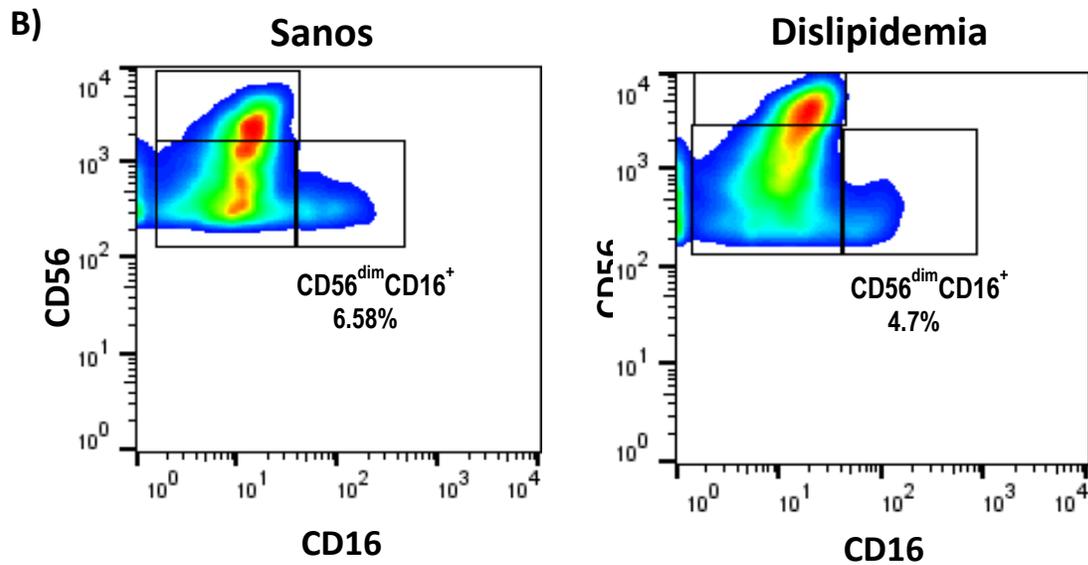
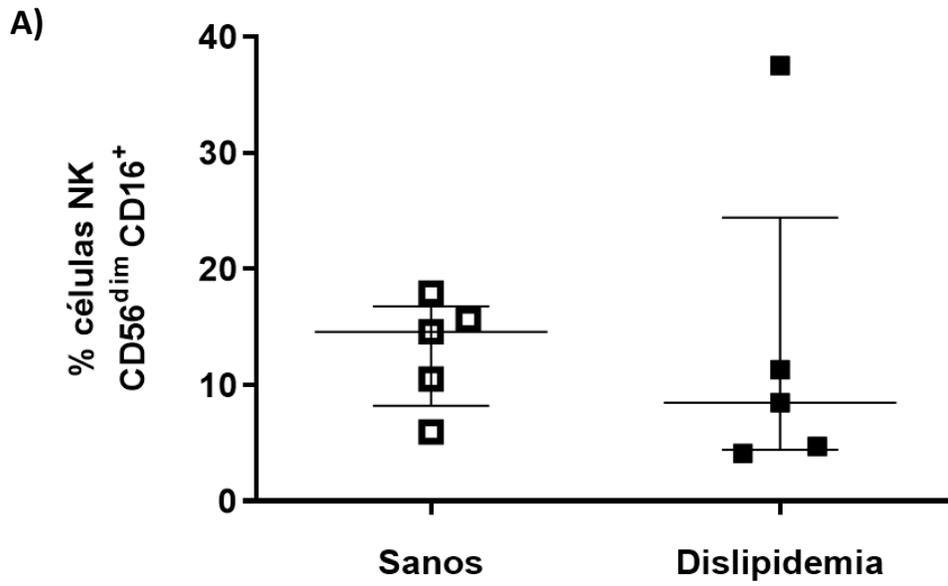


Figura 9

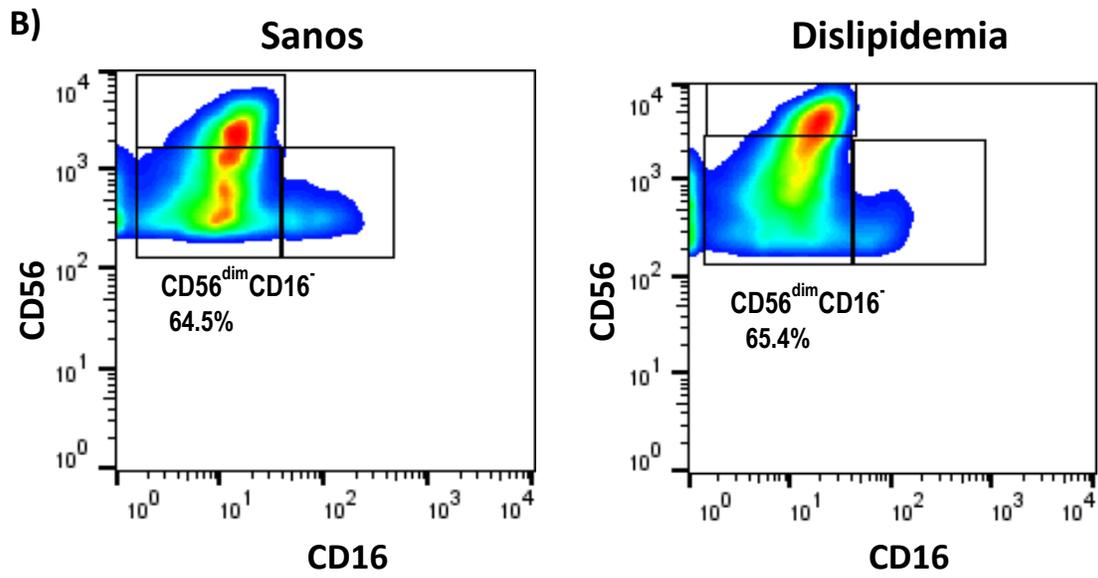
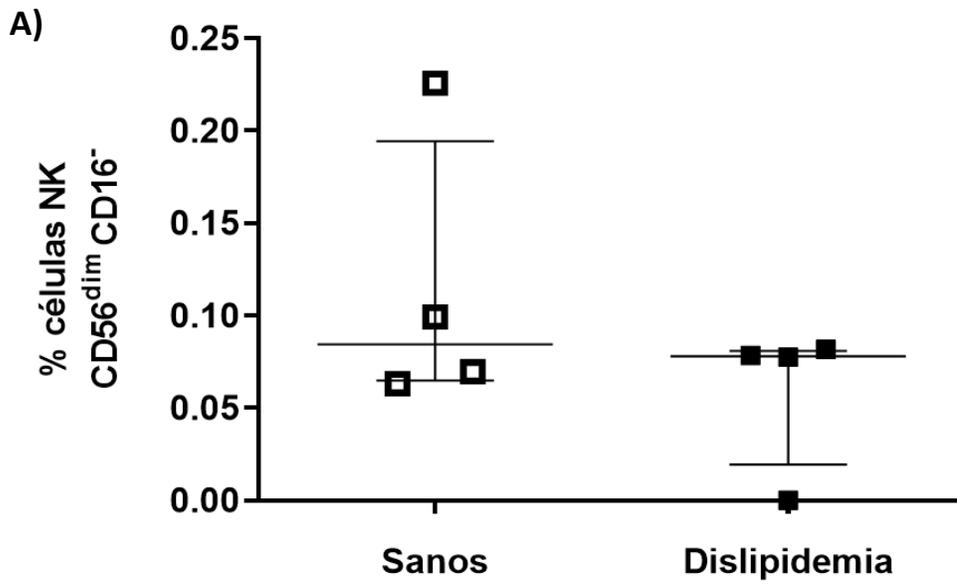


Figura 10

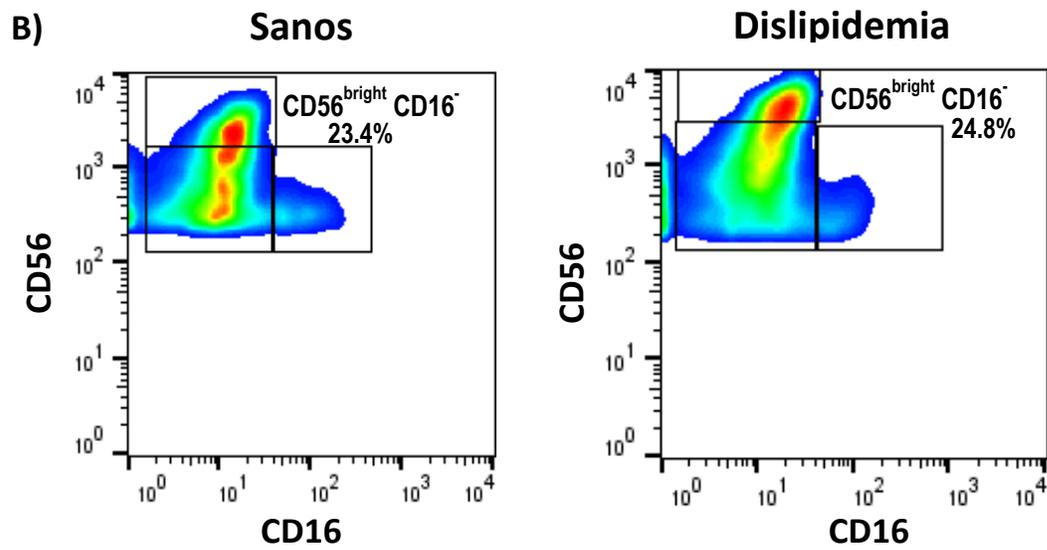
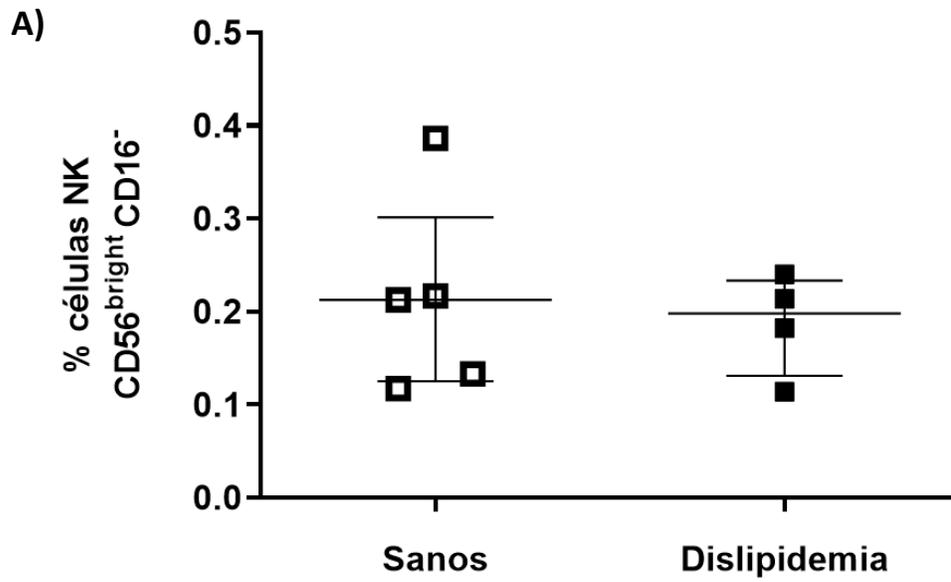


Figura 11

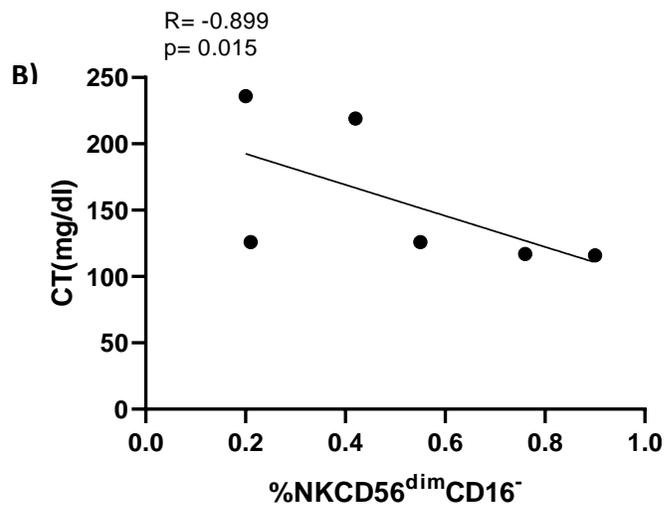
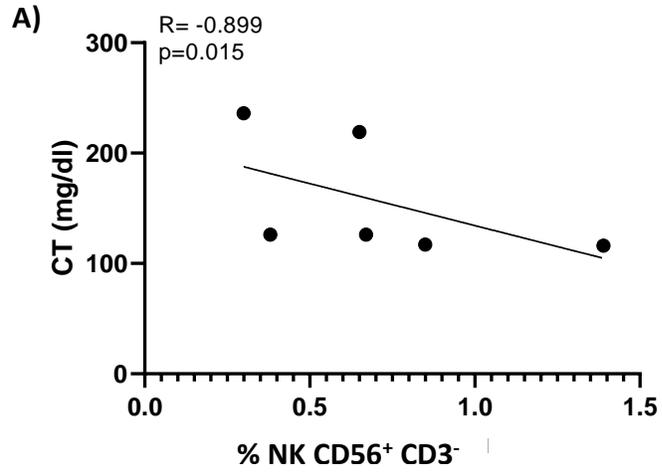


Figura 12

