



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Departamento de Farmacología

Programa de Doctorado: Medicina (3042)

Tesis Doctoral

**“Estudio de la interacción leucocito-endotelio en
niños obesos”**

Presentada por:

D. Miguel Marti Masanet

Licenciado en Medicina

Dirigida por:

Prof^a Pilar Codoñer Franch

Prof. Juan Vicente Esplugues Mota

Dra. Ángeles Álvarez Ribelles

Mayo, 2017



Programa de Doctorado: Medicina (3042)

Tesis Doctoral

“Estudio de la interacción leucocito-endotelio en niños obesos”

Presentada por:

D. Miguel Marti Masanet

Licenciado en Medicina

Facultad de Medicina y Odontología

Universitat de València

Mayo, 2017



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Departamento de Farmacología

Facultad de Medicina y Odontología

**“Estudio de la interacción leucocito-endotelio en
niños obesos”**

Presentada por:

D. Miguel Marti Masanet

Licenciado en Medicina

Dirigida por:

Prof^a Pilar Codoñer Franch

Prof. Juan Vicente Esplugues Mota

Dra. Ángeles Álvarez Ribelles



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Departamento de Farmacología

Dña. Pilar Codoñer Franch, Profesora Titular de Universidad adscrita al Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València,

D. Juan Vicente Esplugues Mota, Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Farmacología de la Universitat de València,

Dña. Ángeles Álvarez Ribelles, Personal Investigador Doctor Indefinido adscrita al Departamento de Farmacología de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE:

El trabajo presentado por el Licenciado en Medicina **D. Miguel Martí Masanet** titulado “**Estudio de la interacción leucocito-endotelio en niños obesos**” ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología y en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Valencia, a 10 de Mayo de 2017.

Fdo.

Dra. Pilar Codoñer Franch

Dr. Juan Vicente Esplugues Mota

Dra. Ángeles Álvarez Ribelles

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la financiación de los proyectos:

PI11/00327, del Plan Nacional I+D+I (2008-2011). Fondo de Investigación Sanitaria (proyectos de Investigación en Salud).

PROMETEO/2010/060, de la Conselleria d' Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana.

PROMETEO II/2014/035, de la Conselleria d' Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana.

SAF2015-67678-R. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos”

(del libro “El Principito”)

“Alzaos una y otra vez hasta que los corderos se vuelvan leones”

(de la película “Robin Hood”, 2010)

A mis padres, a mis abuelos, al resto de mi familia y a Paula;

Por estar a mi lado en cada momento.

A Sara Serra;

Eres un ejemplo de lucha y superación para todos nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar lo que sientes con palabras escritas cuando tienes tanto que agradecer después de haber llevado a cabo un trabajo de varios años en el que han intervenido muchas personas, cada una de ellas aportando su granito de arena para que este proyecto saliese adelante. Cuando a principios de la residencia surgió la idea, parecía algo imposible. Y, en verdad, ha sido un camino duro, pues he de reconocer que no ha sido nada fácil compaginar mi trabajo como pediatra (sobre todo, el periodo de formación de la residencia) con el desarrollo de esta Tesis doctoral. Si a las guardias, las horas de consulta, las horas de estudio, el estrés de la práctica clínica diaria... les añades un proyecto de investigación de estas características, el resultado son muchas horas extras con mucho esfuerzo físico y psicológico. Pero echo la mirada atrás y veo donde estoy ahora y me doy cuenta que ha valido la pena. Me acuerdo ahora de una frase que me dijeron un día durante la residencia: “no hay guardia que dure eternamente, todas acaban terminando”; porque eso mismo ha pasado con esta Tesis: por muy duro que haya sido el camino, hemos perseverado en el proyecto hasta el final y ahora llegan sus frutos. Por eso tengo tanto que agradecer.

A mis directores de tesis: Pilar Codoñer, Juan Vicente Esplugues y Ángeles Álvarez. Gracias por haberme empujado a iniciar este proyecto. De vosotros surgió la idea y la posibilidad de realizar algo que todavía nadie había hecho en niños. Gracias por vuestra paciencia, vuestros consejos y vuestras directrices para que el camino que iba siguiendo fuese el correcto. Gracias por hacer posible y ser el soporte para que esta Tesis pudiese ver la luz.

Como he dicho, el desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido un camino duro. Un camino que me hubiese sido imposible recorrer sin la ayuda de mi padre. Si hay una persona a quien más que a nadie le tengo que agradecer todo el esfuerzo dedicado para que este proyecto haya llegado a buen puerto es a él. Siempre se dice que cualquier padre haría lo que fuese por su hijo. Pero lo que él se ha implicado en esta Tesis va más allá de esta frase. Porque el sobreesfuerzo y las innumerables preocupaciones que le han generado este trabajo durante estos años, todo lo que ha aguantado simplemente por mí, es algo impagable y a lo que cualquier palabra de agradecimiento se queda corta. Si en algún momento de este camino he llegado a caer, su ejemplo me ha

ayudado a levantarme. Esta Tesis no solo es mía, también es de mi padre. Es y será un referente para mí.

Quiero también aprovechar para agradecer, no sólo a mi padre, sino a toda mi familia el apoyo durante todo este tiempo y por haber creído en mí. Han aguantado injustamente muchos ratos de mal humor y, a pesar de ello, siempre han estado ahí. Gracias a mi padre y a mi madre por haberme enseñado a ser quien soy y a ser siempre responsable con aquello con lo que me comprometo. Gracias a ello he podido llegar a conseguir los objetivos que me he ido proponiendo. Y no me quiero olvidar de mi tía Dora, a quien también tengo que agradecerle enormemente su participación directa en este proyecto.

A Paula, gracias también por haber estado a mi lado y por haber sabido disculpar mis ausencias (y mis ratos de mal humor, que también injustamente le ha tocado vivir algunos). Mi trabajo como pediatra y la Tesis Doctoral me han quitado mucho tiempo de estar con ella. Su apoyo, su cariño, su saber esperar... todo ello también me ha servido para seguir adelante y levantarme cuando podía caer.

Gracias a todos mis compañeros y compañeras pediatras, tanto residentes como adjuntos, tanto de mi época de residente en el Hospital Dr. Peset como de mi actual lugar de trabajo en la Unidad de Reumatología Pediátrica del Hospital La Fe. Gracias a todos y cada uno de vosotros y vosotras que me habéis enseñado tanto, cada día sigo aprendiendo más. Gracias por haber sabido perdonar mis despistes y mis “ausencias” por culpa de la Tesis. Gracias por cada una de vuestras palabras de apoyo y ánimo. Y gracias especialmente a las/los adjuntas/os que me habéis ayudado a conseguir reclutar los pacientes para este proyecto (espero no haberme dejado a nadie y si lo he hecho, disculpad mi error): Pilar Codoñer, Raquel Simó, Pascual Barona, Miguel Gracia, Miguel Tortajada, Raquel Pina y Sara Pons.

Gracias por su colaboración a todo el equipo de Matronas del servicio de Ginecología (por soportar al “pesado” de Miguel pidiendo cordones umbilicales) y al equipo de enfermería de Consultas Externas de Pediatría del hospital Dr. Peset (Fina, Belén y Geno).

Gracias a todas las personas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina que, directa o indirectamente, han colaborado en este proyecto y nos han ayudado a llevarlo a cabo. Gracias al mismo

Departamento por haberme abierto sus puertas para poder llevarlo a cabo. Especial mención quiero hacer a Samu, otra de las personas a quien tanto tengo que agradecer. Él ha sido la persona que en su día me enseñó la técnica que hemos utilizado en este trabajo y quien se ha encargado de procesar las muestras de citometría. Gracias Samu por tu enorme paciencia y por haber estado ahí cuando te necesitábamos.

Y por último, y no menos importante, gracias a todos los niños y niñas (y a sus padres) que han aceptado participar en esta Tesis Doctoral. La investigación científica es la base para el avance de la medicina y ellos han sabido entenderlo.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxiribonucleico
AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGL: Ácidos Grasos Libres
AHA: American Heart Association”
Apo A1: Apolipoproteína A1
Apo B: Apolipoproteína B
ApoE: Apolipoproteína E
CRAMP: “Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide”
DM: Diabetes Mellitus
DPBS: “Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
EBM-2: “Endothelial cell Basal Medium-2”
EDTA: “Ethylenediaminetetraacetic Acid sodium salt”
EGM-2: “Endothelial Growth Medium-2”
ERN: Especie Reactiva de Nitrógeno
ERO: Especie Reactiva de Oxígeno
ESL-1: “E-Selectin Ligand-1”
FGIR: “Fasting Glucose to fasting Insulin Ratio”
FITC: Fluoresceína Isotiocianato
GGT: Gamma Glutamil Transpeptidasa
GLUT4: “Glucose Transporter type-4”
GOT: Glutamato Oxalacetato Transaminasa
GPT: Glutamato Piruvato Transaminasa
gp150.95: “Integrin AlphaX”
HBSS: “Hanks Balanced Salt Solution”
HDL: “High-Density Lipoprotein”
HEPES: “4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic acid”
hFGF-B: “Human Fibroblast Growth Factor-Basic”
HOMA-IR: “Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance”
HSA: “Human Serum Albumin”
HSL: Hormone-Sensitive Lipase”
HTA: Hipertensión Arterial
HUVEC: “Human Umbilical Vein Endothelial Cell”
ICAM-1: “Intercellular Cell Adhesion Molecule-1”
ICAM-2: “Intercellular Cell Adhesion Molecule-2”

IDF: “International Diabetes Federation”
IFN-1: “Interferon type I”
IL-1 β : Interleucina-1 β
IL-6: Interleucina-6
IMC: Índice de Masa Corporal
JAM-A: “Junctional Adhesion Molecule A”
JAM-C: “Junctional Adhesion Molecule C”
JNK-1: “c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1”
LDL: “Low-Density Lipoprotein”
LFA-1: “Lymphocyte Function-associated Antigen 1”
Mac-1: “Macrophage 1 antigen”
MAdCAM-1: “Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule-1”
MAP4K4: “Mitogen-Activated Protein Kinase 4”
MCP-1: “Monocyte Chemoattractant Protein-1”
NF- $\kappa\beta$: “Nuclear Factor- $\kappa\beta$ ”
NK: “Natural Killer cells”
OMS: Organización Mundial de Salud
PAF: “Platelet Activating Factor”
PBMC: “Peripheral Blood Mononuclear Cells”
PBS: “Phosphate Buffered Saline”
PCRus: Proteína C Reactiva ultrasensible o de alta sensibilidad
PE: Ficoeritrina
PECAM-1: “Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1”
PMN: “Polymorphonuclear Cells”
PPAR γ : “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ”
PSGL-1: “P-Selectin Glycoprotein Ligand-1”
PTOG: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index”
RBP4: “Retinol Binding Protein 4”
rhEGF: “Human Recombinant Epidermal Growth Factor”
R³-IGF-1: “Recombinant long R³ Insulin-like Growth Factor-1”
RPMI: “Roswell Park Memorial Institute”
SAOS: Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño
sICAM-1: “soluble Intercellular Cell Adhesion Molecule-1”
sVCAM-1: “soluble Vascular Cell-Adhesion Molecule-1”
TNF- α : “Tumor Necrosis Factor- α ”
TSH: “Thyroid-Stimulating Hormone”

VCAM-1: “Vascular Cell-Adhesion Molecule-1

VEGF: “Vascular Endothelial Growth Factor”

VLDL: “Very Low-Density Lipoprotein”

VLA-4: “Very Late Antigen-4”

z-IMC: Índice de masa corporal expresado de forma estandarizada

FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Separación de los eritrocitos del resto de componentes celulares por el tratamiento de la sangre completa con Dextrano.

Figura 2. Separación de los leucocitos (PBMC y PMN) por centrifugación y gradiente de densidad.

Figura 3. Manipulación del cordón umbilical.

Figura 4. Frasco de cultivo.

Figura 5. Monocapa de células endoteliales.

Figura 6. Placa de cultivo.

Figura 7. Cámara paralela de flujo abierta.

Figura 8. Cámara paralela de flujo cerrada.

Figura 9. Cámara paralela de flujo montada sobre la pletina del microscopio.

Figura 10. Montaje completo del sistema de cámara paralela de flujo.

Figura 11. Fases de la interacción leucocito-endotelio.

Figura 12. Imágenes representativas de la monocapa de células HUVEC.

Figura 13. Citómetro de flujo.

Figura 14. Histograma representativo de las diferentes poblaciones de leucocitos.

Figura 15. Edad de los grupos experimentales.

Figura 16. Estadío Tanner de los grupos experimentales.

Figura 17. Distribución del grupo estudio.

Figura 18. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y los restantes parámetros antropométricos.

Figura 19. Valores de diversos parámetros del metabolismo hidrocarbonado en los grupos experimentales.

Figura 20. Valores de diversos parámetros del metabolismo lipídico en los grupos experimentales.

Figura 21. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y los parámetros del metabolismo hidrocarbonado y lipídico.

Figura 22. Valores séricos de diversas proteínas específicas en los grupos experimentales.

Figura 23. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y las proteínas específicas.

Figura 24. Valores del hierro sérico en los grupos experimentales.

Figura 25. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y el hierro sérico.

Figura 26. Valores de la concentración plasmática de ácido úrico en los grupos experimentales.

Figura 27. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y la concentración plasmática de ácido úrico.

Figura 28. Valores de la concentración plasmática de diversos parámetros indicadores de la función hepática en los grupos experimentales.

Figura 29. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y la concentración plasmática de GGT.

Figura 30. Valores séricos de TSH en los grupos experimentales.

Figura 31. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y la concentración plasmática de TSH.

Figura 32. Valores en sangre del número absoluto de leucocitos totales, neutrófilos y monocitos en los grupos experimentales.

Figura 33. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y el número absoluto de leucocitos totales y neutrófilos.

Figura 34 y 35. Valores de la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos experimentales.

Figura 36. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el z-IMC y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN a las HUVEC.

Figura 37 y 38. Valores de la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos experimentales.

Figura 39. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación entre el porcentaje de masa grasa y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC a las HUVEC.

TABLAS

Tabla 1. Distribución de edad de los grupos experimentales.

Tabla 2 y 3. Resultados antropométricos y de la exploración física de los grupos experimentales.

Tabla 4. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos.

Tabla 5 y 6. Resultados de la evaluación de diversos parámetros representativos del metabolismo hidrocarbonado y lipídico en los grupos experimentales.

Tabla 7. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos y HOMA y diversos parámetros representativos del metabolismo hidrocarbonado y lipídico.

Tabla 8 y 9. Resultados de la evaluación de los valores séricos de determinadas proteínas específicas en los grupos experimentales.

Tabla 10. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos y determinadas proteínas específicas.

Tabla 11 y 12. Resultados de la evaluación de la concentración plasmática de determinados minerales en los grupos experimentales.

Tabla 13. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos, PCRus y la concentración plasmática de hierro.

Tabla 14 y 15. Resultados de la evaluación de la concentración plasmática de diversos parámetros indicadores de la función renal en los grupos experimentales.

Tabla 16. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos, HOMA y la concentración plasmática de ácido úrico.

Tabla 17 y 18. Resultados de la evaluación de la concentración plasmática de diversos parámetros indicadores de la función hepática en los grupos experimentales.

Tabla 19. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos y la concentración plasmática de GGT.

Tabla 20 y 21. Resultados de la evaluación de los niveles séricos homocisteína, ácido fólico y TSH en los grupos experimentales.

Tabla 22 y 23. Resultados de la evaluación en sangre de diversos parámetros hematológicos en los grupos experimentales.

Tabla 24. Coeficiente de correlación entre los parámetros antropométricos y los valores en sangre del número absoluto de leucocitos totales, neutrófilos y monocitos.

Tabla 25 y 26. Resultados de la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos experimentales.

Tabla 27 y 28. Coeficiente de correlación entre parámetros antropométricos y analíticos y velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN a las HUVEC.

Tabla 29 y 30. Resultados de la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos experimentales.

Tabla 31 y 32. Coeficiente de correlación entre parámetros antropométricos y analíticos y velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC a las HUVEC.

Tabla 33. Expresión de las moléculas de adhesión estudiadas en las 3 poblaciones leucocitarias evaluadas.

RESUMEN

Se ha descrito que la obesidad infantil conlleva una serie de alteraciones metabólicas que pueden generar a nivel vascular una respuesta inflamatoria crónica de baja intensidad y subclínica, que podría ser la base de un proceso aterosclerótico responsable del desarrollo precoz de enfermedades cardiovasculares.

Teniendo en cuenta que este tipo de respuesta se inicia con la interacción entre células leucocitarias y el endotelio, el objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar de forma directa, en un modelo experimental “in vitro”, el comportamiento de la interacción entre leucocitos y células endoteliales en muestras de sangre de niños y niñas con sobrepeso u obesidad, en comparación con un grupo control, y evaluar su posible relación con diversos parámetros antropométricos y analíticos, especialmente aquellos que se han asociado con alteraciones cardiometabólicas y de respuesta inflamatoria.

Hemos observado que la muestra de población pediátrica estudiada con sobrepeso/obesidad, en comparación con el grupo control, presenta un incremento del Índice de Masa Corporal (IMC) que se correlaciona positivamente con el porcentaje de masa grasa y ambos con el perímetro de la cintura, lo cual nos indica que el aumento de peso es debido a una mayor adiposidad visceral y no a un incremento de la masa magra. Estos parámetros se correlacionan con un incremento de la presión arterial, fundamentalmente sistólica, pero manteniéndose dentro de los límites considerados de normalidad para la edad.

Los pacientes con exceso de peso, en relación con los controles, muestran a nivel sanguíneo una alteración en diversos biomarcadores considerados de riesgo cardiometabólico y de respuesta inflamatoria, como son: incremento de la concentración plasmática de insulina y de resistencia a la acción de esta hormona (medida a través del índice HOMA); aumento de los niveles de triglicéridos, VLDL-colesterol, Proteína C Reactiva de alta sensibilidad (PCRus), proteína fijadora de retinol (RBP4), ácido úrico, TSH, GGT y número de leucocitos y neutrófilos; y reducción de los valores séricos de HDL-colesterol, hierro y GOT. En la mayor parte de los casos, los parámetros antropométricos citados se correlacionan con estas variables analíticas.

Al estudiar “in vitro” la interacción entre los leucocitos de los niños con sobrepeso/obesidad y una monocapa de células endoteliales (HUVEC, “Human Umbilical Vein Endothelial Cells”), comparándolos con el comportamiento de los leucocitos del grupo control, observamos que tanto los PMN (“Polymorphonuclear Cells”) como los PBMC (“Peripheral Blood Mononuclear Cells”) presentan una reducción en la velocidad de rodamiento y un incremento del rodamiento y la adhesión sobre las células endoteliales. El análisis de estos resultados en función del género nos muestra que las modificaciones se generan de forma similar en niños y en niñas.

Los parámetros antropométricos, indicadores de resistencia a insulina y de respuesta inflamatoria (en especial, PCRus y hierro sérico) presentan, salvo alguna excepción puntual, una correlación con los parámetros evaluados de la interacción leucocito-endotelio (velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión) en los leucocitos PMN; mientras que en los PBMC sólo se observa esta relación con las variables antropométricas y con la PCRus, con alguna excepción.

El análisis de la expresión de diversas moléculas de adhesión en las células leucocitarias de los niños con sobrepeso/obesidad, en relación con los controles, sólo muestra una ligera tendencia a la reducción de la L-selectina, sobre todo en los neutrófilos.

Todos estos datos nos demuestran, como conclusión general, que la situación de sobrepeso/obesidad en la edad infantil y sus complicaciones (donde tiene un lugar destacado la resistencia a la insulina) se asocian a una respuesta inflamatoria subclínica y crónica, que se inicia a nivel vascular con la interacción fundamentalmente entre neutrófilos (como leucocitos principalmente implicados en estos primeros estadios) y células endoteliales; lo cual indica que los niños y adolescentes con estas características están predispuestos al desarrollo precoz de patologías de base aterosclerótica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Complicaciones de la obesidad	4
1.1.1. Resistencia a la insulina	5
1.1.1.1. Métodos para medir la resistencia a la insulina	8
1.1.2. Relación obesidad visceral – perímetro cintura	9
1.2. La respuesta inflamatoria	10
1.2.1. Interacción leucocito-endotelio	10
1.3. Obesidad, aterosclerosis e inflamación	14
1.3.1. Obesidad y estrés oxidativo	17
1.3.2. Patogénesis de la aterosclerosis: Base inflamatoria	19
1.3.2.1. El papel de los neutrófilos	20
1.3.3. Obesidad infantil e inflamación	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1. Diseño del estudio	31
3.2. Parámetros determinados	33
3.2.1. Parámetros antropométricos	33
3.2.2. Parámetros analíticos	34
3.2.2.1. Bioquímica clínica	35
3.2.2.1.1. Variables del metabolismo hidrocarbonado	35
3.2.2.1.2. Variables del metabolismo lipídico	35
3.2.2.1.3. Variables relacionadas con determinadas proteínas específicas	35
3.2.2.1.4. Otros parámetros analíticos	36
3.2.2.2. Parámetros hematológicos	37
3.3. Estudios “in vitro”	38

3.3.1. Materiales y equipos utilizados	38
3.3.1.1. Reactivos	38
3.3.1.2. Aparatos	40
3.3.1.3. Otros materiales	42
3.3.2. Metodología	43
3.3.2.1. Aislamiento y cultivo de los distintos tipos de células	43
3.3.2.1.1. Células leucocitarias	43
3.3.2.1.1.1. Leucocitos mononucleares (PBMC)	45
3.3.2.1.1.2. Leucocitos polimorfonucleares (PMN)	45
3.3.2.1.2. Células endoteliales	45
3.3.2.2. Estudio de la interacción leucocito-endotelio mediante el sistema “in vitro” de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo ...	49
3.3.2.2.1. Parámetros de la interacción leucocito-endotelio	52
3.3.2.2.1.1. Velocidad de rodamiento leucocitario	53
3.3.2.2.1.2. Rodamiento leucocitario	53
3.3.2.2.1.3. Adhesión leucocitaria	53
3.3.2.3. Estudio de la expresión de moléculas de adhesión por citometría de flujo	54
3.4. Análisis estadístico de los resultados	57
4. RESULTADOS	59
4.1. Descripción de la muestra de población estudiada	61
4.2. Resultados de la exploración física y de los parámetros antropométricos	64
4.3. Evaluación de los parámetros analíticos	67
4.3.1. Bioquímica clínica	67
4.3.1.1. Metabolismo hidrocarbonado y lipídico	67
4.3.1.2. Proteínas específicas	74
4.3.1.3. Minerales	77
4.3.1.4. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal	79
4.3.1.5. Parámetros bioquímicos relacionados con la función hepática ..	82

4.3.1.6. Otros parámetros bioquímicos	85
4.3.2. Parámetros hematológicos	87
4.4. Estudios “in vitro”	91
4.4.1. Estudio de la interacción leucocito-endotelio	91
4.4.1.1. Estudio con los leucocitos polimorfonucleares (PMN)	91
4.4.1.1.1. Análisis de la relación entre parámetros antropométricos y analíticos y los de la interacción PMN-endotelio	95
4.4.1.1.1.1. Parámetros antropométricos	95
4.4.1.1.1.2. Parámetros analíticos	97
4.4.1.2. Estudio con los leucocitos mononucleares (PBMC)	99
4.4.1.2.1. Análisis de la relación entre parámetros antropométricos y analíticos y los de la interacción PBMC-endotelio	102
4.4.1.2.1.1. Parámetros antropométricos	102
4.4.1.2.1.2. Parámetros analíticos	104
4.4.2. Estudio de la expresión de moléculas de adhesión	105
4.5. Discusión de los resultados	107
4.5.1. Parámetros antropométricos y clínicos	108
4.5.2. Estudio “in vitro” de la interacción leucocito-endotelio	120
5. CONCLUSIONES	129
6. BIBLIOGRAFIA	133

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad constituye actualmente un serio problema de salud pública con un impacto en la sociedad que ha ido aumentando de forma alarmante en las últimas décadas. De hecho, el ascenso rápido de las cifras ha llevado a que algunos organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), la hayan catalogado como “la epidemia del siglo XXI”. Preocupan especialmente las elevadas cifras en la población infantil, ya que alertan de los graves problemas de salud y pérdida de calidad de vida que esta población experimentará cuando sea adulta, con el consiguiente aumento de los costes sanitarios que tendrán que afrontar las administraciones públicas (1-2).

A nivel mundial, mientras en los países más desarrollados se ha ido observando una estabilización de los datos de sobrepeso y obesidad infantil (que siguen siendo elevados), en los países en vías de desarrollo (sobre todo Asia y África) las cifras han experimentado un aumento mayor y más rápido. La OMS estimó que en 2014 habría en el mundo unos 41 millones de niños menores de 5 años con exceso de peso (3).

En España, el estudio ALADINO (Alimentación, Actividad física, Desarrollo Infantil y Obesidad), enmarcado dentro de la estrategia NAOS (Nutrición, Actividad física y prevención de la Obesidad) del Ministerio de Sanidad, en su fase para los años 2010-2011, reveló las cifras de exceso de peso (sobrepeso + obesidad) para la población infantil española (analizando datos de niños/as de edades entre 6 y 9 años), obteniéndose unos resultados que variaban, según las tablas de crecimiento que se utilizasen, entre 30.8 % y 44.5% (14 %-26.2 % con sobrepeso y 11 %-18.3 % con obesidad) (1). En una fase posterior llevada a cabo en el año 2013 (analizando niños/as de 7 y 8 años), la prevalencia de exceso de peso hallada se encontraba entre el 26.8 % y 43 % (13.6 %-24.6 % con sobrepeso y 5.4 %-18.4 % con obesidad) (4). Se observa, pues, una estabilización de las cifras entre las dos fases del estudio, algo que también ocurre al comparar los resultados del estudio enKid (1998-2000) (5) con los del mencionado ALADINO 2013 (utilizando en ambos casos los criterios de la Fundación Orbegozo de 1988), obteniéndose una prevalencia del exceso de peso en escolares de 30.4 % y 28.6 %, respectivamente. Esto supone que, aunque los datos siguen siendo

preocupantes, hay motivos esperanzadores para seguir investigando y actuando sobre este problema.

1.1. COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD

El exceso de peso en la edad pediátrica no sólo se asocia con un mayor riesgo de padecer obesidad en la edad adulta (6-7) y, en general, menor esperanza y calidad de vida (8-10), sino que implica la aparición de múltiples complicaciones asociadas, tanto de forma precoz como a largo plazo (que posteriormente, en el adulto, se agravarán). Éstas afectan a todos los sistemas del organismo, debiendo resaltar las alteraciones cardiovasculares y endocrinas (donde destacan el síndrome metabólico, la aterosclerosis y la Diabetes Mellitus -DM- tipo 2), pero incluyendo también trastornos digestivos (como cálculos biliares, pancreatitis, o esteatosis hepática), respiratorios (por ejemplo, agravamiento del asma y síndrome de apnea obstructiva del sueño -SAOS-), e incluso problemas ortopédicos (como pie plano o mayor riesgo de epifisiolisis de cabeza femoral) y alteraciones psicológicas y del sueño (10-14).

El concepto de síndrome metabólico en el adulto está bien definido por la asociación de varios factores que suponen un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular y de DM tipo 2, pero en la edad pediátrica todavía no existen unos criterios claramente establecidos para su diagnóstico (15). Por ello, las cifras epidemiológicas pueden variar de unos estudios a otros, aunque en términos generales se ha observado que son altas en la población pediátrica obesa, con una prevalencia alrededor de un 20-40 % pero que puede llegar hasta el 60 % en algunas series de casos publicadas (15-16).

Cuando se habla de síndrome metabólico, en los niños se incluyen un conjunto de alteraciones, como trastornos del metabolismo hidrocarbonado, dislipemia e hipertensión arterial (HTA), entre otros, en las que está sumamente probado que la obesidad y la resistencia a la insulina tienen un papel central en su desarrollo (17-18). Todas ellas preceden a la progresión hacia una DM tipo 2 y enfermedades cardiovasculares de base aterosclerótica (19).

La HTA tiene un papel fisiopatológico importante dentro del síndrome metabólico por el daño vascular que conlleva (además de que en sí misma es

causa de alteraciones en otros órganos como el corazón o el riñón). Son diversos los mecanismos a través de los cuales la obesidad genera un aumento de la presión arterial: el incremento del tono simpático, la insulinoresistencia y el aumento de LDL-colesterol (“Low-Density Lipoprotein”) y triglicéridos que alteran la liberación de óxido nítrico y dañan el endotelio (es decir, inducen una disfunción endotelial) (19).

En adultos, se ha observado que los individuos con síndrome metabólico (pero sin DM) tienen 1.5 veces más riesgo de ictus isquémico o accidente isquémico transitorio y entre 3 y 4 veces más riesgo de enfermedad coronaria que los individuos sin dicho síndrome (19).

En niños y adolescentes con sobrepeso/obesidad se ha descrito la presencia de diversas anomalías vasculares funcionales y morfológicas de base aterosclerótica, como reducción en la reactividad vascular periférica y en la capacidad de distensión arterial y aumento del grosor de la íntima-media de la carótida (medido mediante ultrasonidos) (20-22).

Respecto a la DM tipo 2, la prevalencia de esta patología en niños y adolescentes ha ido aumentando en las últimas décadas (23). Hay que considerar que se ha observado que el riesgo de enfermedades cardiovasculares es mayor en pacientes diabéticos que en pacientes no diabéticos, además de incluir otras complicaciones comunes como son retinopatía, nefropatía y neuropatía (19).

1.1.1. RESISTENCIA A LA INSULINA.

Muchas de las complicaciones asociadas a la obesidad están directamente relacionadas con la presencia de resistencia a la insulina, descrita como un componente clave en el desarrollo del síndrome metabólico y del riesgo cardiovascular ya desde la infancia (8, 17, 24). En niños obesos, la insulinoresistencia está asociada con alteraciones en el perfil lipídico (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y reducción del HDL-colesterol, “High-Density Lipoprotein”) con un riesgo aumentado de desarrollo de aterosclerosis temprana (24, 25).

Sin embargo, cuando se analiza la sensibilidad a la insulina en adolescentes, hay que tener en cuenta que durante el desarrollo normal de la pubertad se produce un aumento fisiológico y transitorio de la resistencia a

esta hormona que regresa al final de este período (al final de la pubertad, en adolescentes sanos, los niveles vuelven a valores cercanos a la época prepuberal). Este efecto es más marcado en niñas que en niños (24, 26-27).

Básicamente, la resistencia a la insulina supone una alteración en la respuesta normal de los tejidos periféricos y el hígado a la actividad de esta hormona, de forma que se produce una hiperproducción compensadora progresiva de esta proteína. Por ello, durante un tiempo la glucemia se mantiene en valores normales. Pero si el problema se perpetúa en el tiempo, esa hiperinsulinemia compensadora es insuficiente para mantener el equilibrio del metabolismo hidrocarbonado y ello desemboca en el inicio de una DM tipo 2.

Dentro de ese papel clave en la fisiopatología del riesgo cardiovascular del síndrome metabólico, además de promover el desarrollo de DM, la insulinoresistencia favorece la hiperproducción de grasas (sobre todo hipertrigliceridemia) por parte del hígado (26, 28) y promueve la aparición de HTA, ya que conlleva que se pierda el efecto vasodilatador de la hormona (resultando en disfunción endotelial y vasoconstricción) y, a su vez, la hiperinsulinemia compensadora provoca un incremento de la reabsorción renal de sodio (19).

El mecanismo fisiopatológico por el cual el exceso de peso induce insulinoresistencia todavía no está bien definido, pues se trata de un mecanismo multifactorial en el que también intervendría la predisposición genética (24). Múltiples estudios han descrito la estrecha relación existente entre la sensibilidad a la insulina y el contenido de masa grasa en los niños. En la actualidad el tejido adiposo no se concibe sólo como un tejido de almacenamiento energético, sino que también se considera que tiene un papel importante como órgano endocrino encargándose de la secreción de múltiples factores con diversas funciones fundamentalmente hormonales, metabólicas e inmunes (29).

Dentro de estas moléculas destacan, por su implicación fisiopatológica sobre la homeostasis hidrocarbonada y el desarrollo de la resistencia insulínica, los ácidos grasos libres (AGL) (30) y ciertas adipocitocinas (las cuales actúan tanto a nivel local como a distancia en los órganos diana de la insulina) (31, 32). Respecto a los AGL, se ha demostrado que su exceso en el torrente sanguíneo acaba depositándose y acumulándose en tejidos como el

hígado y el músculo esquelético, lo que conlleva una disminución de la sensibilidad a la acción insulínica al dificultar su vía de señalización, reducir la internalización de la glucosa en la célula y disminuir la supresión hepática de la producción de glucosa mediada por insulina (14, 33, 34, 35).

En el desarrollo de la insulinoresistencia es más importante la distribución de la masa grasa corporal que su cantidad total. En este sentido, el depósito de grasa visceral sería el principal factor de riesgo con un papel determinante como mecanismo patogénico (36-38), pues su aumento se ha correlacionado de una forma directa con los niveles de insulina e inversa con la sensibilidad a dicha hormona y la tolerancia a la glucosa (efecto que no se ha demostrado con la grasa subcutánea) (33, 35, 39, 40-41). Además, se ha descrito que el tejido grasa visceral tendría una mayor actividad lipolítica que la grasa subcutánea (24, 35).

En la obesidad infantil, se ha observado que el depósito de material lipídico a nivel visceral está ya presente en fases iniciales (35, 41) y que la sensibilidad a la insulina en los niños y adolescentes obesos con un Índice de Masa Corporal (IMC) similar se encuentra significativamente más reducida en aquellos que tienen un mayor contenido de grasa visceral (42).

Finalmente hay que indicar que la insulina también ejerce su efecto hormonal sobre el mismo tejido adiposo, encargándose de suprimir la lipólisis. Los adipocitos de las personas obesas tienen menor sensibilidad a la insulina por un mecanismo de base inflamatoria, por lo que en su interior está aumentada la tasa lipolítica. De esta manera, no sólo el exceso de grasa genera aumento de AGL a la circulación, sino que a medida que se instaura la insulinoresistencia ésta también afecta al propio tejido adiposo produciendo un mayor incremento en la salida de dichos AGL y por tanto la oferta hacia el resto de tejidos diana, como por ejemplo hígado o músculo esquelético. Este fenómeno se ha correlacionado bien con el exceso de grasa visceral en comparación con el exceso de grasa subcutánea (que no presenta dicha asociación). Además, de acuerdo con esto, se ha observado que el efecto lipolítico de las catecolaminas está aumentado en la grasa visceral (43). Todo ello (junto a la hiperproducción hepática de triglicéridos) acaba dando lugar a la acumulación de grasas en el hígado y el desarrollo de esteatosis (24, 44).

1.1.1.1. Métodos para medir la resistencia a la insulina.

Existen diferentes métodos para evaluar la resistencia a la insulina, cada uno con sus ventajas y limitaciones: determinación en ayunas de la insulina y la glucosa séricas (valores basales), prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), test de tolerancia a la insulina, “clamp euglucémico hiperinsulinémico” y test de tolerancia intravenosa (iv) a la glucosa (24). Es importante resaltar que el método que se elija debe ser adecuado para el objetivo que se desea conseguir (ya que no es lo mismo buscar un diagnóstico certero de insulinoresistencia en un individuo concreto que simplemente buscar clasificar a los pacientes para un determinado estudio).

El método “gold standard” en el diagnóstico de la insulinoresistencia es el “clamp euglucémico hiperinsulinémico” ya que incluso puede llegar a distinguir entre origen muscular y hepático. Pero es complicado de realizar, invasivo, caro y precisa tiempo (45).

Otros métodos más simples y baratos de realizar derivados de la determinación de la insulina y la glucosa basales o la PTOG se han demostrado como buenas alternativas (principalmente a la hora de trabajar con grandes poblaciones, con la intención de clasificar a los pacientes dentro de un estudio), validándose con buenos coeficientes de correlación al compararlos con los resultados del “clamp euglucémico hiperinsulinémico” (a pesar de que son menos sensibles que éste). Entre estos métodos se incluyen insulina basal, FGIR (“Fasting Glucose to fasting Insulin Ratio”), índice HOMA-IR (“Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance”) e índice QUICKI (“Quantitative Insulin Sensitivity Check Index”) (24,45).

En el caso del HOMA-IR, se ha observado una buena correlación con el “clamp euglucémico hiperinsulinémico” (coeficiente de correlación, $r = 0.88$; significatividad, $p < 0.0001$) (45) con una buena concordancia entre los dos métodos para clasificar los sujetos en base a la sensibilidad a la insulina (46), con lo que se demuestra que este método puede utilizarse de forma fiable en estudios epidemiológicos o con número elevado de pacientes en los que sólo se disponga de una muestra de sangre en ayunas para evaluar la sensibilidad a la insulina.

1.1.2. RELACIÓN OBESIDAD VISCERAL - PERÍMETRO CINTURA.

Como ya se ha comentado anteriormente, la asociación entre obesidad y sus complicaciones metabólicas y cardiovasculares no depende exclusivamente del grado de obesidad (el IMC sólo nos permite evaluar la obesidad global), sino que el factor importante a evaluar en este sentido es el patrón de distribución de la grasa corporal, siendo determinantes los depósitos de grasa visceral, que son los que se asocian al desarrollo de insulinoresistencia y síndrome metabólico (ya que el IMC es poco sensible en este sentido) (26).

Para valorar la obesidad abdominal y la adiposidad visceral (incluyéndose aquí el contenido graso del espacio intramiocelular) hay técnicas muy sensibles, como son la Tomografía Computerizada y la Resonancia Magnética Nuclear, pero son caras y no siempre fácilmente accesibles para la práctica clínica diaria. Por ello, se han ido buscando métodos más sencillos y baratos, basados en mediciones antropométricas.

De entre ellos, se ha observado que la medición de la circunferencia abdominal o perímetro de la cintura tiene una buena relación (incluso mejor que el IMC) con la resistencia a la insulina y el riesgo cardiovascular (38, 47-48). De hecho, el aumento del perímetro de la cintura se asocia a presión arterial elevada, aumento de los niveles plasmáticos de LDL-colesterol, triglicéridos e insulina, y disminución de HDL-colesterol (26). Se ha demostrado que el perímetro de la cintura se correlaciona bien con el porcentaje de grasa medido por las técnicas más sensibles (49) e incluso que es una buena estimación indirecta del depósito graso en el músculo esquelético (8, 50).

Por ello, la Asociación Americana de Cardiología (AHA) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) han llegado a recomendar que se utilice la medición del perímetro de la cintura en los pacientes pediátricos obesos con riesgo de insulinoresistencia (e incluso que se incluya como criterio de Síndrome Metabólico), pues ha sido reconocido como el mejor indicador clínico de acúmulo de grasa visceral (26, 42).

1.2. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

El concepto clásico de inflamación hace referencia a la respuesta del organismo frente a una agresión exógena u endógena, que tiene como fin el mantenimiento del equilibrio homeostático para preservar la función de los diferentes órganos. Este concepto considera que la respuesta inflamatoria inicialmente es beneficiosa, ya que tiene una función defensiva, pero si se alteran sus mecanismos de regulación puede llegar a ser perjudicial (por ejemplo, un shock séptico) (51, 52).

Por ello, en la actualidad se asume que el concepto de inflamación es muy amplio y en muchas ocasiones lleva asociado un efecto negativo para el organismo. Es el caso, por ejemplo, de las enfermedades con una base inmune/inflamatoria en las que existe una desregulación de diversos mecanismos inflamatorios que son los que dan lugar a la patología.

1.2.1. INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

El proceso inflamatorio básicamente trata de acumular leucocitos en el punto donde se origina la agresión, de manera que intenta aislar el foco agresivo, actuar frente al estímulo que lo ha originado y facilitar la reparación tisular.

Fisiológicamente, estas células circulan inmersas en el flujo sanguíneo y en respuesta a un estímulo nocivo son dirigidas hacia el lugar donde éste se ha originado o ha generado daño, dando lugar a un foco inflamatorio. Para llegar hasta este punto, los leucocitos deben abandonar el lecho vascular, interaccionando con las células endoteliales que tapizan el interior de la pared vascular. Las células endoteliales son fundamentales en la coordinación de este proceso gracias a su gran actividad biológica y su capacidad para producir elementos indispensables para la génesis de la cascada inflamatoria.

Se considera que la fase inicial de una respuesta inflamatoria lo constituye la interacción leucocito-endotelio: un conjunto de relaciones coordinadas (y reversibles) entre estos dos tipos celulares basadas en la utilización de una serie de moléculas de adhesión que expresan ambas en su superficie y que van a permitir la interacción entre ellas. Si este proceso se produce de forma exagerada y prolongada en el tiempo puede dar lugar a

alteraciones en la estructura del vaso sanguíneo de tipo aterosclerótico, con el consiguiente riesgo de generar complicaciones a nivel cardiovascular.

La agresión tisular es detectada por diferentes tipos de células, existentes en su entorno, que tienen un papel centinela como son las células dendríticas, los macrófagos o las propias células endoteliales (53). Su exposición al estímulo induce la secreción, por parte de éstas, de determinados mediadores como las citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), entre otros (54). Estos mediadores de la inflamación inducen la activación del endotelio vascular adyacente que aumenta la expresión de diversas moléculas de adhesión en la superficie luminal, las cuales promueven la movilización y reclutamiento leucocitario, iniciándose la interacción leucocito-endotelio. Ésta consiste en una secuencia de reacciones entre ambos tipos celulares que conducen a que los leucocitos pasen por las fases de rodamiento, adhesión y migración de la luz vascular.

En un primer momento los leucocitos reducen su velocidad de tránsito en el flujo vascular y tienden a interactuar con las células endoteliales, a lo que se le denomina fase de rodamiento. Dentro de las moléculas de adhesión, las selectinas, una familia de glicoproteínas transmembrana de la superficie celular, tienen un papel determinante en esta fase. L-selectina (CD62L) se expresa de forma constitutiva en los leucocitos y tras su activación se desprende la parte extracelular de la molécula dando lugar a una forma soluble de la misma que se incrementa en plasma (55). Esta molécula tiende a unirse con el ligando PSGL-1 (“P-Selectin Glycoprotein Ligand-1”) expresado en otros leucocitos, lo que promueve su interacción y se considera un mecanismo importante para incrementar su reclutamiento hacia el foco inflamatorio (56).

Aunque PSGL-1 también se expresa en la célula endotelial y L-selectina puede unirse a dicho ligando, se considera que a este nivel la interacción es fundamentalmente con un ligando distinto a PSGL-1 (57). Las otras dos selectinas P- y E-selectina se expresan en el endotelio tras su activación y tienden a unirse, respectivamente, al ligando PSGL-1 y ESL-1 (“E-Selectin Ligand-1”) de los leucocitos (58).

Continuando con esta fase los leucocitos entran en un período de mayor reducción en su velocidad, sin llegar a detenerse, a la que se denomina rodamiento lento. En este proceso está implicado también, a nivel de la

superficie de los leucocitos, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las integrinas, en concreto las integrinas β_2 y α_4 .

Las integrinas β_2 son una familia de moléculas de adhesión leucocitarias que comparten la misma subunidad común β (CD18) y poseen una cadena α (CD11) diferente. La familia incluye 4 tipos conocidos de integrinas: α_L (CD11a, LFA-1, “Lymphocyte Function-associated Antigen 1” o “ $\alpha_L\beta_2$ -Integrin”), α_M (CD11b, Mac-1, “Macrophage 1 antigen” o “ $\alpha_M\beta_2$ -Integrin”), α_X (CD11c, gp150,95) y α_D (CD11d, “Integrin Alpha-D”) (59). Entre éstas, LFA-1 y Mac-1 inicialmente se había descrito que interactuaban con el ligando endotelial ICAM-1 (“Intercellular Cell Adhesion Molecule-1”), (60), aunque con posterioridad se ha sugerido que en el caso de LFA-1, sería sobre todo con otros ligandos como ICAM-2 (“Intercellular Cell Adhesion Molecule-2”) (61).

En relación a las integrinas α_4 se ha descrito la implicación en este proceso de las integrinas $\alpha_4\beta_7$ y $\alpha_4\beta_1$ (también denominada VLA-4, “Very Late Antigen-4” o también CD49d), según el tipo celular estudiado. Éstas interaccionarían, respectivamente, con el ligando endotelial MAdCAM-1 (“Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule-1”) y VCAM-1 (“Vascular Cell-Adhesion Molecule-1”) (62).

Esta fase finalizaría con la detención instantánea del leucocito sobre la superficie endotelial, que se ha relacionado fundamentalmente con la LFA-1 y VLA-4, interaccionando con los ligandos endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 respectivamente (62).

Si el estímulo proinflamatorio continúa y las células leucocitarias y endoteliales se mantienen activadas se producirá la adhesión firme, célula a célula, de las primeras a la superficie endotelial. Las moléculas implicadas en esta fase de la interacción son principalmente LFA-1 y Mac-1 leucocitarias uniéndose a ICAM-1 endotelial, y VLA-4 y $\alpha_4\beta_7$ leucocitarias interaccionando con VCAM-1 endotelial. Estas interacciones generan gran cantidad de señales intracelulares que pueden regular múltiples funciones como el desplazamiento de los leucocitos sobre el endotelio previo a su migración extravascular (63, 64).

Finalmente, si se mantiene la activación de las células implicadas porque la agresión persiste, los leucocitos que están firmemente adheridos

pueden entrar en la fase de migración, para lo que deben sufrir diversos cambios conformacionales y morfológicos adoptando una forma más aplanada que les permitirá desplazarse sobre las células endoteliales, rastreando el lugar más adecuado entre ellas para migrar al espacio intersticial, a través de las uniones intercelulares que presentan y de la membrana basal perivascular, acumulándose así en el foco inflamatorio (65).

Por tanto, para salir de la luz vascular los leucocitos realmente deben atravesar tres barreras constituidas por la capa de células endoteliales, la membrana basal y los pericitos (células con capacidad contráctil situadas por debajo de la membrana basal a la que se incrustan y que se comunican con las endoteliales).

Aunque ésta es la forma fundamental por la que los leucocitos pueden sufrir la extravasación, denominada paracelular, existe otra manera más anecdótica en la que los leucocitos pasan a través del cuerpo de las células endoteliales, denominada transcelular (62).

Todo este proceso de nuevo viene regulado y coordinado, entre otros factores, por las moléculas de adhesión presentes en los dos tipos de células. Tienen un papel relevante en esta fase LFA-1, que cambia su distribución en la superficie leucocitaria agrupándose cerca de los puntos de unión a las células endoteliales donde se co-localiza ICAM-1, y Mac-1 leucocitaria uniéndose a la ICAM-2 endotelial. Adicionalmente LFA-1 también se une a esta última (66).

Diversas moléculas que se expresan de forma importante a nivel de las uniones endoteliales también están implicadas en este proceso. En este sentido, JAM-A (“Junctional Adhesion Molecule A”) y JAM-C (“Junctional Adhesion Molecule C”) se unen a LFA-1 y Mac-1, respectivamente (67), al igual que PECAM-1 (“Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1”) que interacciona con ella misma, pero expresada en la célula leucocitaria, y que adicionalmente también activa la expresión de integrinas por dichas células (62).

1.3. OBESIDAD, ATEROSCLEROSIS E INFLAMACIÓN

La obesidad hoy en día se considera una enfermedad con una base inflamatoria crónica y sistémica, la cual constituye el sustrato para el desarrollo de las complicaciones asociadas que se han descrito anteriormente y que a largo plazo acaban produciendo un daño endotelial que desemboca en la génesis de la aterosclerosis (que en sí misma ya es un proceso inflamatorio).

La inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad se ha puesto de manifiesto al demostrar un aumento del estrés oxidativo (68, 69), del recuento leucocitario en sangre y de los niveles plasmáticos de múltiples moléculas inflamatorias, entre las que cabe resaltar la Proteína C Reactiva ultrasensible o de alta sensibilidad (PCR_{us}), TNF- α , IL-6, leptina, fibrinógeno o Amiloide Sérico A (70-74).

Los valores en sangre de estos biomarcadores se han correlacionado con el grado de obesidad y el aumento de masa grasa, así como con sus complicaciones metabólicas y cardiovasculares (52, 70, 73, 75-76). Así, se ha observado una asociación entre la presencia de síndrome metabólico y el aumento de PCR_{us}, sobre todo cuando se relaciona este biomarcador con el perímetro de la cintura y los triglicéridos (77). Incluso se ha propuesto que la composición nutricional de los alimentos puede contribuir a ese estado proinflamatorio: dietas ricas en ácidos grasos saturados o con un elevado índice glucémico conllevarían una mayor activación de la inflamación (78). En este sentido, también se ha mostrado la reversibilidad en el aumento de estos biomarcadores con la pérdida de peso (79-81).

El tejido adiposo blanco constituye el principal depósito del exceso energético derivado de la alimentación, almacenándose en los adipocitos en forma de triglicéridos. Cuando el organismo necesita aportes calóricos (en estados de ayuno), los triglicéridos son hidrolizados por lipasas y los AGL resultantes son transportados a otros tejidos para ser oxidados y metabolizados por las mitocondrias celulares (82). Como ya se ha comentado previamente, además de esta función energética, el tejido adiposo también constituye un órgano endocrino-inmune (83): segrega un gran número de hormonas peptídicas y citocinas (conocidas como adipocitocinas), así como otras moléculas no peptídicas (como lípidos activados) que afectan tanto al metabolismo de los propios adipocitos como al de otros tejidos (por ejemplo,

el hígado o el músculo) (84). Esas adipocitocinas son las moléculas a través de las cuales el tejido adiposo en la obesidad está implicado tanto en el desarrollo de una inflamación crónica como en la aparición de insulinoresistencia.

El tejido adiposo blanco aumenta a medida que lo hace el número y el volumen de sus células (que van acumulando de forma progresiva más triglicéridos en su interior), lo que desempeña un papel fundamental en el inicio y progresión del estado proinflamatorio asociado a la obesidad ya que conlleva un desequilibrio tanto en el uso/liberación de los AGL como en la secreción de las adipocitocinas. La liberación de estas últimas va a conducir, por un lado, al estímulo de las células inmunes a nivel local y sistémico y, por otro, al estímulo del endotelio para producir más moléculas de adhesión (como VCAM-1 e ICAM-1) y aumentar su permeabilidad (52,82).

Dos de esas adipocitocinas, que directa o indirectamente regulan el metabolismo de los triglicéridos y los AGL en los propios adipocitos, son MCP-1 (“Monocyte Chemoattractant Protein-1) y sobre todo TNF- α , a través de un papel central en la modulación de la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo (82). Específicamente, se ha visto que MCP-1 actúa como quimioatrayente promoviendo en obesos la infiltración del tejido adiposo por macrófagos tanto “in vitro” en ratones (85) como en humanos (86). En pacientes obesos se han demostrado niveles incrementados de estas dos moléculas.

La cascada inflamatoria generada tiene un doble efecto sobre la función adipocitaria que desemboca en el aumento de los niveles circulantes de AGL: estímulo de la lipólisis y disminución de la síntesis de triglicéridos (80, 87).

PPAR γ (“Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ”) es un receptor hormonal nuclear esencial en la regulación de la adipogénesis y necesario para el mantenimiento de la función del adipocito maduro (88), encargándose de activar la expresión de la lipoprotein-lipasa (hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas VLDL circulantes, “Very Low-Density Lipoprotein”, liberando AGL en la célula para ser reesterificados) y la biosíntesis de triglicéridos. Se ha propuesto que TNF- α afectaría a PPAR γ a múltiples niveles (desde la transcripción hasta la función de la proteína) de manera que sería responsable de una regulación negativa de esta molécula y, por tanto, de una actividad disminuida de la misma. Así, la desregulación del

PPAR γ sería un elemento clave en la mediación de los efectos de las citocinas inflamatorias para producir la alteración en la biosíntesis lipídica en el adipocito (82).

En sujetos sanos, la insulina favorece la esterificación de los AGL en triglicéridos estimulando la captación de glucosa a través del GLUT4 (“Glucose Transporter type-4”) que se convertirá en el glicerol de los triglicéridos; y también regula negativamente la lipólisis mediada por la HSL (“Hormone-Sensitive Lipase”). En los obesos, el aumento de los niveles de TNF- α da lugar a una alteración de la vía de señalización de la insulina en el adipocito (89) lo que conduce a una disminución de los niveles de GLUT4 y lipoprotein-lipasa en estas células (dando lugar a una disminución del transporte de glucosa y, por tanto, de la esterificación de AGL) y a un estímulo de la lipólisis a través de una activación de la HSL (82).

La insulina es una hormona que no sólo tiene una función anabólica y de mantenimiento de la homeostasis del metabolismo de la glucosa, sino que también tiene un potente efecto antiinflamatorio que contribuye a largo plazo a un efecto anti-aterogénico (90). Por ello, la alteración en el mecanismo de acción de la insulina da lugar a una pérdida de este fenómeno. La resistencia a la insulina guarda mecanismos fisiopatológicos inflamatorios similares a la obesidad y la aterosclerosis con un papel destacado de las citocinas TNF- α e IL-6 (91). TNF- α promueve el desarrollo de insulinoresistencia a través de la comentada alteración en la vía de señalización adipocitaria de la hormona y por acción directa sobre el músculo esquelético (a través de las cinasas JNK1 -“c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1”- y MAP4K4 -“Mitogen-Activated Protein Kinase 4”-). Se ha demostrado que el silenciamiento génico de TNF- α (o de alguna de las moléculas a través de las cuales actúa, como las cinasas mencionadas) mejora la inflamación y la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con dietas ricas en grasas (92-94) y en el tejido muscular de pacientes diabéticos (95). Así, se puede afirmar que la insulinoresistencia se asocia con inflamación sistémica, disfunción endotelial y aterosclerosis temprana (24).

El reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo es otro fenómeno crucial en el aumento de mediadores inflamatorios que (junto al aumento del estrés oxidativo, a la alteración en la secreción de adipocitocinas y el incremento de la lipólisis, entre otros procesos) conlleva una progresión hacia un estado inflamatorio crónico sistémico con la hiperproducción (cada vez

mayor debido a un mecanismo de retroalimentación) de citocinas, tanto por los leucocitos (no solo segregan TNF- α , sino otras moléculas como IL-6 o IL-1 β) como por los adipocitos (96-98). Se ha descrito también que los leucocitos de sujetos obesos se encuentran en un estado de activación a través del aumento del factor de transcripción inflamatorio NF- $\kappa\beta$ (“Nuclear Factor- $\kappa\beta$ ”) (72-73) y por la sobreexpresión de moléculas de adhesión en su superficie (73, 99).

Con todo ello, se puede afirmar que la obesidad induce una disfunción del tejido adiposo que es el origen de una respuesta inflamatoria que será la base para la aparición de muchas de las complicaciones metabólicas y cardiovasculares asociadas a esta patología (52), de manera que es la inflamación el mecanismo a través del cual se unen la obesidad y el riesgo cardiometabólico (100).

1.3.1. OBESIDAD Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Dentro del estrés oxidativo fundamentalmente encontramos dos grandes grupos de moléculas: las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN), que son moléculas que pueden o no tener electrones desemparejados y que son altamente oxidantes en los tejidos. Dentro de ellas, los radicales libres (como el superóxido y los radicales hidroxilo) son las especies más reactivas con electrones que se unen rápidamente a moléculas cercanas (101-102). Las especies reactivas se producen de forma normal durante los procesos fisiológicos, pero el organismo dispone de mecanismos antioxidantes (dentro de ellos hay moléculas enzimáticas y no enzimáticas) encargados de regular sus niveles con el fin de evitar sus efectos perjudiciales (103). El desequilibrio entre el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidantes conduce a altas concentraciones de ERO y ERN, que van a producir un daño en el ADN (Ácido Desoxiribonucleico), las proteínas, los lípidos y los carbohidratos convirtiéndolos en citotóxicos; y ello altera, directa o indirectamente, la función celular (101, 103).

Hay evidencia suficientemente demostrada de la asociación entre obesidad y estrés oxidativo y son muchos los factores que contribuyen a esta relación: hiperglucemia/insulinorresistencia, dislipemia, disminución de los niveles de antioxidantes, el excesivo trabajo muscular derivado del exceso de

peso, la propia inflamación generada en el tejido adiposo, así como la hiperleptinemia (101). La hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos en la obesidad son procesos que se han asociado con anomalías en la función de estas células, principalmente con un estrés mitocondrial y alteración en la función del retículo endoplásmico (104). Al igual que en el desarrollo de las complicaciones asociadas, las alteraciones del metabolismo hidrocarbonado tienen un papel central en el desarrollo de fenómenos prooxidantes, de manera que a medida que aumenta la insulinoresistencia también lo hace el estrés oxidativo (101, 105).

La relación entre estrés oxidativo e inflamación es recíproca, de manera que se retroalimentan mutuamente, y en la obesidad la relación entre citocinas (PCRus, TNF- α , IL-6) y moléculas oxidantes es estrecha (104). Algunas ERO favorecen la quimioatracción de células inflamatorias hacia el tejido adiposo y, a su vez, estas células generan más radicales libres y ERO (101). Además, el estrés oxidativo genera disfunción de las células endoteliales (106-107), lo que conlleva un estímulo de los mecanismos inflamatorios y favorece el desarrollo de las complicaciones vasculares (104).

Al estudiar el efecto de la pérdida de peso (pérdida de grasa) sobre el estrés oxidativo con pautas dietéticas y/o aumento de la actividad física se ha observado que mejora el estado prooxidativo del sujeto (101). En un estudio se demostró que el tratamiento con Orlistat (un inhibidor de las lipasas gastrointestinales que disminuye la absorción de las grasas de la dieta) se asoció no solo a una disminución del peso sino además con una mejora del perfil lipídico en sangre y una disminución del estrés oxidativo (108), efecto que también se ha demostrado con las intervenciones quirúrgicas encaminadas a disminuir la obesidad (101).

Por tanto, la obesidad supone un estado de estrés oxidativo sistémico aumentado que forma parte del estado proinflamatorio asociado a esta patología y que participa directamente del desarrollo de las complicaciones (entre otras, síndrome metabólico, DM o enfermedad cardiovascular). Además es un problema que puede corregirse mejorando las defensas antioxidantes a través de la reducción del volumen de grasa, el ejercicio y la modificación dietética.

1.3.2. PATOGÉNESIS DE LA ATEROSCLEROSIS: BASE INFLAMATORIA.

La enfermedad cardiovascular generada por la obesidad (y el síndrome metabólico derivado de ella) tiene como proceso subyacente la aterosclerosis, un trastorno crónico que progresa lenta y silenciosamente y que acaba conduciendo a la trombosis intravascular. Hoy en día existe evidencia científica suficientemente contrastada de que la aterosclerosis es un proceso en el que el sistema inmune (tanto innato como adaptativo) tiene un papel central (109).

Los mecanismos inflamatorios median la iniciación, la progresión y las complicaciones de las lesiones ateroscleróticas. El concepto básico se conoce como hipótesis de la respuesta a la lesión: una respuesta inflamatoria crónica de la pared vascular desencadenada por una lesión crónica del endotelio (110). Así, los factores bien identificados como de riesgo cardiovascular (por ejemplo dislipidemia, HTA, DM) suponen una agresión crónica para las células endoteliales que conlleva una disfunción de las mismas, de manera que empiezan a sobreexpresar moléculas de adhesión selectivas para los leucocitos y las plaquetas, produciéndose un aumento de la permeabilidad y de la adherencia al endotelio de estos grupos celulares. Además, se produce un deterioro de la capa luminal de elastina con la exposición de proteoglicanos, lo que favorece la acumulación subendotelial progresiva de lipoproteínas con elevado contenido en colesterol (principalmente LDL) que posteriormente se irán oxidando (109). La interacción de estas lipoproteínas modificadas con el endotelio y con las células inflamatorias locales del espacio subendotelial provoca la formación de gradientes quimiotácticos que atraerán más leucocitos hacia la zona lesionada del vaso sanguíneo (111-112).

Clásicamente, los monocitos se han descrito como las células inflamatorias centrales en la génesis de la placa de ateroma, las cuales migran a través del endotelio para situarse en la capa íntima y liberan (junto a las plaquetas) mediadores proinflamatorios y factores de crecimiento que inducen la activación y migración de células musculares lisas hacia esa misma capa de la pared vascular. Al mismo tiempo los monocitos se van transformando y activando en macrófagos, los cuales (al igual que las células musculares lisas) van a ir englobando lípidos y transformándose, así, en células espumosas. En el caso de los macrófagos, este proceso se realiza a través de varios receptores (entre los que destacan los “scavenger” y el CD36) fundamentales en la

internalización de lipoproteínas modificadas que, además de esta función, pueden interactuar con otros receptores dando lugar a una mayor respuesta inflamatoria y un mayor acúmulo de macrófagos en la placa (113-114). Una vez en la íntima las células musculares lisas proliferan, segregando colágeno y otros componentes de la matriz extracelular que, junto a la acumulación de células espumosas, provoca la progresión de la lesión (se siguen liberando mediadores proinflamatorios que retroactivan la lesión, aumentando la quimiotaxis de células hacia la placa de ateroma) (110).

Otras células que se han demostrado como determinantes en la génesis de la aterosclerosis son las células dendríticas, participando en todos sus estadios desde la estría grasa hasta la placa madura (115). Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T por excelencia, uniendo así la inmunidad innata y la adquirida. A través de diversos receptores (como el CD36) las células dendríticas engloban lipoproteínas oxidadas y ello, junto al aumento local de quimiocinas, da lugar a una activación de las mismas. También segregan citocinas como IFN-1 (“Interferon type I”), TNF- α o IL-6, entre otras. El incremento, cada vez mayor, del número de células dendríticas activadas en la pared del vaso conlleva un mayor estímulo de la inmunidad adquirida y los lípidos englobados pueden resultar en una mejora de la presentación de antígenos lipídicos a las células NK (“Natural Killer”) y linfocitos T. Incluso se ha descrito que las células dendríticas pueden acumular tal cantidad de lípidos que se transforman en células espumosas, contribuyendo así a la progresión de la lesión (115).

Además de la acción de las células dendríticas, las citocinas segregadas por las células de la inmunidad innata también atraen hacia la placa de ateroma a linfocitos T. De esta manera, el intercambio de señales entre los distintos tipos celulares conduce a una activación inmune celular y humoral que desemboca en un estado inflamatorio crónico (que también favorece la liberación de mediadores fibrinogénicos, lo que a su vez estimula la proliferación de las células musculares lisas).

1.3.2.1. El papel de los neutrófilos.

Actualmente se está empezando a dar cada vez más importancia al papel de los neutrófilos en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y la trombosis (116-117). Se está postulando que podrían tener un papel

principalmente en las fases tempranas, como iniciadores de la lesión, y, en este sentido, son diversos los hallazgos que lo fundamentan:

- Algunos estudios han objetivado que los neutrófilos contribuyen primariamente a la aterogénesis mediante la liberación de alarminas que promueven el reclutamiento de monocitos; así como a través de la secreción de complejos de ADN y proteínas de los gránulos, que se han descrito como potentes activadores de las células dendríticas plasmocíticas en la pared del vaso (118).
- La deplección de los neutrófilos disminuye el reclutamiento de monocitos en experimentos “in vivo” con ratones (109, 119).
- Se ha conseguido reducir el área de las lesiones ateroscleróticas en ratones alimentados con dietas ricas en grasas a través de la deplección de sus neutrófilos mediante anticuerpos (116, 120).
- La deficiencia genética de CRAMP (“Cathelicidin-Related Antimicrobial Peptide”, péptido expresado en los neutrófilos) reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica en ratones alimentados con dietas ricas en grasas (121).
- Se ha observado que los neutrófilos intervienen en la resistencia a insulina a través de la secreción de elastasa en ratones alimentados con dietas ricas en grasas (116).
- En experimentos “in vivo” con microscopía intravital se ha observado que los neutrófilos son responsables de la mayoría de interacciones transitorias leucocito-endotelio y que éstas tienen un papel importante en la regulación del reclutamiento de leucocitos hacia la pared vascular (122).
- En experimentos con ratones con déficit de ApoE (Apolipoproteína E) se demostró la presencia de neutrófilos en muchas de las placas de ateroma, sobre todo en las regiones con una alta actividad inflamatoria, siendo las principales células que interactuaban con el endotelio aterosclerótico (123).

Por lo tanto, son necesarios todavía más estudios para determinar el papel real de los neutrófilos en la génesis de la aterosclerosis y el mecanismo a través del cual actúan en este proceso.

1.3.3. OBESIDAD INFANTIL E INFLAMACIÓN

La obesidad infantil supone un mayor riesgo de padecer obesidad en la edad adulta y sus complicaciones, de manera que la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular en el adulto son procesos que pueden tener su inicio ya desde la edad pediátrica. Así, en niños y adolescentes obesos ya se encuentra presente esa inflamación sistémica, crónica y de bajo grado que es la base para el desarrollo de todas las complicaciones asociadas a la obesidad (124-125).

Se ha demostrado en niños y adolescentes obesos la presencia de una alteración funcional del endotelio ligada a una inflamación subclínica vascular, a partir de la determinación de diversos marcadores plasmáticos, como las moléculas de adhesión solubles y diversos biomarcadores inflamatorios (PCRus, leptina, IL-6, TNF- α) (126-127). También se ha descrito que aumentos más rápidos de IMC en niños con exceso de peso provocan un mayor aumento de marcadores inflamatorios (128).

La PCRus y la leptina son dos moléculas que se asocian a insulinoresistencia y presencia de componentes del síndrome metabólico (26, 129-130) y se ha observado que en la población obesa pediátrica están aumentadas (respecto a la población normopeso), además de que se han correlacionado de forma inversa con un efecto antioxidante (125).

Otra adipocitocina proinflamatoria que se ha demostrado aumentada en la obesidad infantil y que se ha correlacionado bien con la resistencia a la insulina y la dislipemia en estas edades es IL-6 (26, 131). En niños prepúberes y en el inicio de la pubertad, tanto obesos como normopeso, la leptina e IL-6 se han correlacionado de forma inversa con un efecto antioxidante, además de que IL-6 también se ha descrito como predictora de un fenómeno prooxidante (125).

TNF- α , como ya se ha fundamentado en anteriores apartados, es una adipocitocina con un papel central en la génesis de una inflamación subclínica originada en el tejido adiposo y es otra de las moléculas que se han demostrado aumentadas en niños y adolescentes obesos (124, 128, 132).

Por todo ello, se puede afirmar que la alteración en la secreción de las adipocitocinas es la que une las respuestas inflamatorias local y sistémica en la obesidad (104).

La obesidad infantil, al igual que se ha descrito en el adulto, se relaciona con un aumento del estrés oxidativo (104, 124-125), que a su vez favorece la desregulación en la secreción de adipocitocinas por el tejido adiposo (104). Se ha sugerido que el acúmulo de tejido graso (principalmente a nivel visceral) es el factor primario responsable del incremento del estrés oxidativo (133-134) y que este fenómeno tiene una implicación central en la relación entre obesidad, insulinoresistencia y el resto de comorbilidades (105, 134); hasta el punto que el daño oxidativo de los componentes celulares tiene un papel fundamental en la patogénesis de las alteraciones vasculares durante el desarrollo de la aterosclerosis (132). Además, se ha demostrado que la pérdida de peso con el establecimiento de hábitos de vida saludables en los niños y adolescentes obesos (modificación de la dieta y actividad física) mejora los niveles de los parámetros de estrés oxidativo (104).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis general del presente trabajo es que la obesidad infantil conlleva una serie de alteraciones metabólicas que generan a nivel vascular una respuesta inflamatoria crónica de baja intensidad y subclínica, que se inicia con la interacción entre células leucocitarias y el endotelio, y que puede ser la base de un proceso aterosclerótico responsable del desarrollo precoz de enfermedades cardiovasculares.

De acuerdo con ello, el objetivo general propuesto fue estudiar, en un modelo experimental “in vitro”, el comportamiento de la interacción entre leucocitos y células endoteliales en muestras de sangre de niños con sobrepeso u obesos, en comparación con niños controles, y evaluar su posible relación con diversos parámetros antropométricos y analíticos, especialmente aquellos que se han asociado con alteraciones cardiometabólicas y de respuesta inflamatoria.

Los objetivos específicos abordados fueron los siguientes:

1. Evaluar diversos parámetros antropométricos y clínico-analíticos, que se han relacionado previamente con alteraciones cardiometabólicas y de respuesta inflamatoria en niños con sobrepeso/obesidad, comparándolos con niños controles.
2. Estudiar si la obesidad infantil induce modificaciones en la interacción leucocito-endotelio en un modelo “in vitro” de ensayo de adhesión dinámico en cámara paralela de flujo, evaluando las posibles diferencias entre subgrupos en función de diversos factores como el género.
3. Caracterizar el tipo de leucocito implicado en estas modificaciones.
4. Dilucidar la posible relación entre los parámetros que determinan el comportamiento de la interacción leucocito-endotelio y los parámetros antropométricos y clínico-analíticos determinados.
5. Analizar si la obesidad infantil modifica la expresión de diversas moléculas de adhesión leucocitarias.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en colaboración entre el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado un estudio prospectivo observacional analítico y experimental sobre una muestra de 82 niños de ambos sexos cuyas edades están comprendidas entre 7 y 16 años.

Se han establecido 2 grupos experimentales: a) Un grupo estudio, constituido por niños con sobrepeso/obesidad, remitidos a Consultas Externas del Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia para estudio, tratamiento y seguimiento de esta patología y b) un grupo control, apareado por sexo y edad con el anterior, que acudían a la consulta de Atención Primaria para controles médicos rutinarios o a las mismas Consultas Externas del hospital citado anteriormente por problemas menores distintos a la obesidad en los que estuviera indicada una extracción sanguínea.

En cualquier caso se han considerado como criterios de exclusión, para ambos grupos, la presencia de dislipemia familiar, HTA, DM, infección activa, patología inflamatoria crónica, asma moderada-grave o que estuvieran bajo tratamiento con algún grupo farmacológico con capacidad descrita para afectar a la interacción leucocito-endotelio. En estos niños se ha realizado un estudio transversal comparando las variables experimentales del grupo estudio con las del grupo control.

Para la inclusión de los niños en el estudio, tanto a ellos como a sus padres o tutores legales, se les ha explicado de forma detallada el mismo, sus objetivos, hipotéticos beneficios y pruebas a realizar y, tras comprobar su comprensión, se ha solicitado su aceptación y a los segundos (y a los niños mayores de 12 años) el consentimiento informado por escrito.

En el mismo sentido, puesto que las células endoteliales que se han utilizado en los experimentos se han obtenido de cordones umbilicales humanos de recién nacidos sanos del Hospital Universitario Dr. Peset de

Valencia, se ha explicado el estudio y se ha solicitado el consentimiento informado por escrito a madres donantes sanas.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) de Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia (Código de referencia 60/12).

3.2. PARÁMETROS DETERMINADOS

En el presente trabajo se han analizado y comparado los datos antropométricos y analíticos de los sujetos, así como se ha realizado un estudio experimental de la interacción leucocito-endotelio utilizando una muestra de sangre procedente de la extracción efectuada a cada paciente.

Una vez aceptada su inclusión en el estudio, a los niños y niñas participantes se les ha realizado una exploración física completa con determinación de diversas medidas antropométricas. Posteriormente, aprovechando una extracción de sangre ya programada previamente por el pediatra (tanto en el grupo control como en el grupo de exceso de peso), se han realizado en el laboratorio central del Hospital Universitario Dr. Peset las determinaciones analíticas correspondientes, que han sido utilizadas como parte del estudio y que forman parte de la práctica clínica habitual. De la sangre total extraída, una muestra de unos 10-20 mL, recogida en un tubo con citrato sódico (como anticoagulante), ha sido trasladada lo más rápidamente posible (en menos de 2 horas) al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València para ser procesada y utilizada durante la realización de las pruebas experimentales correspondientes al estudio de la interacción leucocito-endotelio.

3.2.1. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

Todos los niños incluidos en el estudio han sido sometidos a una anamnesis y exploración física completa y se han evaluado los parámetros antropométricos más representativos, de acuerdo a protocolos estandarizados, teniendo en cuenta su edad y sexo:

- El peso, expresado en Kg, y la talla, expresada en cm, se han obtenido en ropa interior y descalzos mediante una balanza (BC-418MA, Tanita Europa BV, Hoofddorp, Holanda) y un estadiómetro (Holtain limited, Crymych dyfed, Reino Unido), respectivamente.
- El IMC, se ha calculado teniendo en cuenta los 2 parámetros anteriores de acuerdo a la relación: $IMC = \text{Peso (Kg)} / \text{Talla (m}^2\text{)}$. En cualquier caso, este índice también se ha expresado de forma estandarizada o normalizada como una puntuación denominada z-Score (z-IMC): número de

desviaciones estándar que tiene un valor individual (en este caso, un valor de IMC) con respecto a la media de una población de referencia.

En base al z-IMC y tomando como referencia las curvas de crecimiento para su edad y sexo descritas por Carrascosa et al. (2010) (135) para la población española, se han establecido los dos grupos experimentales:

- a) Un grupo estudio constituido por niños con sobrepeso/obesidad, condición definida por un valor de $z\text{-IMC} > 1$
 - b) Un grupo control, apareado por sexo y edad con el anterior, constituido por niños y niñas con un valor de $-1,7 \leq z\text{-IMC} \leq 1$.
- El perímetro de la cintura y de la cadera se ha medido en cm, y se ha obtenido utilizando una cinta métrica flexible e inextensible.
 - El porcentaje (%) de masa grasa corporal se ha valorado por impedanciometría bioeléctrica mediante un analizador de composición corporal (BC-418MA, Tanita Europa BV, Hoofddorp, Holanda).
 - La presión arterial sistólica y diastólica, expresadas en mmHg, se ha obtenido con un esfigmomanómetro (Dinamp 200, GE medical Systems Information Technologies, Inc., Milwaukee, WI, USA) tomando la media de 3 medidas realizadas en el brazo derecho con el niño sentado y en un ambiente tranquilo.
 - El estadio puberal se ha valorado mediante exploración física, utilizando los criterios descritos por Marshall y Tanner (136-137).

3.2.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS

Los parámetros analíticos fueron determinados mediante protocolos estandarizados en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia a partir de las muestras de sangre total obtenidas a los niños tras 12 horas en ayunas, incluyendo:

3.2.2.1. Bioquímica clínica

En este apartado se valoró el perfil bioquímico determinado de forma habitual a estos pacientes, destacando aquellos parámetros considerados como marcadores de riesgo cardiometabólico y de respuesta inflamatoria entre los que encontramos:

3.2.2.1.1. Variables del metabolismo hidrocarbonado

- Glucemia (expresada en mg/dL) cuantificada de forma rutinaria automatizada para el Aeraset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Insulina (expresada en μ UI/mL) determinada mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia automatizado para el sistema Aeraset System and Architect c8000 (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Índice HOMA-IR como indicador de insulinoresistencia. Fue determinado a partir de los parámetros anteriores siguiendo la fórmula:

$$\text{Índice HOMA-IR} = \text{Glucemia (mg/dL)} \times \text{Insulina } (\mu\text{UI/mL}) / 405$$

Se consideró como punto de corte el valor de 3,16 (138). Por tanto los niños con un índice HOMA-IR \geq 3,16 fueron considerados como insulino-resistentes.

3.2.2.1.2. Variables del metabolismo lipídico

El perfil lipídico incluyó las determinaciones de colesterol total (expresado en mg/dL), LDL-colesterol (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), VLDL-colesterol (mg/dL) y Triglicéridos (mg/dL). Todas las determinaciones fueron realizadas de forma automatizada para el sistema Aeraset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).

3.2.2.1.3. Variables relacionadas con determinadas proteínas específicas

- Proteína C Reactiva ultrasensible o de alta sensibilidad (PCRus, expresada en g/dL) determinada por nefelometría cinética mediante el Image Nephelometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA).

- Proteína fijadora del retinol (RBP4, expresada en mg/dL) determinada por nefelometría mediante el Dade Behring Inc, Marburg, Alemania.
- Apolipoproteína A1 (Apo A1, expresada en mg/dL) determinada de forma automatizada para el sistema Aeroset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Apolipoproteína B (Apo B, expresada en mg/dL) determinada de forma automatizada para el sistema Aeroset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Cistatina C (expresada en mg/L) determinada por nefelometría mediante el Beckman Image 800 analyzer (Beckman Coulter Canada Inc, Mississauga, Ontario, Canada).

3.2.2.1.4. Otros parámetros analíticos.

El perfil de bioquímica sanguínea de los pacientes también incluyó la determinación de:

- Marcadores inmunoquímicos: Homocisteína (expresada en $\mu\text{mol/L}$) y ácido fólico (ng/mL) determinados mediante inmunoensayo de electroquimioluminiscencia automatizado para el sistema Aeroset System and Architect c8000 (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Hormonas: Tirotrópina (TSH, expresada $\mu\text{UI/mL}$) determinada mediante un ensayo inmunoradiométrico directo utilizando el Beckman Coulter Dxl 800 (Beckman Coulter, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España).
- Ácido úrico (expresado en mg/dL); creatinina (mg/dL); urea (mg/dL); diversos minerales: hierro ($\mu\text{g/dL}$), calcio (mg/dL), fósforo (mg/dL); y proteínas totales y albúmina (g/dL). Todos estos parámetros fueron determinados de forma directa automatizada para el sistema Aeroset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).
- Enzimas indicadores de la función hepática: GOT (Glutamato Oxalacetato Transaminasa, expresada en UI/L), GPT (Glutamato Piruvato Transaminasa, UI/L), y GGT (gamma Glutamil Transpeptidasa UI/L)

determinadas de forma automatizada para el sistema Aeroset System (Abbott Clinical Chemistry, Wiesbaden, Alemania).

3.2.2.2. Parámetros hematológicos

En estos pacientes se determinaron, de forma rutinaria y automatizada mediante un contador de partículas (Beckman Coulter Inc., Miami, USA), las 3 series hematológicas: leucocitaria, eritrocítica y plaquetaria. En este trabajo se hizo especial hincapié en los resultados de la primera por su relación directa con la respuesta inflamatoria. Los parámetros determinados fueron:

- Serie leucocitaria: Se determinaron los leucocitos totales y dentro de ellos: neutrófilos, linfocitos y monocitos (expresados en todos los casos como número de células $\times 10^3/\text{mm}^3$).
- Serie eritrocítica: Se determinaron los hematíes (expresados como número de células $\times 10^6/\text{mm}^3$), hemoglobina (g/dL) y hematocrito (%).
- Serie plaquetaria: Se determinaron las plaquetas (expresadas como número de células $\times 10^3/\text{mm}^3$).

3.3. ESTUDIOS “IN VITRO”

Estos estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València.

3.3.1. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

3.3.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en los estudios “in vitro” en la presente Tesis Doctoral, con indicación de sus respectivos proveedores, fueron los siguientes:

- Anticuerpos frente a diversas moléculas de adhesión leucocitarias, obtenidos de BD Biosciences:

Anticuerpo frente a IgG1 κ Isotipo Control FITC.

Anticuerpo frente a CD11a conjugado con FITC.

Anticuerpo frente a CD11b conjugado con PE.

Anticuerpo frente a CD11c conjugado con PE.

Anticuerpo frente a CD18 conjugado con FITC.

Anticuerpo frente a CD49d conjugado con PE.

Anticuerpo frente a CD62L conjugado con FITC.

- Azul Tripán (“Trypan blue solution, 0.4 %”), obtenido de Sigma.
- Bicarbonato sódico, obtenido de Sigma.
- Cloruro amónico, obtenido de Panreac.
- Colagenasa tipo I, obtenida de Gibco.
- Dextrano, obtenido de Sigma.
- DPBS⁺ (“Dulbecco’s PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺”), obtenido de Lonza.

- DPBS⁻ (“Dulbecco’s PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺”), obtenido de Lonza.
- EDTA sódica (“Ethylenediaminetetraacetic Acid sodium salt”), obtenida de Panreac.
- EGM-2 (“Endothelial Growth Medium-2”). Medio de cultivo específico para las células endoteliales constituido por un medio basal EBM-2 (“Endothelial cell Basal Medium-2”) suplementado con diversos factores necesarios para el crecimiento y proliferación celular: suero fetal bovino (2 % v/v), hidrocortisona (0.04 % v/v), factor de crecimiento de fibroblastos (“Human Fibroblast Growth Factor-Basic”, hFGF-B, 0.4 % v/v), factor de crecimiento endotelial vascular (“Vascular Endothelial Growth Factor”, VEGF, 0.1 % v/v), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (“Recombinant long R³ Insulin-like Growth Factor-1”, R³-IGF-1, 0.1 % v/v), ácido ascórbico (0.1 % v/v), factor de crecimiento epidérmico (“Human Recombinant Epidermal Growth Factor”, rhEGF, 0.1 % v/v), gentamicina y anfotericina B (“Gentamicine sulphate amphotericine B, GA-1000, 0.1 % v/v), penicilina (50 unidades/mL), estreptomicina (50 µg/mL), fungizona (2.5 µg/mL) y heparina (0.1 % v/v). Obtenido todo ello de Lonza.
- Fibronectina, obtenida de Sigma.
- Ficoll-Paque TM Plus, obtenido de GE Healthcare.
- Glutamina, obtenida de Sigma.
- HBSS (“Hank`s Balanced Salt Solution”), obtenido de Lonza.
- HSA (“Human Serum Albumin”, “Albuminate 25 %”), obtenido de Sigma.
- PAF (“Platelet Activating Factor”), obtenido de Sigma.
- PBS (“Phosphate Buffered Saline”), obtenido de Gibco.
- Penicilina/estreptomicina, obtenida de Sigma.

- Piruvato sódico, obtenido de Sigma.
- RPMI 1640 (“Roswell Park Memorial Institute” 1640) suplementado con 20 mM HEPES (“4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic acid”), obtenido de Sigma.
- Solución de lisis para citometría de flujo (“FACS lysing solution: BD FACS™ Lysing Solution”), obtenida de BD Biosciences.
- Suero fetal bovino, obtenido de Lonza.
- Suero fisiológico (NaCl 0.9 %), obtenido de Braun.
- TNF- α recombinante (“Tumor Necrosis Factor- α ”), obtenido de Sigma.
- Tripsina-EDTA, obtenida de Gibco.

3.3.1.2. Aparatos

Para el desarrollo de estos estudios “in vitro” se han utilizado los siguientes equipos:

- Cabina de seguridad biológica y flujo laminar clase II EUROAIREBSC modelo BBC-1300-IIA2XN. Todas las manipulaciones de los tejidos utilizados y de las células se realizaron en esta cabina para asegurar su viabilidad y reducir al máximo el riesgo de contaminación.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5810 R.
- Citómetro de flujo FACSCalibur de BD Biosciences. Este equipo es capaz de identificar las células de acuerdo a sus características de tamaño y granulosidad (“Forward scatter -FS- and Side scatter -SS-, respectivamente”). Utilizado para evaluar la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias implicadas en la interacción leucocito-endotelio.
- Incubador de cultivos celulares Forma Scientific modelo 3111. Este equipo permite mantener constante la temperatura (37°C) y una atmósfera con un grado de humedad elevada y un 95 % de aire y 5 % de CO₂. Estas

condiciones son óptimas para permitir el crecimiento y proliferación de los cultivos celulares depositados en su interior.

- Microscopio invertido de contraste de fases Leica modelo DMIL, utilizado para el control de las células durante todos los procesos en que se manipulan.
- Componentes del montaje completo del sistema “in vitro” de adhesión dinámica:
 - a) Bomba de infusión/succión continua Harvard modelo PHD 2000.
 - b) Cámara paralela de flujo (“Flow chamber system”). Es el equipo que permite la realización de los estudios funcionales de interacción leucocito-endotelio. Esta cámara fue diseñada por el grupo del profesor Lusinskas (Harvard Medical School, Boston, MA) en colaboración con el MIT (“Massachusetts Institute of technology Cambridge, MA”) donde fue fabricada artesanalmente. La Doctora Ángeles Álvarez Ribelles realizó una estancia post-doctoral con dicho grupo utilizando este equipo con diversas publicaciones (139) y con posterioridad lo incorporó a nuestro laboratorio en la unidad de investigación de farmacología digestiva e inflamatoria (Departamento de Farmacología. Sección Departamental de la Facultat de Medicina i Odontología. Universitat de València), como queda referenciado en diversas publicaciones (140-145).

Esta cámara está formada por la unión de 2 placas en la que una franja central de 5 x 25 mm se expone a un flujo constante de un fluido. La placa inferior dispone en su parte central de un hueco o hendidura circular de 25 mm de diámetro en el que se ajusta perfectamente un cubre-objetos con una monocapa de células endoteliales cultivadas en su superficie superior. De esta manera dichas células quedan expuestas al fluido que circulará por el interior de la cámara. Por otra parte, la placa superior dispone de una superficie acristalada que se corresponde exactamente con el hueco descrito en la inferior, lo que permite la visualización de las células a su través. A su vez, posee un sistema calefactor termostatado, para que el experimento se pueda realizar a una temperatura constante de 37°C.

- c) Sistema calefactor de la cámara paralela de flujo Omega modelo 4201APF1.
- d) Microscopio invertido de contraste de fases Nikon modelo Nikon Eclipse TE 2000-S para la observación y seguimiento de los experimentos funcionales de interacción leucocito-endotelio.
- e) Cámara de video Sony modelo Sony Exware HAD para el registro de los experimentos funcionales de interacción leucocito-endotelio.
- f) Software informático de visionado, grabación y análisis de video “Studio MoviBoard^{HD} Ultimate Collection v 14 ww” de “Pinnacle Studio”. Este programa permite, en los estudios funcionales de interacción leucocito-endotelio, visualizar las células y grabar las imágenes de forma continua, en tiempo real, en un ordenador para su posterior revisión y análisis.

3.3.1.3. Otros materiales

Otros materiales utilizados en estos estudios fueron los siguientes:

- Contenedor para la recogida de muestras clínicas de 100 mL obtenido de Deltalab.
- Cubre-objetos de plástico de 25 mm de diámetro obtenidos de Nunc.
- Frascos de cultivo de 25 cm² de superficie de crecimiento obtenidos de Corning.
- Hemocitómetro para el contaje celular obtenido de Sigma.
- Jeringas de 10 mL obtenidas de Norm-Ject.
- Llaves de 1 vía obtenidas de Vygon.
- Llaves de 3 vías obtenidas de BD Connecta.
- Material quirúrgico: pinzas para disección y pinzas hemostáticas obtenidas de Martin.

- Pipetas Pasteur obtenidas de Brand.
- Pipetas de 5, 10 y 25 mL obtenidas de Fisherbrand. Se utilizaron en todas las manipulaciones de las soluciones y suspensiones celulares salvo que se indique lo contrario.
- Placas de cultivo de 6 pocillos obtenidas de Corning.
- Tubo Masterflex de 0.8 mm para las conexiones a la cámara paralela de flujo obtenido de Cole-Parmer.
- Tubos de ensayo de 10 y 50 mL obtenidos de Corning.
- Tubos de ensayo con citrato sódico obtenidos de BD Vacutainer.

3.3.2. METODOLOGÍA

3.3.2.1. Aislamiento y cultivo de los distintos tipos de células.

3.3.2.1.1. Células leucocitarias

Las células leucocitarias se aislaron a partir de la sangre total extraída a los pacientes. Una muestra de 10-20 mL se recogió en un tubo de ensayo con citrato sódico como anticoagulante. Posteriormente fue incubada en un tubo de ensayo de 50 mL, en dextrano al 3 % (en suero fisiológico) en un volumen del 50 % de la muestra durante 45 minutos, con la finalidad de separar la mayor parte de los eritrocitos, que se depositan en el fondo del tubo, de la suspensión que se mantiene en la parte superior constituida fundamentalmente por leucocitos (Figura 1). Esta fase superior se deposita, gota a gota mediante una pipeta pasteur, sobre 15 mL de Ficoll-Paque en otro tubo de ensayo de 50 mL y se centrifuga durante 25 minutos a 20°C y 583 xg, sin aceleración ni freno, separándose por gradiente de densidad los leucocitos mononucleares (PBMC, “Peripheral blood mononuclear cells”) que forman un halo, de los polimorfonucleares (PMN, “Polymorphonuclear cells”) que quedan depositados en el fondo (Figura 2).

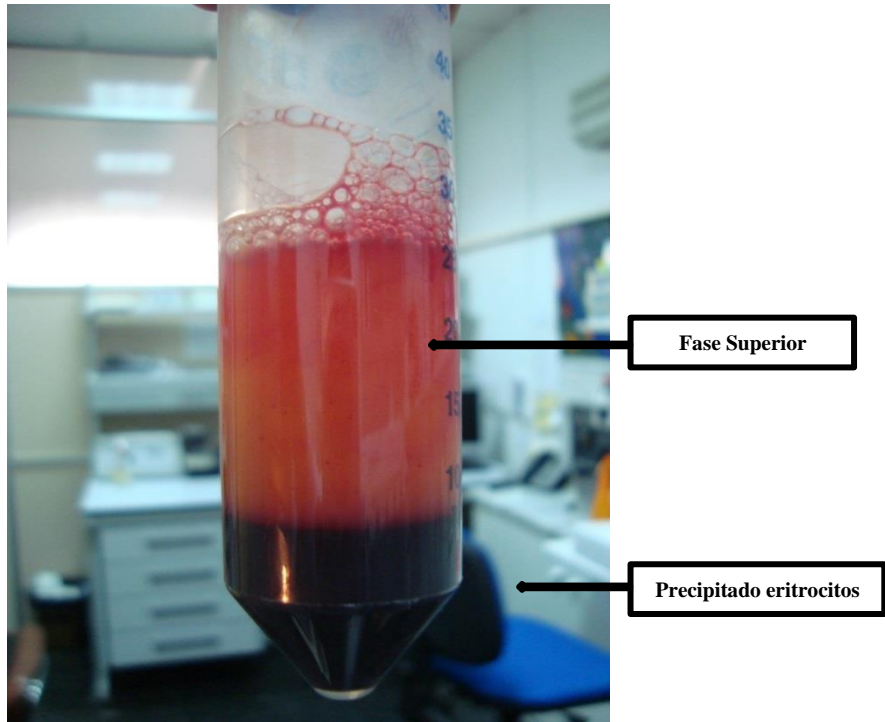


Figura 1. Separación de los eritrocitos del resto de componentes celulares por el tratamiento de la sangre completa con Dextrano al 3 %.

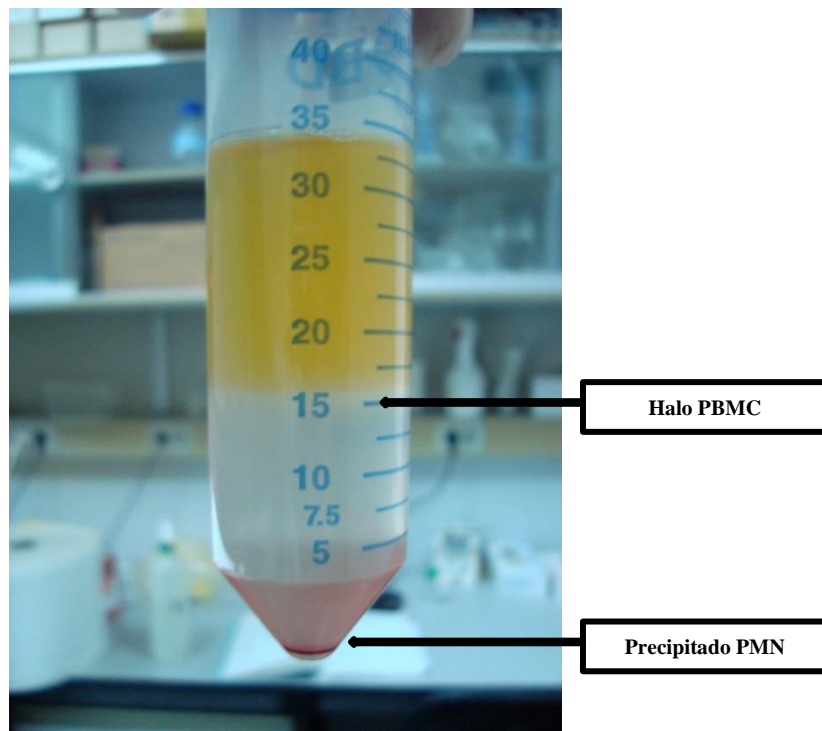


Figura 2. Separación de los leucocitos (PBMC y PMN) por centrifugación y gradiente de densidad.

3.3.2.1.1.1. Leucocitos Mononucleares (PBMC)

Estas células se localizan en el halo citado en el punto anterior (Figura 2). Se obtuvo la suspensión que constituye dicha fase utilizando una pipeta pasteur y tras llevarla a un nuevo tubo de ensayo de 50 mL, se aislaron las células mediante centrifugación durante 10 minutos a 20°C y 583 xg, con lo cual precipitan en el fondo. Este proceso fue seguido de un lavado del precipitado con HBSS (sin Ca²⁺ ni Mg²⁺) y posterior resuspensión en medio de cultivo RPMI completo, suplementado con suero fetal bovino inactivado (10 % v/v), penicilina/estreptomicina (1 % v/v), glutamina (1 % v/v) y piruvato sódico (1 % v/v).

3.3.2.1.1.2. Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)

En el paso inicial, estas células se quedan depositadas en el fondo del tubo de ensayo junto con restos de eritrocitos (Figura 2). Para separarlos se someten a un proceso de lisis utilizando una solución específica para ello (solución de cloruro amónico, bicarbonato sódico y EDTA sódica disueltos en agua miliQ) y tras centrifugación durante 5 minutos a 20°C y 259 xg, se obtiene un precipitado que es sometido a un proceso de lavado con HBSS y resuspensión en medio de cultivo RPMI completo, con las mismas características descritas en el apartado anterior.

3.3.2.1.2. Células endoteliales

Las células endoteliales aisladas de venas de cordón umbilical humano (HUVEC, “Human Umbilical Vein Endothelial Cells”) se obtuvieron de venas de cordones umbilicales humanos procedentes de donantes sanas que acababan de dar a luz en el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Estos cordones eran recogidos en el quirófano de partos en un contenedor para muestras clínicas con una solución salina tamponada (PBS) y transportados lo más rápidamente posible al Departamento de Farmacología de la Universitat de València para ser procesados y utilizados en la realización de las pruebas experimentales correspondientes al estudio de la interacción leucocito-endotelio.

Tras identificar el trayecto vascular y su luz se procedió a su lavado con PBS a 37°C para posteriormente rellenar la vena con el volumen necesario (dependiendo del tamaño de la muestra) de una solución enzimática de colagenasa tipo I (1mg/mL en PBS). Para ello se cerraba un extremo del

cordón con una pinza y se insertaba en el otro una llave de una vía sujeta con hilo que permitía la introducción de la solución enzimática con una jeringa de 10 mL (Figura 3). En estas condiciones se llevaba el cordón íntegro al incubador de cultivos celulares, para que se mantuviera a 37°C.



Figura 3. Cordón umbilical íntegro con la vena rellena de una solución enzimática de collagenasa.

La finalidad de este tratamiento enzimático fue separar y aislar las células endoteliales del resto de la pared vascular. Para ello se mantuvo este tratamiento durante el tiempo necesario para realizar dicha función sin sobrepasarlo para evitar que dicha solución pudiera lesionar las células (aproximadamente 15-20 minutos, controlando de forma repetida la evolución del proceso). Posteriormente se manipularon los cordones suavemente, de forma mecánica, para asegurar una separación celular lo más eficaz posible. El contenido de la luz venosa, que constituía una suspensión celular, se recogió en un tubo de ensayo y se adicionó un volumen similar de una solución de RPMI suplementado con suero fetal bovino (20 % v/v) con la finalidad de detener la actividad enzimática. A continuación esta suspensión fue sometida a centrifugación durante 5 minutos a 20°C y 259 xg, obteniéndose un precipitado compuesto por células endoteliales que se resuspendió en 5 mL de EGM-2, medio de cultivo idóneo para este tipo celular.

Finalmente, teniendo en cuenta que para cultivar las células endoteliales necesitan adherirse a una superficie, esta suspensión se depositó en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie de crecimiento (Figura 4).



Figura 4. Frasco de cultivo de 25 cm² de superficie de crecimiento.

Estos cultivos se llevaron al incubador de cultivos celulares, cuyas condiciones permitían el crecimiento y proliferación de las células hasta que fueron confluyendo y llegaron a formar una monocapa (confluencia del 100 %) (Figura 5). Cada 48 horas se renovaba el medio de cultivo para que la situación de las células fuera óptima.



Figura 5. Monocapa de células endoteliales.

Cuando este cultivo primario se encontraba formando una monocapa, se procedió a realizar un primer pase de las células despegándolas de la

superficie a la que se estaban adheridas mediante su exposición a un tratamiento enzimático con tripsina (solución tripsina-EDTA, 0.25 %). Como éste resulta agresivo para las células, el tiempo de tratamiento debe ser el mínimo posible, por lo que el proceso se realizó bajo control microscópico mediante el microscopio invertido de contraste de fases, y en cuanto las células se liberaron (aproximadamente 3 minutos) se detuvo la actividad enzimática adicionando una solución de EGM-2. A continuación se recogió esta suspensión celular, llevándola a un tubo de ensayo y tras centrifugación durante 5 minutos a 20°C y 259 xg, se obtuvo un precipitado que se resuspendió en el medio de cultivo EGM-2.

La suspensión celular así obtenida se transfirió, repartiéndola de forma homogénea, a una placa de cultivo de 6 pocillos (Figura 6), en cada uno de los cuales había depositado un cubre-objetos circular, de 25 mm de diámetro, tratado previamente con fibronectina (5 µg/mL) que permite la adhesión de las células endoteliales. En estas condiciones las células crecieron y proliferaron, sobre la superficie del cubre-objetos, dando lugar a un cultivo celular de primer pase que fue el que se utilizó en la realización de los experimentos. Hasta que las células llegaron al 100 % de confluencia y formaron una monocapa sobre el cubre-objetos el medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Estos cultivos se mantuvieron durante todo el tiempo en el incubador de cultivos celulares descrito previamente hasta la realización de los experimentos.



Figura 6. Placa de cultivo de 6 pocillos.

3.3.2.2. Estudio de la interacción leucocito-endotelio mediante el sistema “in vitro” de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo.

Para poder realizar un estudio comparativo de la interacción leucocito-endotelio entre el grupo de niños con $z\text{-IMC} > 1$ (estudio) y el de $-1,7 \leq z\text{-IMC} \leq 1$ (control), se utilizaron leucocitos PMN o PBMC obtenidos de las muestras de sangre total de los pacientes y células HUVEC obtenidas del cordón umbilical de donantes sanas, según los protocolos descritos en los apartados anteriores.

Estos experimentos se realizaron en la cámara paralela de flujo. En primer lugar, con la cámara abierta (Figura 7) se depositó en la hendidura dispuesta para ello en la placa inferior, un cubre-objetos en cuya superficie había crecido una monocapa de células HUVEC, según el protocolo descrito en el punto anterior.

Una vez cerrada dicha cámara y dispuestas las conexiones pertinentes (Figura 8), estas células se expusieron al flujo constante del fluido que se perfundió por el interior de la cámara.

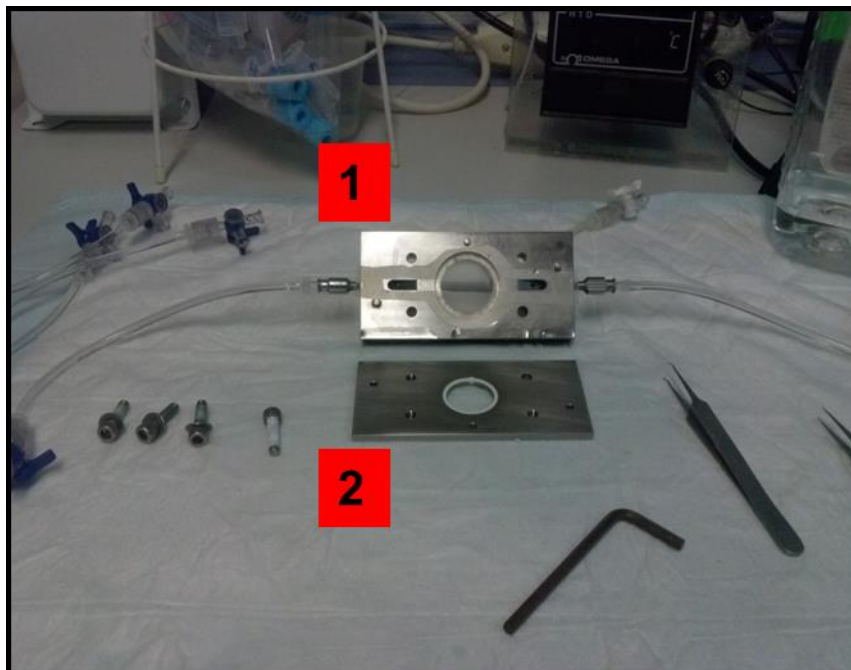


Figura 7. Cámara paralela de flujo abierta. 1: Placa superior calefactora; 2: Placa inferior con una hendidura circular de 25 mm de diámetro donde ajusta el cubre-objetos con la monocapa de células HUVEC.

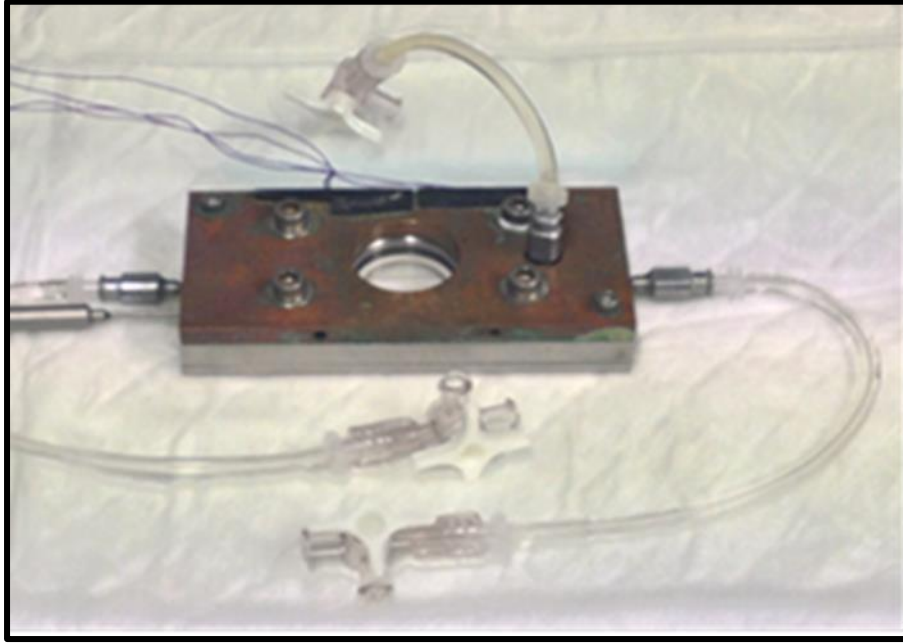


Figura 8. Cámara paralela de flujo cerrada. Las conexiones a la cámara permiten que se perfunda la suspensión leucocitaria por su interior.

Este fluido consistió en una suspensión de las células leucocitarias PMN o PBMC en una solución tamponada, DPBS (con Ca^{2+} y Mg^{2+}) a la que se añadió HSA (0.1 %). Esta suspensión se preparó a una concentración de 1×10^6 células/mL (PMN) y 0.5×10^6 células/mL (PBMC), previo conteo de las mismas con el hemocitómetro, utilizando el microscopio invertido de contraste de fases y tras tratarlas con una solución de azul tripán (“Trypan blue”) para excluir las células no viables. Dicha solución se perfundió sobre la monocapa de células HUVEC a un flujo constante de 0.36 mL/min (0.7 dinas/cm^2) utilizando la bomba de infusión/succión continua, trabajando en modo succión.

El sistema de observación, seguimiento y registro del experimento consiste en el microscopio invertido de contraste de fases (Nikon) unido a la cámara de vídeo (Sony) conectada a un ordenador. La cámara paralela de flujo queda dispuesta sobre la pletina del microscopio (Figura 9), centrando la superficie acristalada en el objetivo, lo que permite visualizar las células y grabar las imágenes de forma continua, en tiempo real, en el ordenador para su posterior revisión y análisis mediante el programa informático de visionado de video de “Pinnacle Studio”, descrito en el apartado de equipos. La Figura 10 muestra el sistema completo con sus diferentes componentes.

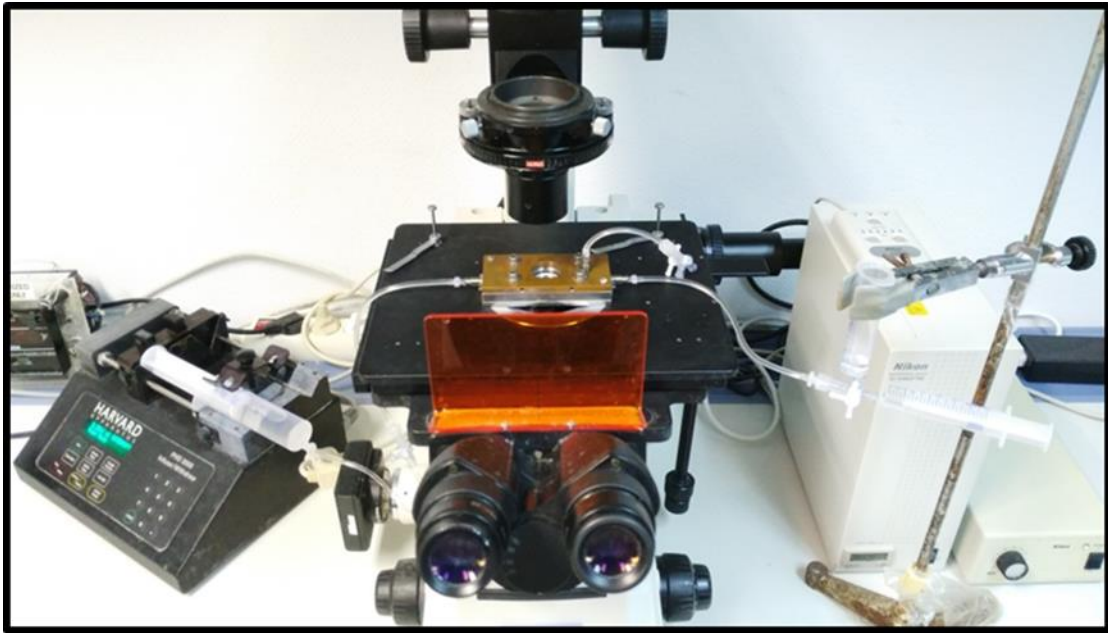


Figura 9. Cámara paralela de flujo montada sobre la pletina del microscopio.

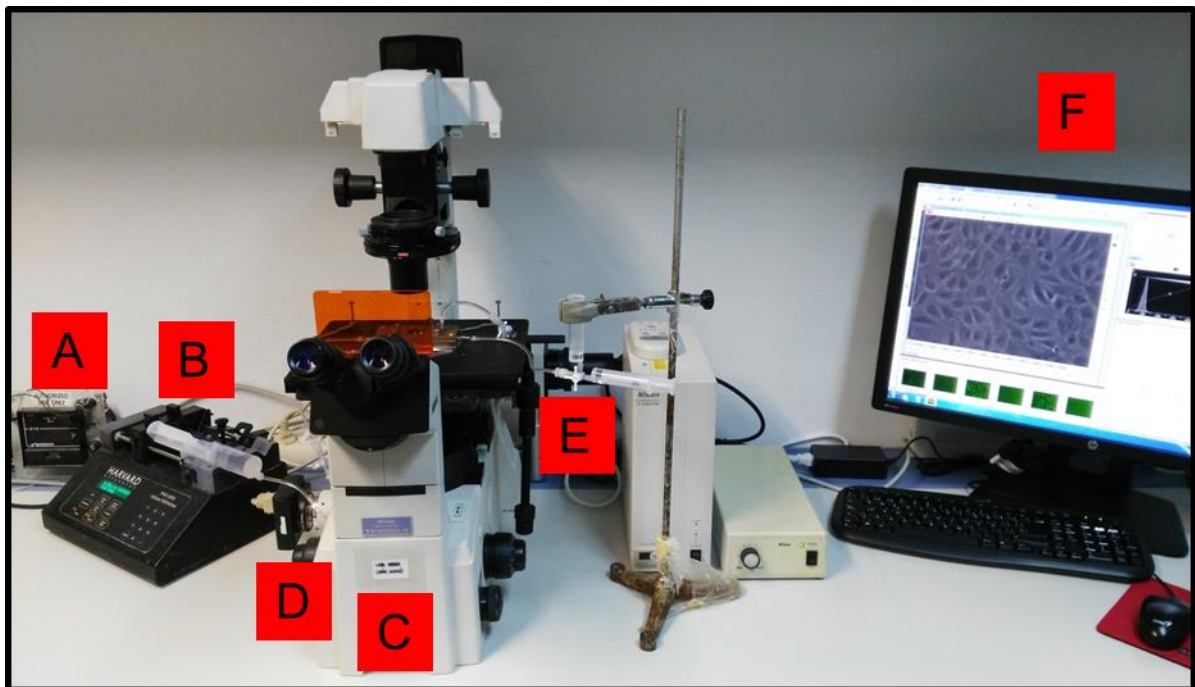


Figura 10. Montaje completo del sistema de cámara paralela de flujo. A: Regulador de temperatura; B: Bomba de infusión/succión; C: Microscopio invertido; D: Videocámara; E: Soporte para jeringa con suspensión de leucocitos; F: Monitor de ordenador conectado a la videocámara.

Con este sistema y utilizando un objetivo 40x se pueden observar las células HUVEC, el flujo de leucocitos y sus posibles interacciones con la monocapa. Los 3 parámetros objeto de nuestro análisis y que nos indican dichas interacciones son: la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión de los leucocitos a la monocapa de HUVEC.

Una vez seleccionado un campo de visualización de las células HUVEC, se inicia el experimento con la perfusión de la suspensión leucocitaria. Cuando se visualiza el paso de los primeros leucocitos sobre la monocapa comienza la grabación y se mantiene sobre dicho campo durante 5 minutos (ello nos permite valorar los 2 primeros parámetros), para posteriormente grabar 5-6 campos adicionales durante 10 segundos cada uno de ellos (que son utilizados para evaluar la adhesión leucocitaria).

3.3.2.2.1. Parámetros de la interacción leucocito-entotelio

Como hemos comentado en el apartado anterior, los 3 parámetros que nos indican la interacción de los leucocitos con el endotelio, utilizando este método experimental “in vitro”, son (Figura 11):

- La velocidad de rodamiento leucocitario.
- El rodamiento leucocitario.
- La adhesión de leucocitos sobre las células endoteliales.

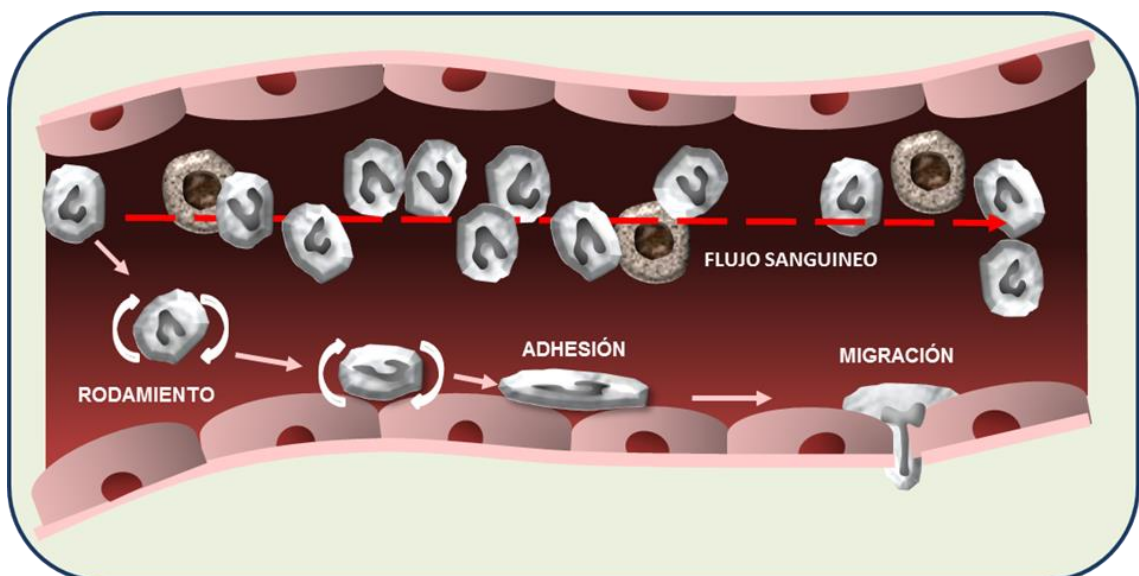


Figura 11. Fases de la interacción leucocito-entotelio. En los experimentos de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo (“flow chamber”) se puede determinar tanto el rodamiento como la adhesión leucocitaria.

3.3.2.2.1.1. Velocidad de rodamiento leucocitario

Es el tiempo necesario para que un leucocito que ha entrado en fase de rodamiento recorra una distancia de 100 μm de la monocapa de células HUVEC. Este parámetro se determina evaluando la media de la velocidad de 20 leucocitos consecutivos. Se expresa como $\mu\text{m/s}$ (Figura 11).

3.3.2.2.1.2. Rodamiento leucocitario

Consideramos a un leucocito en fase de rodamiento cuando se activa su interacción con el endotelio, reduce su velocidad y se hace visible, siguiendo esta metodología experimental puesto que el flujo de la suspensión leucocitaria, a la velocidad de perfusión descrita, no permite la visualización de estas células, en condiciones basales de velocidad (Figura 12.1). Este parámetro se determina contando el número de leucocitos que disminuyen su velocidad sobre una superficie de 100 μm^2 de la monocapa de células HUVEC durante un período de tiempo de 1 minuto. Se expresa como células/min (Figura 11).

3.3.2.2.1.3. Adhesión leucocitaria

Se considera que un leucocito está adherido si se observa que, manteniendo la perfusión continua, permanece adherido en un determinado punto de la monocapa de células HUVEC durante un periodo igual o superior a 30 s. Este parámetro se expresa como el número de células adheridas/ mm^2 (Figuras 11 y 12.2).

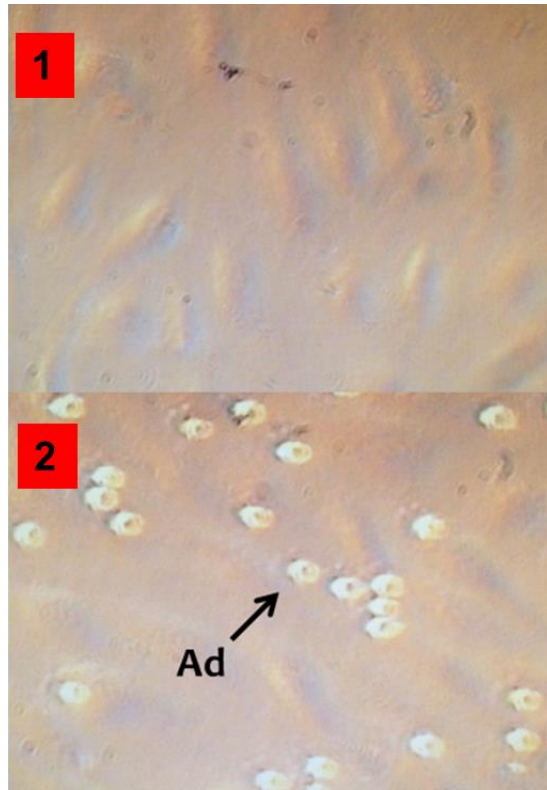


Figura 12. Imágenes representativas de la monocapa de células HUVEC. (1) Monocapa sobre la que se perfunden leucocitos control, que no son visibles porque fluyen a velocidad basal. (2) Monocapa con leucocitos adheridos (Ad) a las células endoteliales. En el caso 1 (control negativo) los leucocitos y las células endoteliales no se encuentran activadas, mientras que en el caso 2 (control positivo) sí que lo están por un estímulo proinflamatorio.

3.3.2.3. Estudio de la expresión de moléculas de adhesión por citometría de flujo.

Para complementar el estudio funcional de la interacción leucocito-endotelio descrito en el apartado anterior, en esta Tesis Doctoral se ha evaluado la expresión de algunas moléculas de adhesión leucocitarias implicadas en dicho proceso mediante citometría de flujo, utilizando el citómetro de flujo referenciado en el apartado de aparatos (Figura 13).

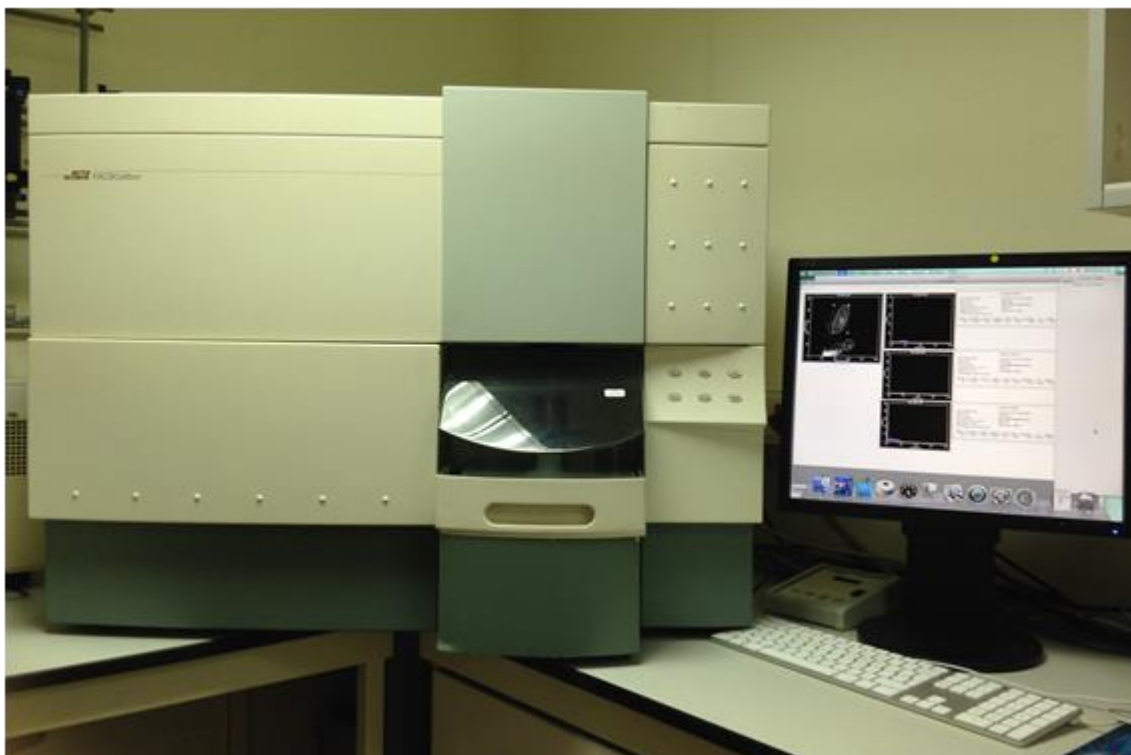


Figura 13. Citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences)

Diferentes alícuotas de 40 μ L de sangre entera de los pacientes de los grupos estudio y control se incubaron, durante 20 minutos, a 4°C, en oscuridad, con los correspondientes anticuerpos frente a distintas moléculas de adhesión conjugados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) a saturación. Las moléculas de adhesión evaluadas fueron: CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), CD11c (gp150.95), CD18 (integrinas β_2), CD49d (VLA-4), CD62L (L-selectina). IgG1 se utilizó como anticuerpo control. Como control positivo de la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias, se trató la sangre con PAF (10 μ M) durante 1 hora.

Tras el período de incubación, estas alícuotas fueron lisadas y fijadas (con la solución “FACS Lysing Solution”) y se procedió a procesar en el equipo descrito, las muestras obtenidas, pudiendo identificar, en base a las características de tamaño y granulosidad, los distintos tipos leucocitarios: neutrófilos, monocitos y linfocitos (Figura 14).

Para determinar la expresión de las diferentes moléculas de adhesión se analizó la mediana de la intensidad de fluorescencia obtenida de diez mil eventos por muestra.

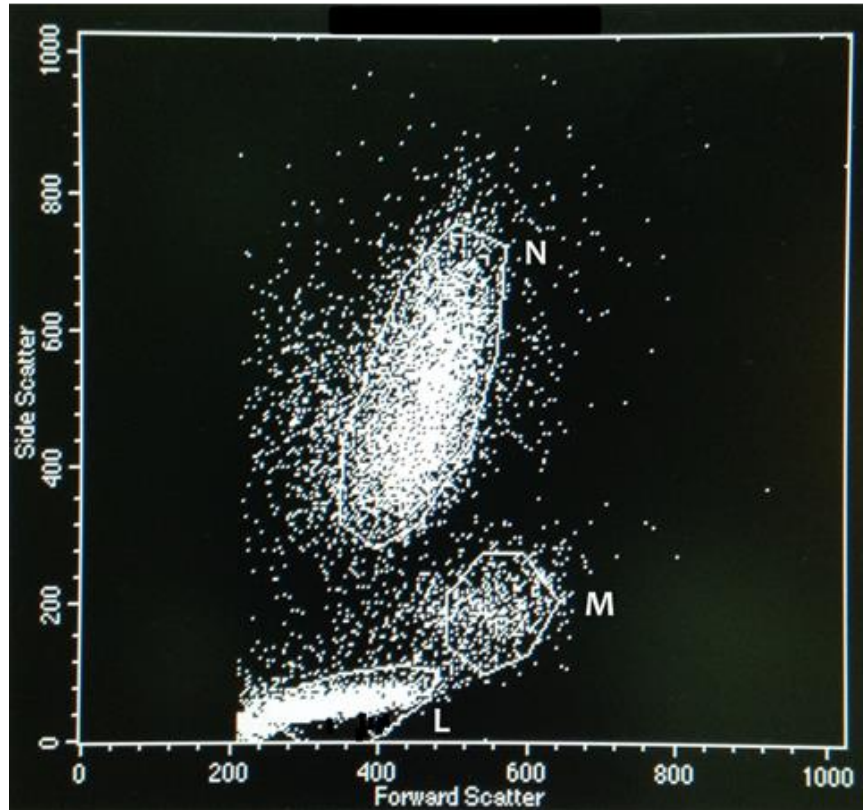


Figura 14. Histograma representativo de las diferentes poblaciones de leucocitos identificadas de acuerdo a su tamaño (eje de abscisas) y granulosidad (eje de ordenadas). N: Neutrófilos; M: Monocitos; L: Linfocitos.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de todos los parámetros evaluados, entre los 2 grupos experimentales (estudio y control) y en su caso entre los 2 géneros (niños y niñas) dentro de un mismo grupo, se ha realizado mediante el test t de Student para datos no pareados, sobre los valores obtenidos expresados como la Media aritmética \pm Error Estándar de la Media (EEM).

La posible relación entre diferentes variables se ha evaluado mediante un análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson.

En todos los casos se ha considerado una significatividad con un nivel mínimo de $p < 0.05$.

En algunos casos, como en los estudios de citometría de flujo, los datos representan porcentajes de expresión de cada una de las moléculas de adhesión en el grupo estudio en comparación con la expresión en el grupo control (cuyo valor obtenido se considera el 100 %).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE POBLACIÓN ESTUDIADA

El estudio se ha realizado sobre una muestra de población de 82 niños (de ambos sexos) cuyas edades estaban comprendidas entre 7 y 16 años, estableciendo los siguientes grupos en función del z-IMC:

- a) Grupo estudio, lo denominaremos obesos y comprende todos los pacientes que presentan un valor de $z\text{-IMC} > 1$ (n=49). Este grupo se subdividió en tres: niños con sobrepeso $1 < z\text{-IMC} \leq 2$, obesidad $2 < z\text{-IMC} \leq 3$ y obesidad extrema, $z\text{-IMC} > 3$
- b) Grupo control, todos los pacientes presentan un $-1,7 \leq z\text{-IMC} \leq 1$ (n=33).

La Figura 15 y Tabla 1 presentan las características generales (edad, sexo) de los pacientes incluidos en cada uno de los 2 grupos. Como vemos existe una distribución homogénea de los grupos en relación a la edad, sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en relación al estadio Tanner, los obesos presentan un desarrollo puberal más precoz que los controles y las niñas que los niños, al desglosarlo en función del género, aunque en este caso las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 16). La Figura 17 muestra la frecuencia de distribución del grupo estudio según el género y el z-IMC.

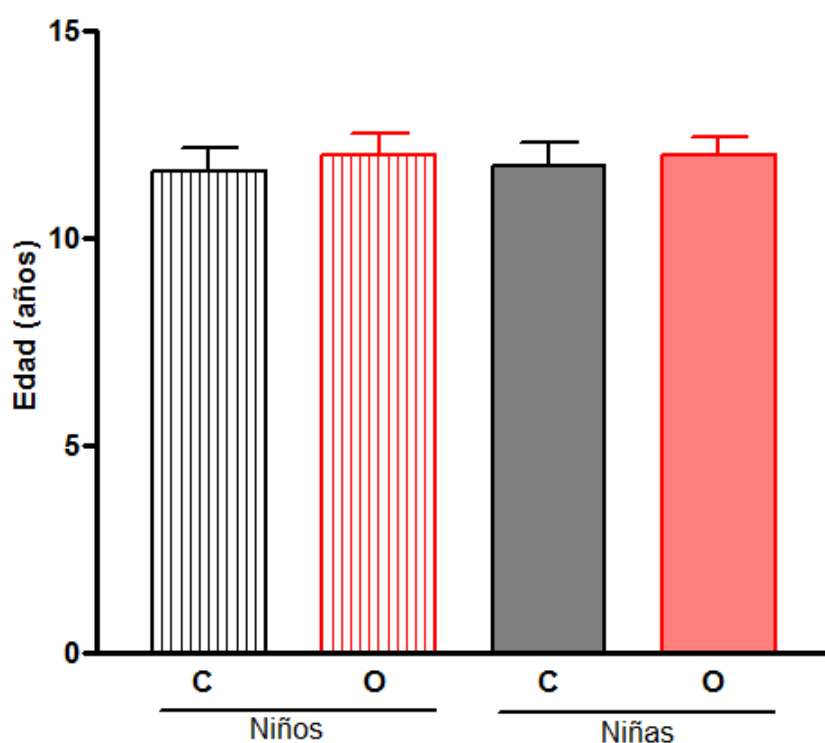


Figura 15. Media \pm EEM de las edades de los grupos experimentales. C: Controles; O: Obesos.

		Edad						
Grupo		n = 82	Media	EEM	Mediana	Mínimo	Máximo	
A	C	33	11,69	0,39	11,7	7,22	16,15	
	O	49	12,01	0,33	12,37	7,00	16,00	
B	Niños	C	19	11,63	0,56	11,80	7,22	16,15
		O	22	12,02	0,50	12,83	7,50	15,85
	Niñas	C	14	11,76	0,54	11,28	7,68	15,00
		O	27	12,01	0,45	12,00	7,00	16,00

Tabla 1. Distribución de edades de los 2 grupos experimentales (C: controles; O: obesos) (A), y tras su desglose en función del género (B). Los valores indican la edad (excepto la columna del número de pacientes, n).

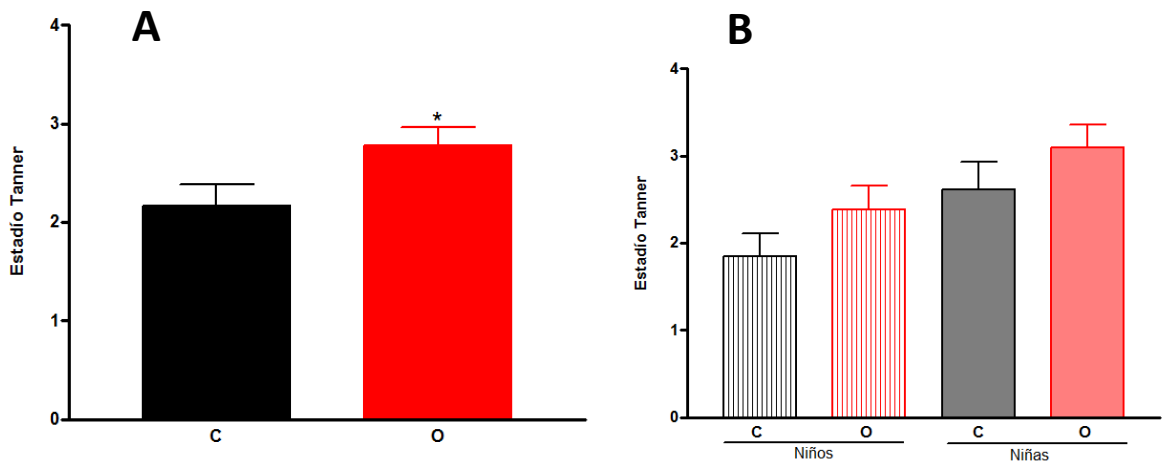


Figura 16. Estadío Tanner (Media \pm EEM) de los 2 grupos experimentales (controles y obesos) (A) y tras su desglose en función del género (B). (C) Controles; (O) Obesos. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

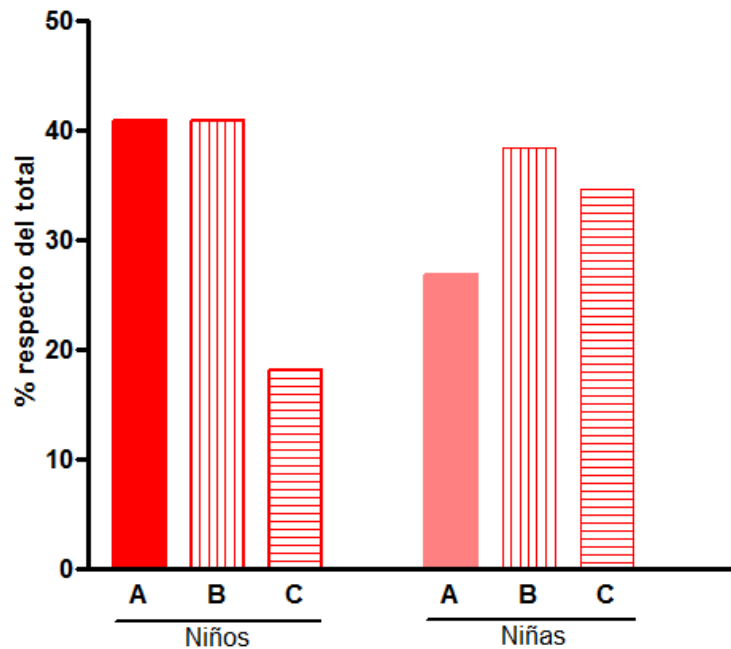


Figura 17. Frecuencia de distribución del grupo estudio (obesos) según el género y el z-IMC. (A): $1 < Z \leq 2$; (B): $2 < Z \leq 3$; (C) $Z > 3$.

4.2. RESULTADOS DE LA EXPLORACIÓN FÍSICA Y DE LOS PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

Las Tablas 2 y 3 muestran los resultados obtenidos en la exploración física y evaluación de los parámetros antropométricos descritos en el apartado de metodología.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
IMC (Kg/m²)	18,47 ± 0,57	28,56 ± 0,65 ^{***}
z-IMC	-0,32 ± 0,16	2,62 ± 0,17 ^{***}
Masa grasa (%)	22,11 ± 1,19	36,19 ± 0,86 ^{***}
PAS (mm Hg)	107,30 ± 2,10	116,5 ± 1,48 ^{***}
PAD (mm Hg)	61,65 ± 1,85	67,13 ± 1,44 [*]
P cintura (cm)	65,25 ± 1,76	89,36 ± 1,43 ^{***}
P cadera (cm)	75,56 ± 1,79	97,70 ± 1,59 ^{***}

Tabla 2. Resultados antropométricos y de la exploración física de los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05, y *** p < 0.001 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; IMC: Índice de masa corporal; z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; P cintura: perímetro de la cintura; P cadera: perímetro de la cadera.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
IMC (Kg/m²)	17,24 ± 0,64	27,68 ± 0,65 ^{***}	20,14 ± 0,85 ⁺⁺	29,31 ± 1,06 ^{***}
z-IMC	-0,66 ± 0,20	2,38 ± 0,21 ^{***}	0,13 ± 0,20 ⁺⁺	2,81 ± 0,26 ^{***}
Masa grasa (%)	18,83 ± 1,43	33,98 ± 1,14 ^{***}	27,03 ± 0,96 ⁺⁺⁺	38,04 ± 1,15 ^{***,+}
PAS (mm Hg)	107,90 ± 2,87	118,00 ± 2,06 ^{***}	106,3 ± 3,13	115,10 ± 2,12 [*]
PAD (mm Hg)	60,94 ± 2,69	68,23 ± 2,33 [*]	62,80 ± 2,25	66,09 ± 1,75
P cintura (cm)	63,19 ± 1,83	92,08 ± 1,65 ^{***}	68,55 ± 3,40	86,9 ± 2,16 ^{***}
P cadera (cm)	72,50 ± 1,99	99,39 ± 1,82 ^{***}	80,45 ± 2,86 ⁺	96,11 ± 2,57 ^{***}

Tabla 3. Resultados antropométricos y de la exploración física de los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 respecto de sus controles. + p < 0.05, ++ p < 0.01 y +++ p < 0.001 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. IMC: Índice de masa corporal; z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; P cintura: perímetro de la cintura; P cadera: perímetro de la cadera.

Como se puede observar existen diferencias estadísticamente significativas, con distinto grado de significatividad, entre el grupo estudio y el grupo control en los parámetros reseñados: IMC, z-IMC, porcentaje de masa grasa, presión arterial, fundamentalmente sistólica, y perímetro de la cintura y cadera. Estas diferencias se mantienen, en general, cuando los grupos se dividen en función del sexo. En este último caso, en relación a la presión arterial, las diferencias son más significativas en los niños que en las niñas e incluso en la presión arterial diastólica solo se mantienen significativas en los niños. Por otro lado, cabe reseñar que en el IMC (y en el z-IMC) existen diferencias estadísticamente significativas en el grupo control entre los niños y las niñas. Este mismo hecho también se presenta en el porcentaje de masa grasa, manteniéndose dichas diferencias, en función del sexo, en el grupo estudio.

En cualquier caso, cabe reseñar en relación a la presión arterial sistólica y diastólica, que aunque el grupo de obesos presenta unos valores más elevados que los controles, estos siempre se mantienen dentro de los límites considerados de normalidad.

También se ha evaluado si existe una relación entre el aumento del z-IMC, porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura, que se da en los niños obesos y entre estas variables y las restantes expuestas, mediante un análisis de regresión lineal y del coeficiente de correlación de Pearson (Tabla 4 y Figura18). Hemos observado que el incremento del z-IMC se correlaciona positivamente, de forma significativa, con el porcentaje de masa grasa y que ambos parámetros también presentan una correlación positiva, estadísticamente significativa con el perímetro de la cintura, todo lo cual nos demuestra que este incremento de peso es debido a un aumento de la obesidad y no a un incremento de la masa magra. En el mismo sentido, hemos observado una correlación positiva, estadísticamente significativa, de los tres parámetros con la presión arterial sistólica, por tanto en los pacientes pediátricos evaluados la obesidad se relaciona con un aumento de dicho parámetro, aunque teniendo en cuenta que sus valores se mantienen en todos los casos dentro de los límites de la normalidad.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	Masa grasa (%)	0,9146	< 0,0001 ^{***}
	P cintura (cm)	0,7919	< 0,0001 ^{***}
	PAS (mmHg)	0,3173	0,0070 ^{**}
Masa grasa (%)	P cintura (cm)	0,7731	< 0,0001 ^{***}
	PAS (mmHg)	0,2997	0,0123 [*]
P cintura (cm)	PAS (mmHg)	0,4295	< 0,0005 ^{***}

Tabla 4. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001
z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; PAS: presión arterial sistólica; P cintura: perímetro de la cintura.

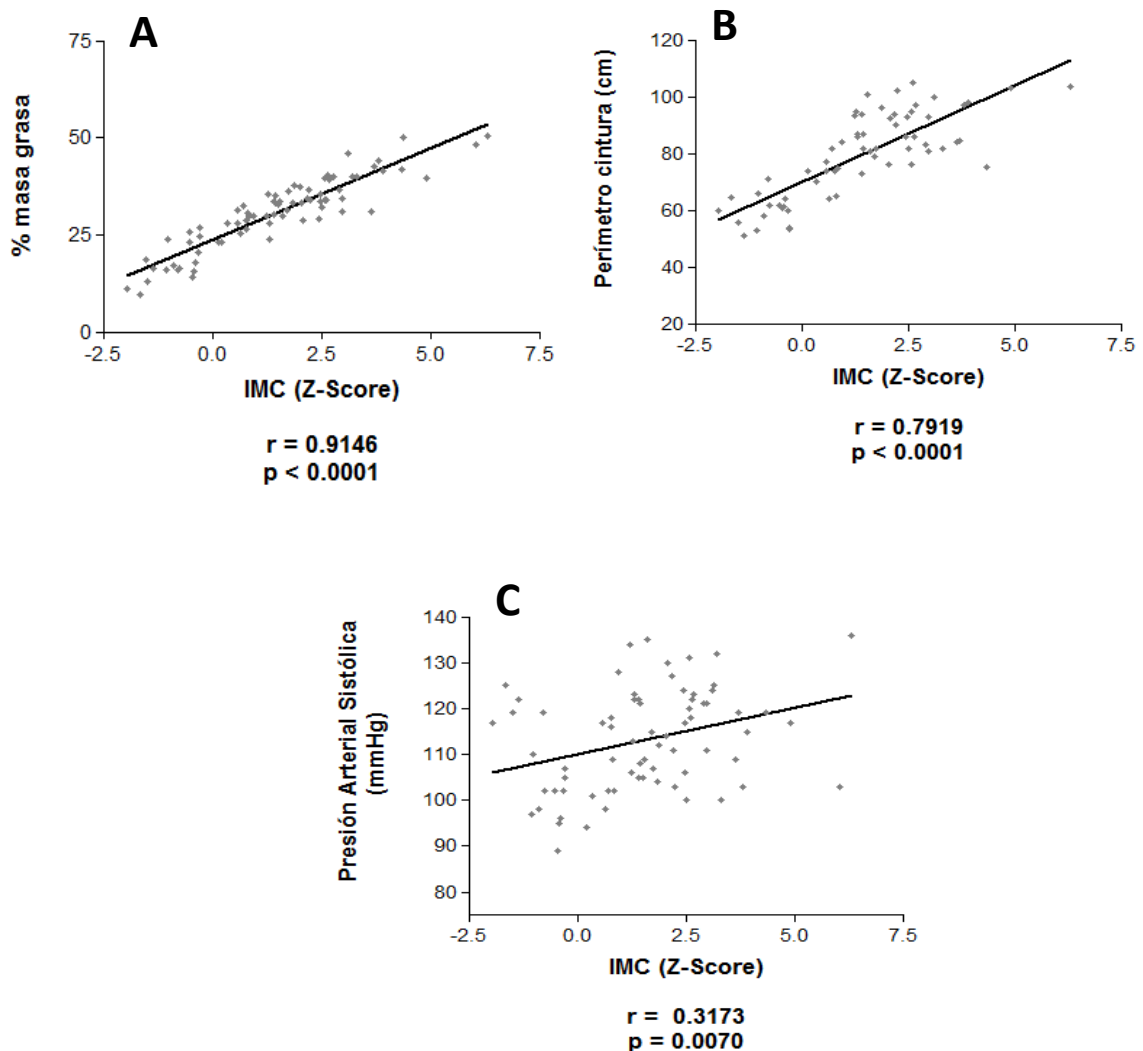


Figura 18. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y (A) porcentaje (%) de masa grasa, (B) perímetro de la cintura y (C) presión arterial sistólica.

4.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS

4.3.1. BIOQUÍMICA CLÍNICA

Dentro del perfil bioquímico hemos evaluado en primer lugar aquellos parámetros considerados como marcadores de riesgo cardiometabólico y de respuesta inflamatoria.

4.3.1.1. Metabolismo hidrocarbonado y lipídico

Las Tablas 5 y 6 reflejan los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros representativos del metabolismo hidrocarbonado (Glucemia basal, Insulina en ayunas e índice HOMA) y del perfil lipídico (colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos y VLDL-colesterol).

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
Glucosa (mg/dL)	91,17 ± 1,01	92,00 ± 0,97
Insulina (μUI/mL)	8,19 ± 0,75	18,05 ± 1,53 ^{***}
HOMA	1,86 ± 0,18	4,19 ± 0,40 ^{***}
Colesterol (mg/dL)	154,20 ± 4,91	156,40 ± 3,11
cLDL (mg/dL)	91,32 ± 4,06	94,60 ± 2,86
cHDL (mg/dL)	50,72 ± 1,76	44,98 ± 1,24 ^{**}
TG (mg/dL)	60,88 ± 4,20	83,27 ± 4,04 ^{***}
cVLDL (mg/dL)	12,16 ± 0,83	16,65 ± 0,81 ^{***}

Tabla 5. Resultados de la evaluación de los parámetros representativos del metabolismo hidrocarbonado y lipídico de los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; HOMA: Índice HOMA de insulinoresistencia; cLDL: LDL-colesterol; cHDL: HDL-colesterol; TG: triglicéridos; cVLDL: VLDL-colesterol.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
Glucosa (mg/dL)	90,68 ± 1,47	91,55 ± 1,07	92,00 ± 1,10	92,37 ± 1,54
Insulina (µUI/mL)	6,53 ± 0,58	13,82 ± 1,10 ^{***}	11,05 ± 1,46 ⁺⁺	21,35 ± 2,42 ^{*,+}
HOMA	1,47 ± 0,14	3,16 ± 0,26 ^{***}	2,53 ± 0,36 ⁺⁺	4,99 ± 0,64 ^{*,+}
Colesterol (mg/dL)	158,20 ± 4,80	152,00 ± 4,33	147,80 ± 10,21	160,2 ± 4,37
cLDL (mg/dL)	94,20 ± 3,96	91,64 ± 3,96	86,09 ± 8,99	97,12 ± 4,09
cHDL (mg/dL)	52,21 ± 2,46	45,55 ± 1,86 [*]	48,54 ± 2,37	44,52 ± 1,69
TG (mg/dL)	57,53 ± 6,12	73,73 ± 4,60 [*]	65,77 ± 5,14	91,35 ± 5,99 ^{*,+}
cVLDL (mg/dL)	11,53 ± 1,23	14,77 ± 0,93 [*]	13,08 ± 0,98	18,23 ± 1,20 ^{*,+}

Tabla 6. Resultados de la evaluación de los parámetros representativos del metabolismo hidrocarbonado y lipídico de los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 respecto de sus controles. +p < 0.05, y ++p < 0.01 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; HOMA: Índice HOMA de insulinoresistencia; cLDL: LDL-colesterol; cHDL: HDL-colesterol; TG: triglicéridos; cVLDL: VLDL-colesterol.

Como podemos observar, la glucemia basal no presenta diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes obesos. Por el contrario, tanto la insulina como el índice HOMA presentan un incremento estadísticamente significativo en el grupo estudio frente a los controles (Figura 19). Cuando se valora las posibles diferencias en función del sexo, se observa que las niñas presentan de forma estadísticamente significativa, valores más elevados de ambos parámetros frente a los niños tanto en el grupo control como en los obesos. A su vez el incremento, tanto de insulina como del índice HOMA, en los pacientes obesos frente a los controles se da en ambos sexos.

Teniendo en cuenta que, en relación al índice HOMA, se ha establecido como valor de corte 3,16 para definir a un paciente como resistente o no a insulina, se ha observado que en el grupo de obesos, en los de sexo masculino 40,91 % presentaban un HOMA ≤ 3,16 y 59,09 % un HOMA > 3,16; mientras que en los de sexo femenino 22,22 % presentaban un HOMA ≤ 3,16 y 77,78 % un HOMA > 3,16. Por el contrario, la mayor parte de pacientes del grupo control presentaban valores inferiores a 3,16. Por tanto, en la muestra poblacional estudiada de niños obesos un elevado porcentaje eran insulino-resistentes.

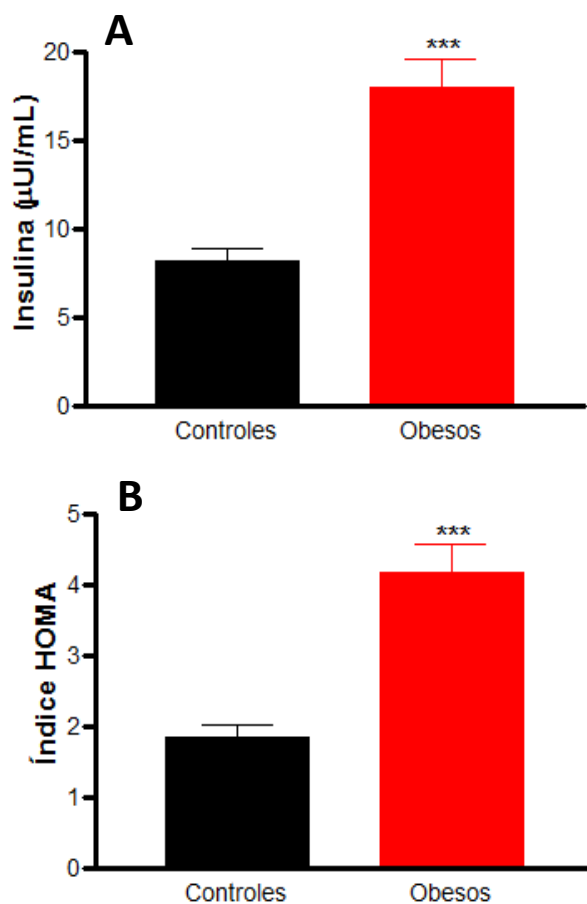


Figura 19. Valores de insulina (A) y del índice HOMA (B) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. *** p < 0.001 respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

En relación al perfil lipídico (Tablas 5 y 6), ni el colesterol total ni el LDL-colesterol presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y estudio. Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, en los restantes parámetros (HDL-colesterol, triglicéridos y VLDL-colesterol (Figura 20). El HDL-colesterol se encuentra reducido en el grupo de obesos en relación con los controles, y cuando se desglosa por sexos la disminución sólo es significativa en los niños. Por el contrario, los triglicéridos y el VLDL-colesterol, se encuentran incrementados y al diferenciar por sexos, el aumento de estos dos últimos parámetros se presenta tanto en los niños como en las niñas, resaltando que en el grupo de obesos, las niñas presentan un aumento

estadísticamente significativo tanto de triglicéridos como de VLDL-colesterol, con respecto a los niños.

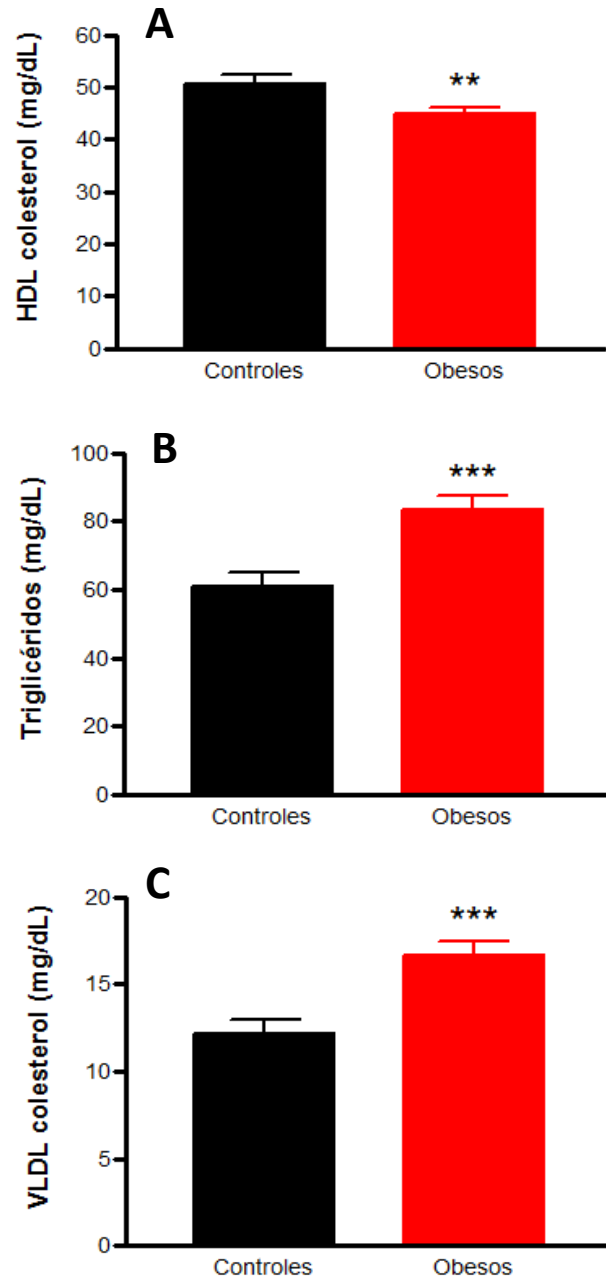


Figura 20. Valores de HDL-colesterol (A), triglicéridos (B) y VLDL-colesterol (C) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. ** p < 0.01 y *** p < 0.001 respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

También se ha evaluado si existe una relación entre cada uno de los parámetros antropométricos y los del metabolismo hidrocarbonado y lipídico estudiado, mediante un análisis de regresión lineal y del coeficiente de correlación de Pearson. La Tabla 7 refleja aquellos parámetros que han mostrado una correlación estadísticamente significativa.

Como podemos observar existe una correlación positiva entre el IMC, expresado como z-Score y la insulina, HOMA, triglicéridos y VLDL-colesterol y negativa con el HDL-colesterol (Figura 21). Un comportamiento similar presenta la correlación entre el porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura y los mismos parámetros (insulina, HOMA, triglicéridos, VLDL-colesterol y HDL-colesterol). En el mismo sentido, el incremento del HOMA, un indicador de resistencia a insulina, se correlaciona negativamente con el HDL-colesterol y positivamente con los triglicéridos y VLDL-colesterol. Ello nos indica que en nuestra muestra poblacional, la obesidad se relaciona con un incremento de los factores considerados de riesgo cardiometabólico como son la resistencia a insulina y las alteraciones en el perfil lipídico, quienes además están relacionadas entre sí.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	Insulina	0,4391	< 0,0001 ^{***}
	HOMA	0,3979	0,0003 ^{***}
	cHDL	-0,4315	< 0,0001 ^{***}
	TG	0,4580	< 0,0001 ^{***}
	cVLDL	0,4594	< 0,0001 ^{***}
Masa grasa (%)	Insulina	0,4090	0,0003 ^{***}
	HOMA	0,3702	0,0013 ^{**}
	cHDL	-0,3182	0,0051 ^{**}
	TG	0,4219	0,0002 ^{***}
	cVLDL	0,4283	0,0002 ^{***}
P cintura (cm)	Insulina	0,4398	0,0003 ^{***}
	HOMA	0,4033	0,0010 ^{**}
	cHDL	-0,3701	0,0026 ^{**}
	TG	0,4423	0,0003 ^{***}
	cVLDL	0,4414	0,0003 ^{***}
HOMA	cHDL	-0,3385	0,0026 ^{**}
	TG	0,3811	0,0006 ^{***}
	cVLDL	0,3794	0,0007 ^{***}

Tabla 7. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; HOMA: Índice HOMA de insulinoresistencia; cLDL: LDL-colesterol; cHDL: HDL-colesterol; TG: triglicéridos; cVLDL: VLDL-colesterol.

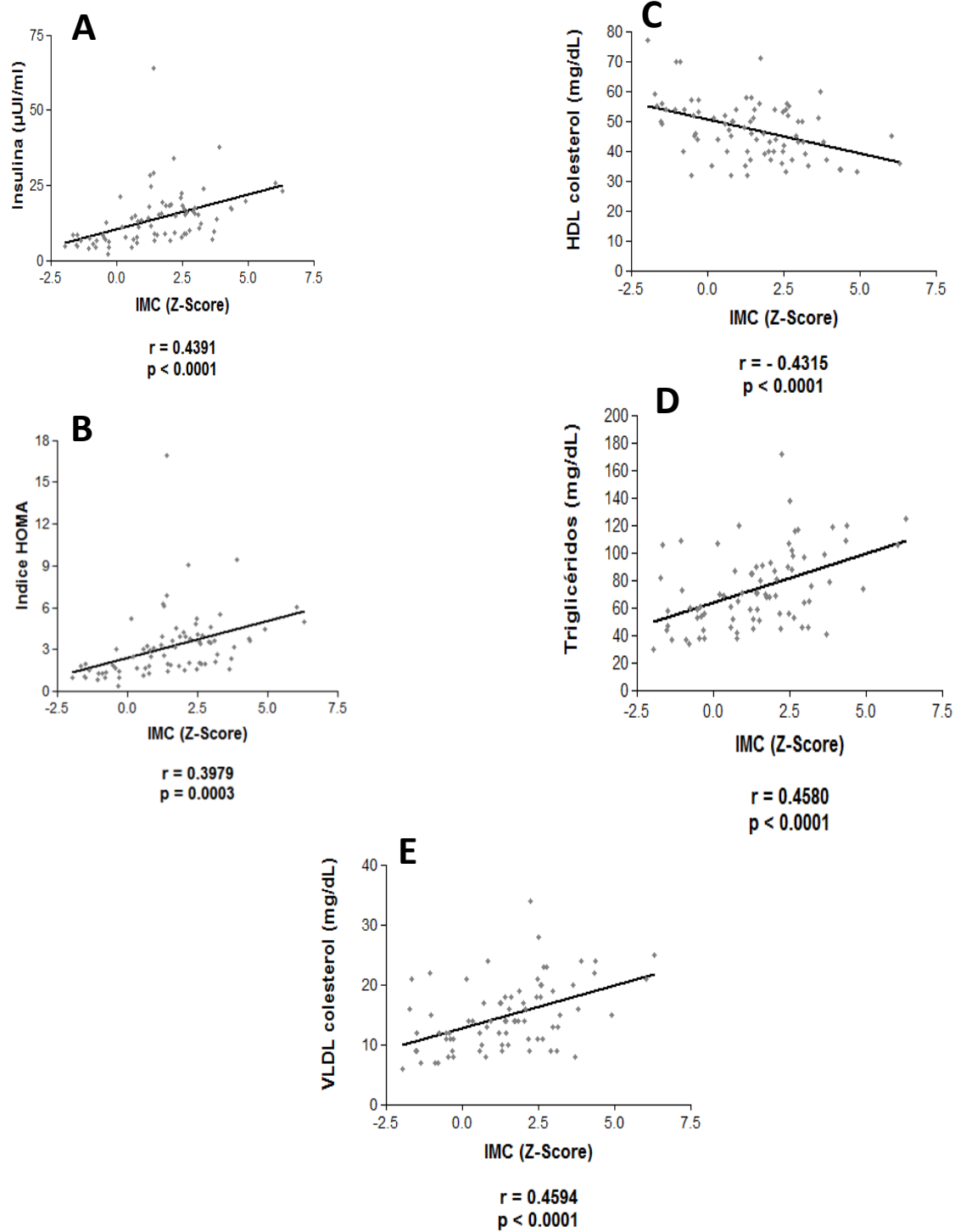


Figura 21. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la insulina (A), índice de resistencia insulínica (HOMA) (B), HDL-colesterol (C), triglicéridos (D) y VLDL-colesterol (E).

4.3.1.2. Proteínas específicas

Las Tablas 8 y 9 muestran los resultados obtenidos tras la evaluación de determinadas proteínas específicas (PCRus, RBP4, Apo A1 y Apo B), que han sido postuladas como posibles marcadores de una respuesta inflamatoria incipiente o subclínica y de riesgo cardiovascular. Junto a éstas hemos valorado otras determinaciones realizadas de forma rutinaria como las proteínas totales o la albúmina.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
Prot. Totales (g/dL)	7,16 ± 0,08	7,27 ± 0,05
Albúmina (g/dL)	4,36 ± 0,05	4,39 ± 0,04
PCR (mg/L)	0,89 ± 0,23	2,98 ± 0,44 ^{**}
RBP4 (mg/dL)	2,75 ± 0,18	3,71 ± 0,18 ^{***}
Apo A1 (mg/dL)	146,10 ± 4,91	139,2 ± 2,71
Apo B (mg/dL)	72,39 ± 2,76	77,40 ± 2,41

Tabla 8. Resultados de la evaluación de determinadas proteínas específicas en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; Prot. Totales: proteínas totales; PCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad; RBP4: proteína fijadora de retinol; Apo A₁: apolipoproteína A₁; Apo B: apolipoproteína B.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
Prot. Totales (g/dL)	7,17 ± 0,09	7,23 ± 0,06	7,13 ± 0,16	7,3 ± 0,08
Albúmina (g/dL)	4,40 ± 0,07	4,40 ± 0,04	4,30 ± 0,07	4,39 ± 0,07
PCR (mg/L)	0,91 ± 0,33	3,52 ± 0,78 ^{**}	0,85 ± 0,26	2,54 ± 0,50 [*]
RBP4 (mg/dL)	2,73 ± 0,21	3,82 ± 0,30 ^{**}	2,78 ± 0,35	3,62 ± 0,22 [*]
Apo A1 (mg/dL)	152,40 ± 6,35	137,20 ± 7,14 [*]	136,20 ± 7,14	140,80 ± 4,17
Apo B (mg/dL)	71,21 ± 3,09	73,05 ± 3,29	74,25 ± 5,32	80,92 ± 3,34

Tabla 9. Resultados de la evaluación de determinadas proteínas específicas en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. ^{*} p < 0.05 y ^{**} p < 0.01 respecto de sus controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; Prot. Totales: proteínas totales; PCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad; RBP4: proteína fijadora de retinol; Apo A₁: apolipoproteína A₁; Apo B: apolipoproteína B.

Como podemos observar, las proteínas totales o la albúmina no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los niños controles y los obesos. Por el contrario, dentro de las proteínas específicas tanto la PCRus como RBP4 se encuentran elevadas, de forma estadísticamente significativa, en los niños obesos en comparación con los controles (Figura 22). Cuando se desglosan estos resultados en función del sexo, dicho incremento se mantiene, pero se observa un aumento mayor en los niños que en las niñas. En relación a las apolipoproteínas sólo se observa en la A1 diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en los niños.

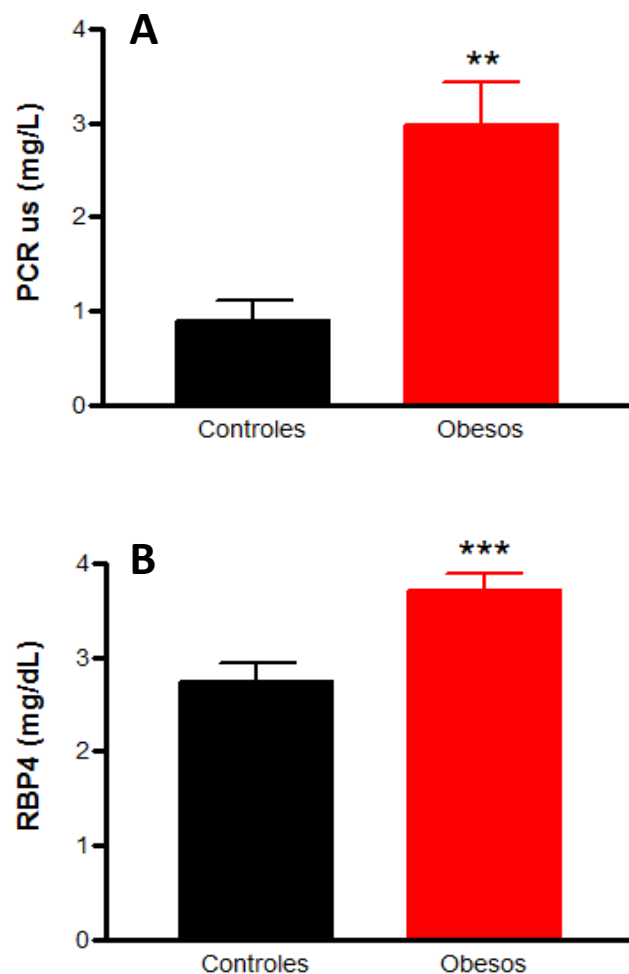


Figura 22. Valores de la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRus) (A) y la proteína fijadora de retinol (RBP4) (B) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Hemos evaluado la posible relación entre los parámetros antropométricos IMC (expresado como z-IMC), porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura, con la PCRus y la RBP4, mediante un análisis de regresión lineal y la evaluación del coeficiente de correlación de Pearson. Como muestra la Tabla 10 y Figura 23, existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el IMC y ambas proteínas, mientras que en los restantes parámetros antropométricos la correlación solo es significativa con la PCRus. Estos resultados nos sugieren que la obesidad se relaciona fundamentalmente con un aumento de la PCRus, que es un parámetro aceptado como biomarcador de una respuesta inflamatoria.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	PCR	0,4691	< 0,0001 ^{***}
	RBP4	0,299	0,0083 ^{**}
Masa grasa (%)	PCR	0,4532	< 0,0001 ^{***}
	RBP4	0,161	0,1736
P cintura (cm)	PCR	0,4087	0,0011 ^{**}
	RBP4	0,1945	0,1234

Tabla 10. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; PCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad; RBP4: proteína fijadora de retinol.

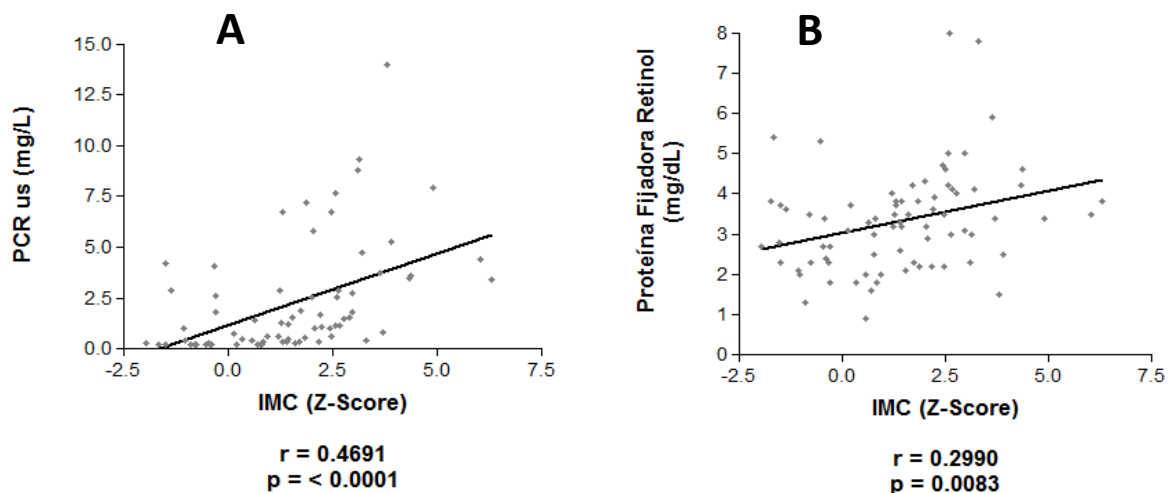


Figura 23. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y las proteínas específicas: proteína C reactiva de alta sensibilidad (A) y proteína fijadora de retinol (B).

4.3.1.3. Minerales

Dentro de los parámetros bioquímicos determinados de forma rutinaria en estos pacientes se han evaluado como minerales el hierro, calcio y fósforo, obteniendo los resultados mostrados en las Tablas 11 y 12.

Como podemos observar los niños obesos presentan una reducción estadísticamente significativa del hierro, en comparación con los controles (Figura 24). Cuando se desglosan los resultados en función del género, aunque se mantiene la reducción tanto en niños como en niñas, no es estadísticamente significativa. Los restantes minerales no presentan diferencias entre los grupos.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
Hierro (µg/dL)	91,87 ± 5,58	75,5 ± 3,73*
Calcio (mg/dL)	9,88 ± 0,06	9,92 ± 0,05
Fósforo (mg/dL)	4,71 ± 0,09	4,62 ± 0,09

Tabla 11. Resultados de la evaluación de determinados minerales en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
Hierro (µg/dL)	97,16 ± 7,51	77,95 ± 6,20	83,50 ± 7,90	73,59 ± 4,62
Calcio (mg/dL)	9,92 ± 0,09	9,96 ± 0,08	9,82 ± 0,08	9,89 ± 0,07
Fósforo (mg/dL)	4,63 ± 0,13	4,68 ± 0,09	4,78 ± 0,09	4,57 ± 0,14

Tabla 12. Resultados de la evaluación de determinados minerales en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n, número de datos.

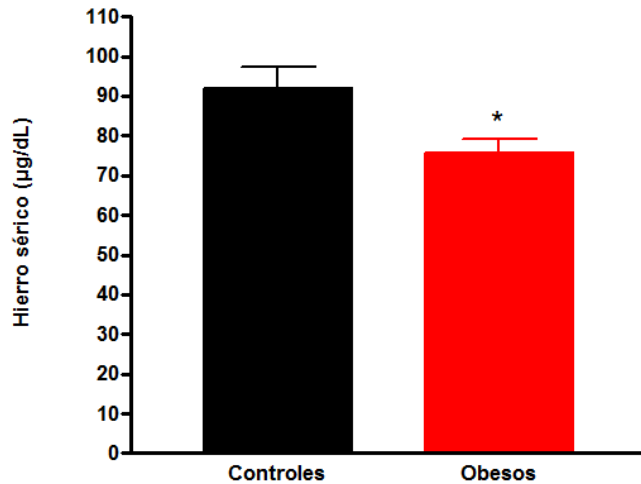


Figura 24. Valores del hierro sérico en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Cuando se evalúa la posible relación entre el z-IMC y la concentración plasmática de hierro, como vemos en la Figura 25, existe una correlación negativa estadísticamente significativa. Un comportamiento similar existe entre el porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura y este mineral. También hemos evaluado la asociación entre la PCRus y el hierro, observando de nuevo una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre ambos parámetros (Tabla 13).

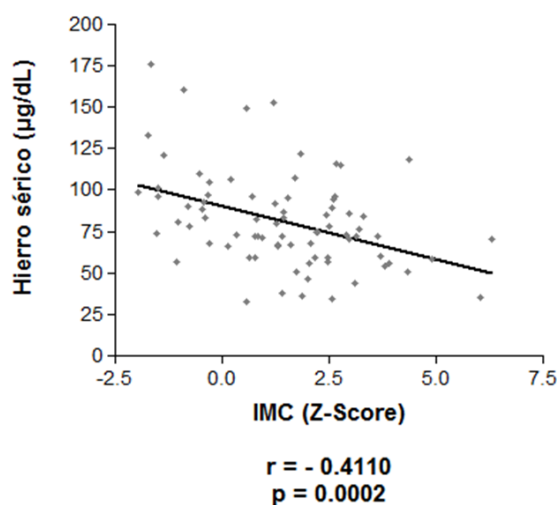


Figura 25. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la concentración plasmática de hierro.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	Hierro ($\mu\text{g/dL}$)	-0,4110	0,0002 ^{***}
Masa grasa (%)		-0,3875	0,0006 ^{***}
P cintura (cm)		-0,3568	0,0038 ^{**}
PCR		-0,4175	0,0002 ^{***}

Tabla 13. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y la concentración plasmática de hierro (variable 2). ^{**} $p < 0.01$ y ^{***} $p < 0.001$. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; PCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad.

4.3.1.4. Parámetros bioquímicos relacionados con la función renal.

Las determinaciones de ácido úrico, creatinina, urea y la proteína específica cistatina C, se realizan de forma estandarizada dentro de la bioquímica sanguínea fundamentalmente como marcadores de la función renal. Las Tablas 14 y 15 expresan los resultados de estos parámetros.

Como podemos observar existe un incremento estadísticamente significativo del ácido úrico en el grupo de niños obesos en comparación con los controles (Figura 26). Cuando se analizan los resultados en función del sexo, se observa que dicho incremento se genera en el grupo de las niñas, no presentando diferencias en el de los niños. Los restantes parámetros no presentan diferencias entre ambos grupos, aunque se puede matizar que en el análisis de los resultados de urea, se observa un incremento en las niñas obesas, con respecto a sus controles, quienes a su vez se encuentran reducidos de forma significativa con respecto a los niños.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
AU (mg/dL)	4,21 \pm 0,17	5,13 \pm 0,18 ^{***}
Cistatina C (mg/L)	0,80 \pm 0,03	0,87 \pm 0,03
Creatinina (mg/dL)	0,63 \pm 0,01	0,65 \pm 0,01
Urea (mg/dL)	28,17 \pm 1,46	28,86 \pm 0,97

Tabla 14. Resultados de la evaluación de parámetros representativos de la función renal en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media \pm EEM. ^{***} $p < 0.001$ respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; AU: ácido úrico.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
AU (mg/dL)	4,20 ± 0,24	4,95 ± 0,33	4,21 ± 0,25	5,29 ± 0,19 ^{**}
Cistatina C (mg/L)	0,82 ± 0,04	0,84 ± 0,03	0,77 ± 0,06	0,88 ± 0,05
Creatinina (mg/dL)	0,64 ± 0,02	0,66 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,65 ± 0,01
Urea (mg/dL)	31,21 ± 1,93	30,00 ± 1,45	22,91 ± 0,89 ⁺⁺	27,93 ± 1,29 [*]

Tabla 15. Resultados de la evaluación de parámetros representativos de la función renal en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. *p < 0.05 y **p < 0.01 respecto de sus controles. ++p < 0.01 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; AU: ácido úrico.

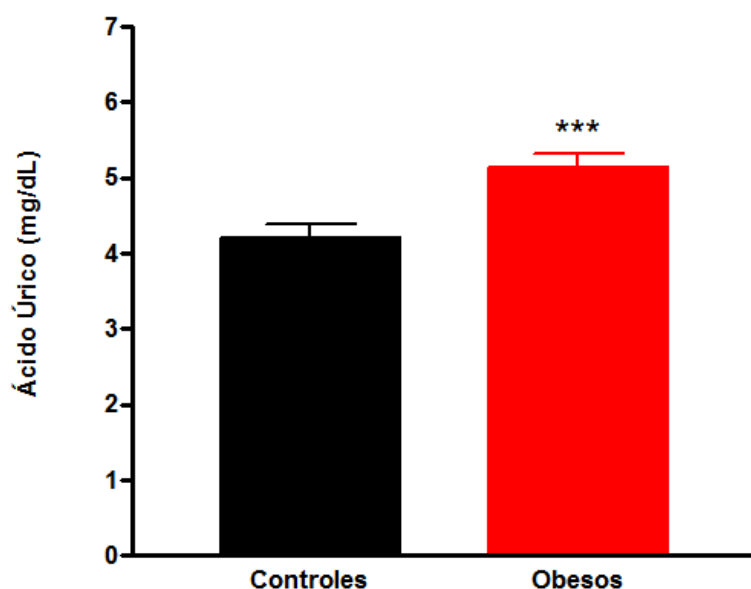


Figura 26. Valores de la concentración plasmática de ácido úrico en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media ± EEM. ***p < 0.001 respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Cuando se evalúa la posible relación entre el IMC y la concentración plasmática de ácido úrico, como podemos observar en la Figura 27, existe una correlación positiva estadísticamente significativa. Un comportamiento similar se da entre el perímetro de la cintura y éste parámetro, mientras que el porcentaje de masa grasa, en este caso, no presenta una correlación

significativa. También hemos evaluado la asociación entre el HOMA y el ácido úrico, observando una correlación positiva, estadísticamente significativa entre ambos parámetros (Tabla 16).

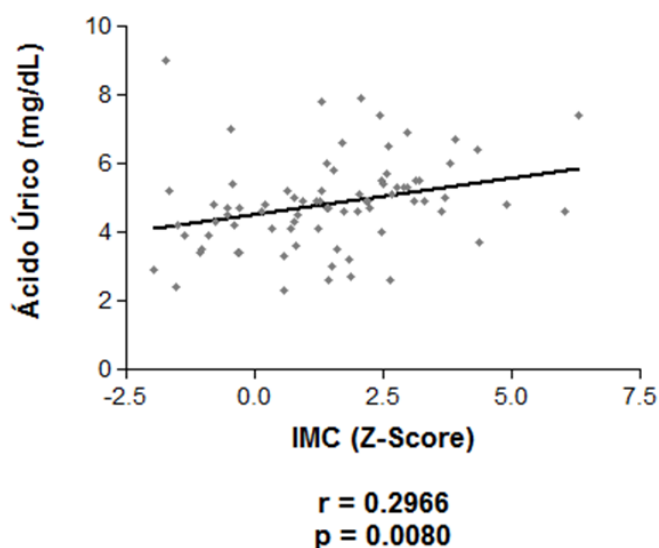


Figura 27. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la concentración plasmática de Ácido úrico.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	AU (mg/dL)	0,2966	0,0080**
Masa grasa (%)		0,2118	0,0681
P cintura (cm)		0,3500	0,0049**
HOMA		0,3369	0,0029**

Tabla 16. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y la concentración plasmática de hierro (variable 2). ** p < 0.01 y *** p < 0.001. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; HOMA: Índice HOMA de insulinoresistencia; AU: ácido úrico.

4.3.1.5. Parámetros bioquímicos relacionados con la función hepática

Las determinaciones de la concentración plasmática de los enzimas GGT, GOT y GPT, se realizan de forma estandarizada dentro de la bioquímica sanguínea, fundamentalmente como marcadores de la función hepática. Las Tablas 17 y 18 muestran los resultados de estos parámetros.

Como podemos observar existe un incremento, estadísticamente significativo, de la GGT en los niños obesos en comparación con los controles (Figura 28). Al evaluar este parámetro en función del sexo se observa una mayor significatividad en el masculino que en el femenino, el cual cuando se realiza una comparación entre sexos muestra unos valores inferiores a los niños, en los pacientes obesos.

La GOT presenta una reducción estadísticamente significativa en el grupo estudio, en comparación con los controles (Figura 28). Al desglosar estos resultados en función del sexo, se observa que la reducción solo es significativa en el grupo de niñas obesas, con respecto a sus controles, y que además presentan una disminución con respecto al grupo de niños obesos. Por el contrario la GPT, no muestra diferencias entre ambos grupos y solo cabe mencionar que el grupo de niñas obesas presenta unos valores inferiores al de los niños obesos.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
GGT (UI/L)	12,77 ± 0,46	16,4 ± 0,60 ^{***}
GOT (UI/L)	25,63 ± 1,59	21,02 ± 0,68 ^{**}
GPT (UI/L)	18,19 ± 1,38	19,98 ± 0,93

Tabla 17. Resultados de la evaluación de parámetros representativos de la función hepática en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. ^{**}p < 0.01 y ^{***}p < 0.001 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; GOT: glutamato oxalacetato transaminasa; GPT: glutamato piruvato transaminasa.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
GGT (UI/L)	13,05 ± 0,56	18,52 ± 1,01 ^{***}	12,33 ± 0,80	14,74 ± 0,57 ^{*,++}
GOT (UI/L)	27,00 ± 1,88	23,52 ± 0,92	23,62 ± 2,79	19,07 ± 0,81 ^{*,+++}
GPT (UI/L)	20,32 ± 1,95	22,86 ± 1,50	15,08 ± 1,53	17,63 ± 0,97 ⁺⁺

Tabla 18. Resultados de la evaluación de parámetros representativos de la función hepática en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 y *** p < 0.001 respecto de sus controles. ++ p < 0.01 y +++ p < 0.001 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; GOT: glutamato oxalacetato transaminasa; GPT: glutamato piruvato transaminasa.

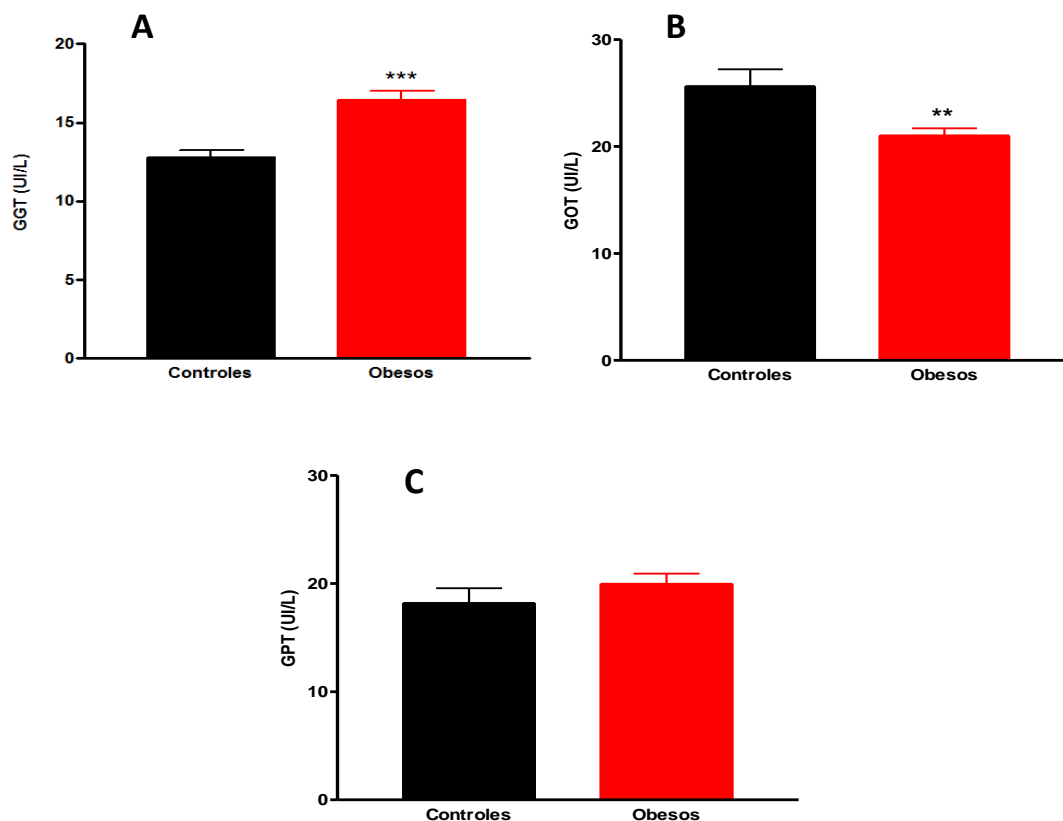


Figura 28. Valores de GGT (A), GOT (B) y GPT (C) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media ± EEM. ** p < 0.01 y *** p < 0.001 respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Cuando se evalúa si puede existir alguna relación entre el z-IMC y estos parámetros (GGT, GOT y GPT) se observa que presenta una correlación estadísticamente significativa con la GGT (Figura 29). Un comportamiento similar presenta el porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura (Tabla 19). Por el contrario no se ha observado correlación significativa con las restantes transaminasas. Por tanto la obesidad se relaciona con un incremento de la GGT, al cual se le ha atribuido un papel como marcador de respuesta inflamatoria.

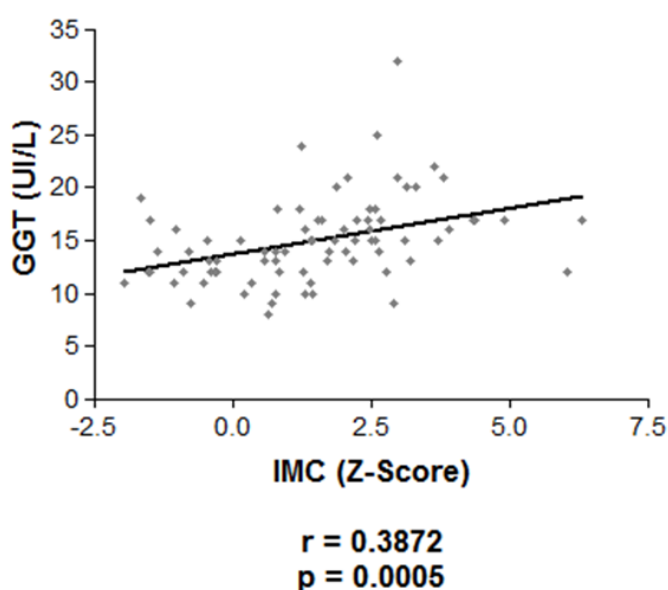


Figura 29. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la concentración plasmática de GGT.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	GGT (UI/L)	0,3872	0,0005 ^{***}
Masa grasa (%)		0,2358	0,0431 [*]
P cintura (cm)		0,4421	0,0003 ^{***}

Tabla 19. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y la concentración plasmática de GGT (variable 2). ^{*} p < 0.05 y ^{***} p < 0.001. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura

4.3.1.6. Otros parámetros bioquímicos

Dentro de las analíticas de los pacientes estudiados en este trabajo se han incluido como parámetros de bioquímica sanguínea la determinación de homocisteína, ácido fólico y tirotropina. Las Tablas 20 y 21 reflejan los resultados obtenidos.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
HC (μmol/L)	7,19 ± 0,28	7,49 ± 0,32
AF (ng/mL)	8,45 ± 0,57	7,41 ± 0,48
TSH (μUI/mL)	1,92 ± 0,17	2,40 ± 0,14*

Tabla 20. Resultados de la evaluación de las concentraciones plasmáticas de Homocisteína (HC), Ácido fólico (AF) y hormona tiroestimulante (TSH) en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n, número de datos.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
HC (μmol/L)	7,35 ± 0,36	7,58 ± 0,31	6,89 ± 0,44	7,42 ± 0,52
AF (ng/mL)	8,59 ± 0,66	8,66 ± 0,84	8,23 ± 1,14	6,43 ± 0,48 ⁺
TSH (μUI/mL)	2,06 ± 0,20	2,56 ± 0,24	1,63 ± 0,23	2,28 ± 0,17*

Tabla 21. Resultados de la evaluación de las concentraciones plasmáticas de Homocisteína (HC), Ácido fólico (AF) y hormona tiroestimulante (TSH) en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 respecto de sus controles. ⁺p < 0.05 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas n: número de datos.

Como podemos observar de todos los parámetros reseñados sólo la TSH presenta un incremento, estadísticamente significativo, en el grupo de obesos en comparación con los controles (Figura 30). Al desglosar los grupos en función del sexo, se observa que este incremento es atribuible al subgrupo de niñas frente a sus controles. Ninguno de los restantes parámetros presenta

diferencias significativas entre ambos grupos. Cabe reseñar que el ácido fólico en las niñas obesas está reducido en comparación con los niños.

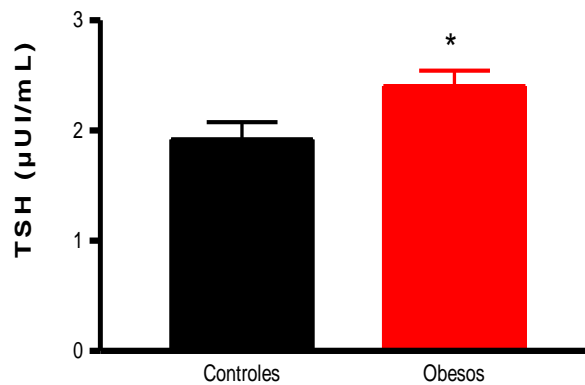


Figura 30. Valores de la concentración plasmática de tirotrópina (TSH) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Cuando se evalúa si puede existir alguna relación entre el z-IMC y la TSH, se observa que hay una correlación positiva, estadísticamente significativa (Figura 31). Es decir ante un incremento del z-IMC se observa un aumento de la concentración plasmática de TSH. Los restantes parámetros antropométricos no presentan ninguna relación con esta hormona.

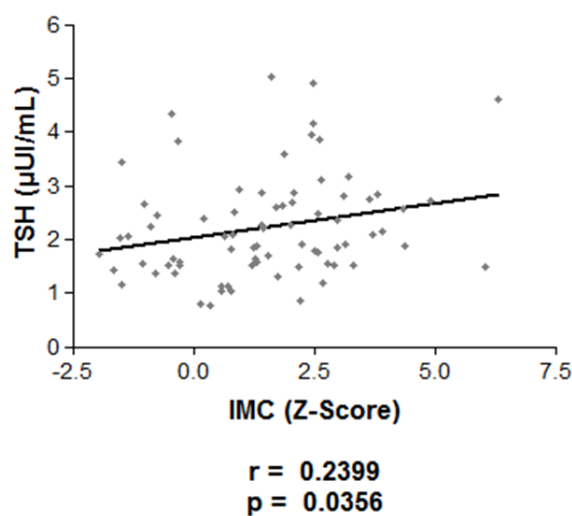


Figura 31. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la concentración plasmática de tirotrópina (TSH).

4.3.2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

A los pacientes incluidos en el estudio se les ha evaluado, dentro de la analítica clínica, los parámetros correspondientes a las 3 series hematológicas (leucocitaria, eritrocítica, y plaquetaria), haciendo especial hincapié en la primera por su relación directa con una respuesta inflamatoria. Los resultados obtenidos quedan reflejados en las Tablas 22 y 23.

	Controles	Obesos
n = 82	33	49
L (n°x10³/mm³)	6,80 ± 0,25	7,81 ± 0,29*
N (n°x10³/mm³)	3,25 ± 0,18	4,19 ± 0,22**
Linf (n°x10³/mm³)	2,59 ± 0,13	2,70 ± 0,12
M (n°x10³/mm³)	0,49 ± 0,03	0,57 ± 0,02*
H (n°x10⁶/mm³)	4,77 ± 0,06	4,85 ± 0,05
Hb (g/dL)	13,45 ± 0,15	13,44 ± 0,14
Hto (%)	40,15 ± 0,46	40,03 ± 0,43
PlaQ (n°x10³/mm³)	269,50 ± 9,25	276,60 ± 9,52

Tabla 22. Resultados de la evaluación de parámetros hematológicos en los grupos controles y obesos. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 y ** p < 0.01 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; L: leucocitos totales; N: neutrófilos; Linf: Linfocitos; M: monocitos; H: hematíes; Hb: hemoglobina; Hto: hematocrito; PlaQ: plaquetas.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 82	19	22	14	27
L (n°x10³/mm³)	7,04 ± 0,30	8,16 ± 0,47	6,41 ± 0,43	7,52 ± 0,36
N (n°x10³/mm³)	3,20 ± 0,18	4,35 ± 0,37*	3,33 ± 0,40	4,05 ± 0,27
Linf (n°x10³/mm³)	2,76 ± 0,18	2,73 ± 0,15	2,30 ± 0,16	2,68 ± 0,18
M (n°x10³/mm³)	0,50 ± 0,03	0,63 ± 0,04*	0,47 ± 0,04	0,52 ± 0,03 ⁺
H (n°x10⁶/mm³)	4,77 ± 0,06	4,86 ± 0,08	4,77 ± 0,12	4,85 ± 0,08
Hb (g/dL)	13,52 ± 0,22	13,50 ± 0,23	13,36 ± 0,16	13,39 ± 0,17
Hto (%)	40,17 ± 0,64	39,97 ± 0,72	40,13 ± 0,64	40,09 ± 0,54
Plaq (n°x10³/mm³)	271,70 ± 8,55	264,00 ± 13,77	266,10 ± 19,82	286,90 ± 13,04

Tabla 23. Resultados de la evaluación de parámetros hematológicos en los grupos controles y obesos tras su desglose en función del género. Los datos están expresados como Media ± EEM. * p < 0.05 respecto de sus controles. ⁺p < 0.05 respecto del otro género dentro de un mismo grupo. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas. n: número de datos; L: leucocitos totales; N: neutrófilos; Linf: Linfocitos; M: monocitos; H: hematíes; Hb: hemoglobina; Hto: hematocrito; Plaq: plaquetas.

Como se puede observar, el grupo de pacientes obesos presenta un incremento estadísticamente significativo, con respecto al control, de los leucocitos totales, neutrófilos y monocitos expresados en valores absolutos (Figura 32). Estas diferencias solo mantienen su significatividad en el caso de los niños, al realizar el estudio en función del género. Los monocitos en las niñas obesas presentan un incremento con respecto a los niños. Los restantes parámetros no presentan diferencias entre ambos grupos.

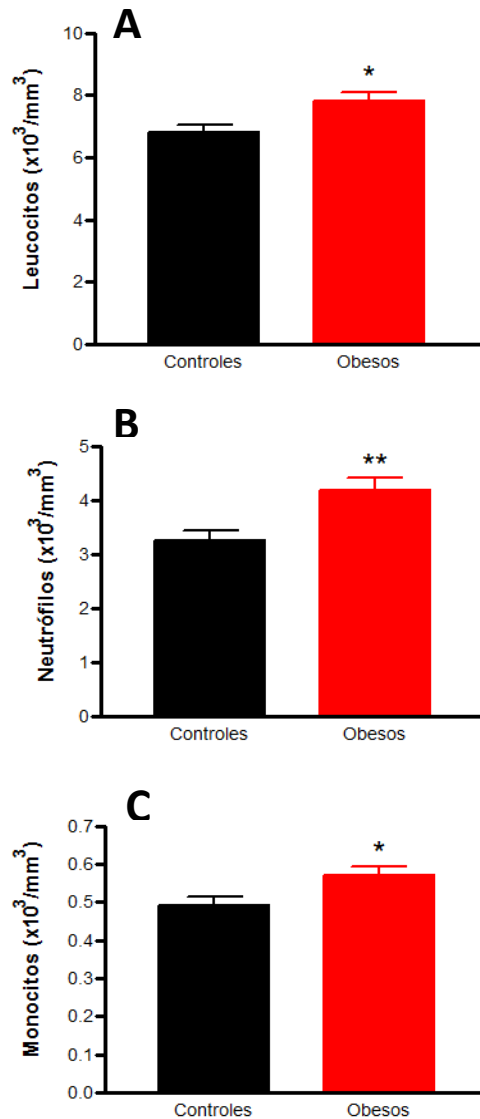


Figura 32. Valores del número absoluto de leucocitos totales (A), neutrófilos (B) y monocitos (C) en los grupos controles (n=33) y obesos (n=49). Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

Hemos evaluado la posible relación entre los parámetros antropométricos IMC (expresado como z-IMC), porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura y los parámetros leucocitarios que presentan diferencias entre obesos y controles mediante un análisis de regresión lineal y la evaluación del coeficiente de correlación de Pearson. La Tabla 24 refleja los resultados obtenidos.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	Leucocitos totales	0,2764	0,0149*
	Neutrófilos	0,3482	0,0019**
	Monocitos	0,2222	0,0521
Masa grasa (%)	Leucocitos totales	0,1949	0,0984
	Neutrófilos	0,2877	0,0136*
	Monocitos	0,1961	0,0963
P cintura (cm)	Leucocitos totales	0,0716	0,5803
	Neutrófilos	0,2736	0,0314*
	Monocitos	0,3219	0,0107*

Tabla 24. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. * p < 0.05 y ** p < 0.01. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura.

Como podemos observar existe una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el z-IMC y el número de leucocitos totales y neutrófilos (Figura 33). El perímetro de la cintura presenta dicha correlación con el número de neutrófilos y monocitos, mientras que el porcentaje de masa grasa solo presenta una correlación significativa con el número de neutrófilos. Ello nos indica que en nuestra muestra, ante el incremento de la masa corporal por la obesidad se produce un aumento del número de leucocitos totales y neutrófilos, lo cual puede suponer un marcador de la existencia de una respuesta inflamatoria incipiente.

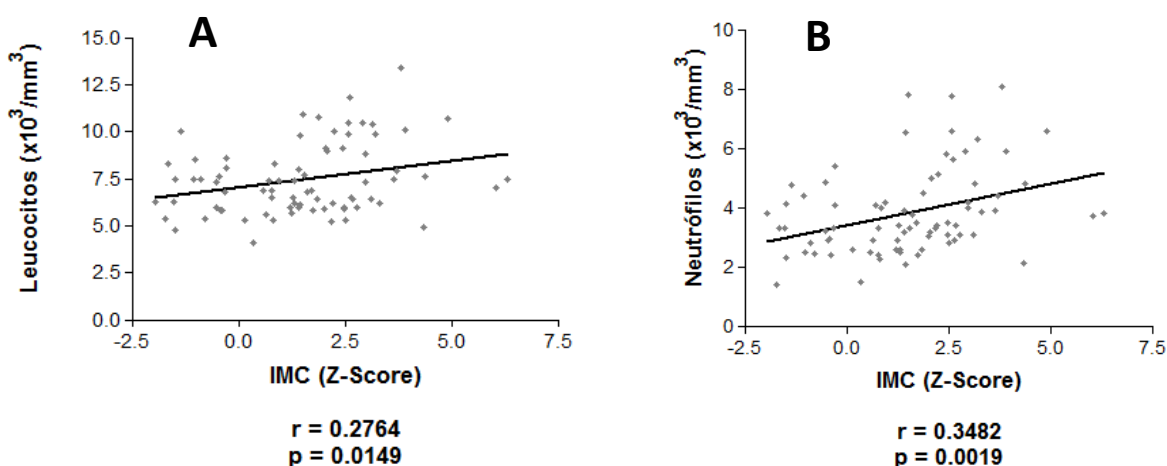


Figura 33. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y el número absoluto de leucocitos totales (A) y neutrófilos (B).

4.4. ESTUDIOS “IN VITRO”

4.4.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

Hemos estudiado en una muestra de población obesa en comparación con otra control, el comportamiento de la interacción leucocito-endotelio, como primer paso en una respuesta inflamatoria que de forma subclínica puede ser la responsable de problemas cardiovasculares de base aterosclerótica. Para ello se ha utilizado el modelo experimental de adhesión dinámica en cámara paralela de flujo (“Flow chamber”) descrito en el apartado de metodología.

4.4.1.1. Estudio con los leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Analizamos con los leucocitos polimorfonucleares (PMN) aislados de las muestras de sangre de los niños obesos y controles, los parámetros representativos de la interacción leucocito-endotelio utilizando el modelo citado. Estos parámetros son la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión leucocitaria, sobre la monocapa de células endoteliales (HUVEC).

La Tabla 25 y Figura 34 reflejan el comportamiento de los PMN en los dos grupos evaluados: obesos y controles. Como podemos observar los niños obesos presentan una reducción, estadísticamente significativa, de la velocidad de rodamiento en comparación con los controles, así como un aumento del rodamiento y de la adhesión de estas células a las HUVEC. Cuando se desglosan estos resultados en función del sexo, se observa que las modificaciones comentadas se generan de forma similar en niños y en niñas (Tabla 26 y Figura 35).

	Controles	Obesos
n = 75	29	46
VR ($\mu\text{m/s}$)	460.4 \pm 25.87	330.0 \pm 15.19 ^{***}
R (células/min)	97.74 \pm 15.06	186.5 \pm 22.01 ^{**}
A (células/mm²)	20.24 \pm 2.497	34.71 \pm 3.507 ^{**}

Tabla 25. Resultados de la velocidad de rodamiento (VR), rodamiento (R) y adhesión (A) de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles y obesos. Los datos están expresados como Media \pm EEM. ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 75	17	21	12	25
VR ($\mu\text{m/s}$)	449.2 \pm 31.24	339.9 \pm 23.44 ^{**}	476.2 \pm 45.49	321.7 \pm 20.14 ^{***}
R (células/min)	103.1 \pm 17.19	171.2 \pm 25.17 [*]	81.79 \pm 27.50	199.3 \pm 34.81 [*]
A (células/mm²)	21.49 \pm 3.422	36.05 \pm 5.756 [*]	18.47 \pm 3.708	33.59 \pm 4.374 [*]

Tabla 26. Resultados de la velocidad de rodamiento (VR), rodamiento (R) y adhesión (A) de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles y obesos tras su desglose en función del sexo. Los datos están expresados como Media \pm EEM. ^{*} p < 0.05, ^{**} p < 0.01 y ^{***} p < 0.001 respecto de sus controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

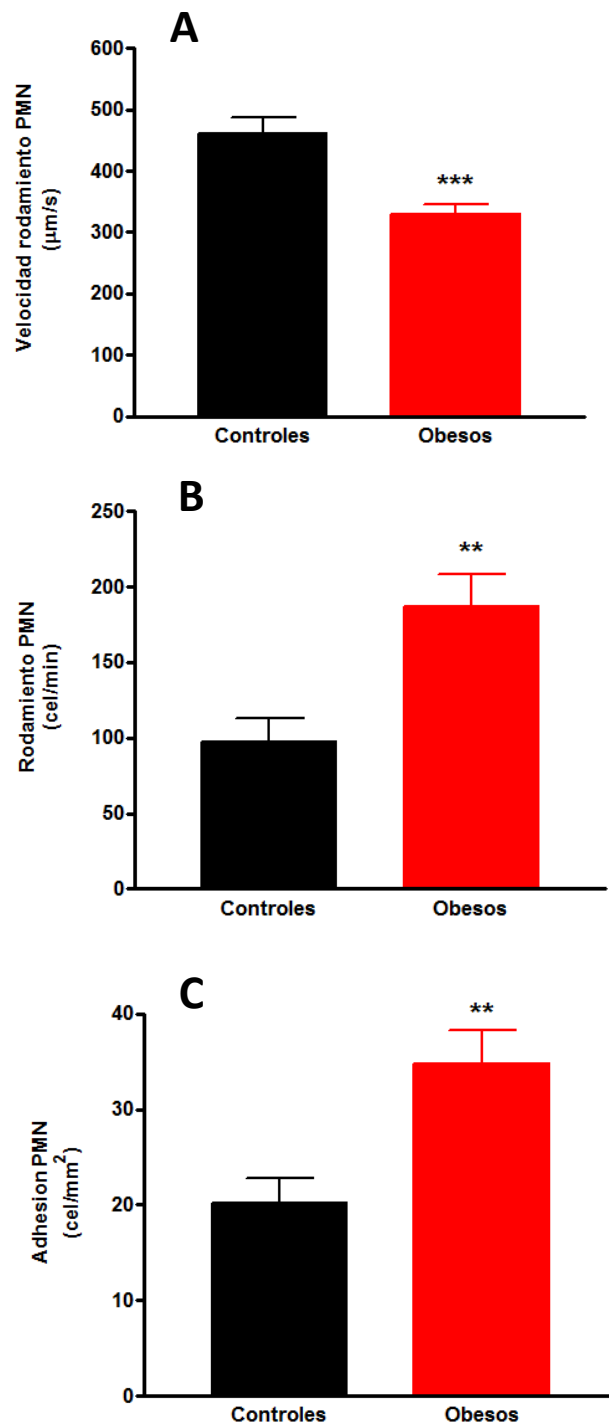


Figura 34. Valores de la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles (n=29) y obesos (n=46). Datos expresados como Media \pm EEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

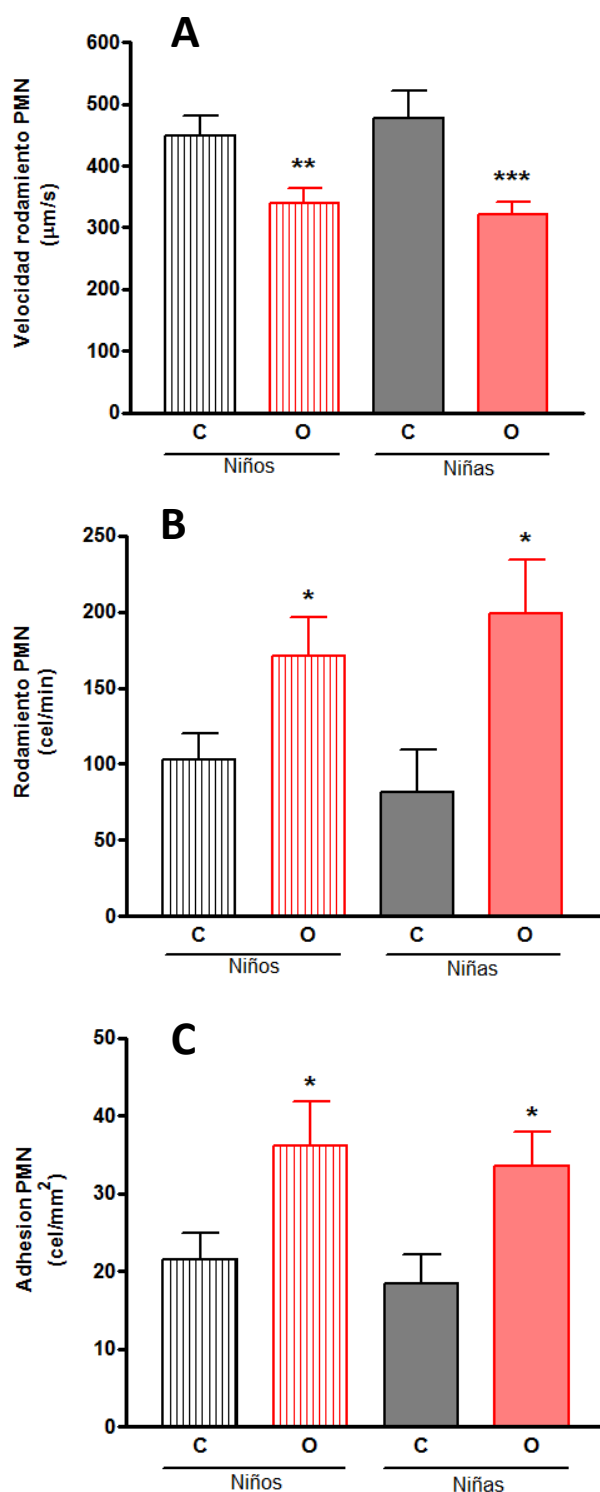


Figura 35. Valores de la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de los PMN sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles (c; niños n=17 / niñas n=12) y obesos (o; niños n=21 / niñas n=25) tras su desglose en función del sexo. Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto de sus controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

4.1.1.1.1. Análisis de la relación entre parámetros antropométricos y analíticos y los de la interacción PMN-endotelio

Hemos analizado la posible relación entre parámetros clínicos y los que nos muestran el comportamiento de los PMN sobre las células endoteliales, en el modelo experimental estudiado, mediante un análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson.

4.1.1.1.1.1. Parámetros antropométricos

La Tabla 27 refleja la relación entre algunos parámetros antropométricos y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN sobre las células HUVEC. Como se observa, el z-IMC muestra una correlación negativa, estadísticamente significativa con la velocidad de rodamiento y positiva con el rodamiento y la adhesión (Figura 36).

Un comportamiento similar (Tabla 26) ha mostrado el porcentaje de masa grasa, mientras que en la relación del perímetro de la cintura solo resulta estadísticamente significativa la correlación negativa con la velocidad de rodamiento y positiva con la adhesión. La presión arterial sistólica solo ha mostrado correlación positiva, estadísticamente significativa, con la adhesión.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	VR	-0,4052	0,0003 ^{***}
	R	0,2689	0,0205 [*]
	A	0,3163	0,0060 ^{**}
Masa grasa (%)	VR	-0,3988	0,0006 ^{***}
	R	0,2988	0,0120 [*]
	A	0,3220	0,0066 ^{**}
P cintura	VR	-0,3696	0,0037 ^{**}
	R	0,2474	0,0567
	A	0,3236	0,0117 [*]
PAS	VR	0,0221	0,8603
	R	0,0635	0,6126
	A	0,3070	0,0122 [*]

Tabla 27. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001
z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; PAS: presión arterial sistólica; VR: velocidad de rodamiento, R: rodamiento; A: adhesión.

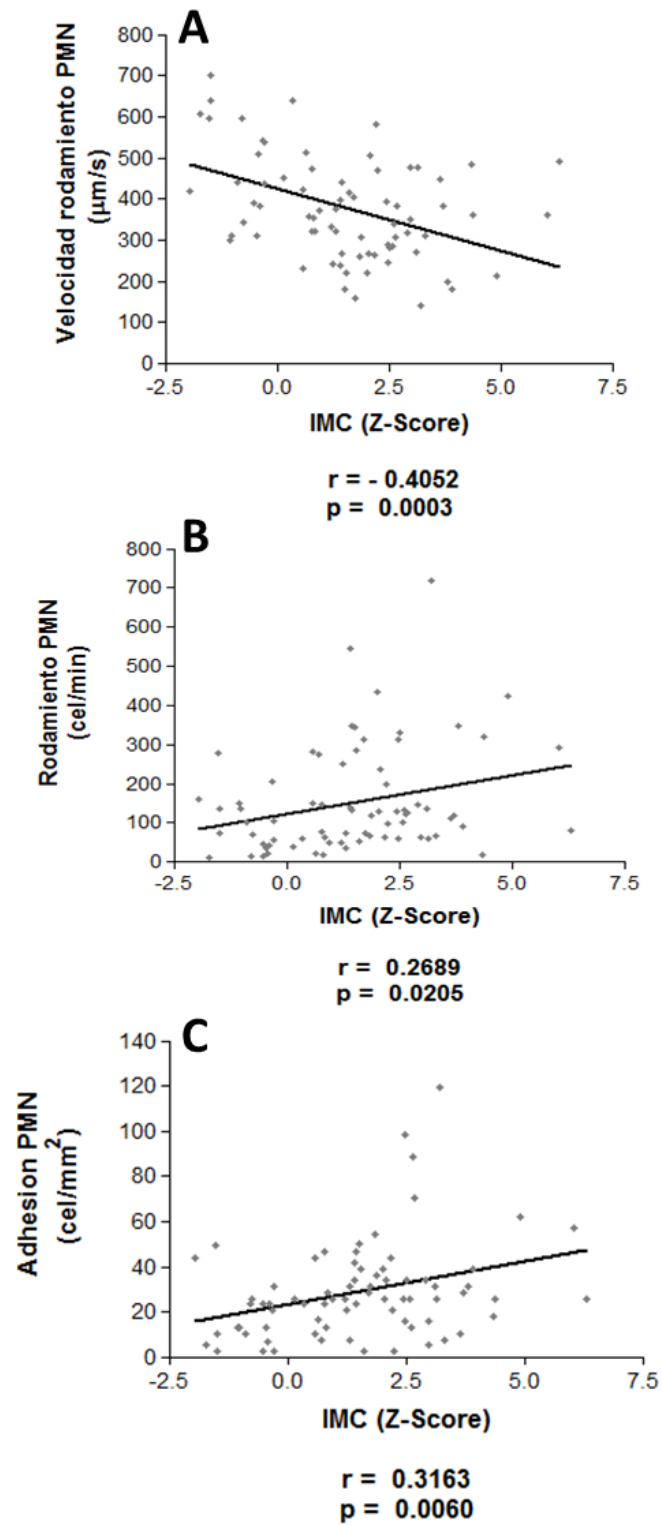


Figura 36. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el z-IMC y la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de las células PMN a las HUVEC.

4.1.1.1.2. Parámetros analíticos

En el mismo sentido, hemos analizado la posible relación entre los parámetros analíticos, sobre todo aquellos que en mayor o menor medida se han sugerido como marcadores de una respuesta inflamatoria relacionada con patologías cardiovasculares, y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PMN sobre las células HUVEC.

La Tabla 28, resume los resultados más significativos obtenidos.

Variable 1	Variable 2	r	p
HOMA	VR	-0,3656	0,0016 ^{**}
	R	0,2452	0,0379 [*]
	A	0,1215	0,3095
Insulina	VR	-0,3728	0,0013 ^{**}
	R	0,2570	0,0293 [*]
	A	0,1338	0,2625
PCR	VR	-0,2191	0,0727
	R	0,2906	0,0162 [*]
	A	0,2717	0,0250 [*]
Hierro	VR	0,2532	0,0307 [*]
	R	-0,1761	0,1362
	A	-0,1402	0,2367
Leucocitos	VR	-0,3096	0,0077 ^{**}
	R	0,3208	0,0057 ^{**}
	A	0,1170	0,3467
Neutrófilos	VR	-0,2424	0,0388 [*]
	R	0,4086	0,0003 ^{***}
	A	0,1937	0,1006

Tabla 28. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001
HOMA: índice de resistencia insulínica; PCR: proteína C reactiva de alta sensibilidad; VR: velocidad de rodamiento, R: rodamiento; A: adhesión.

Como podemos observar existe una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre el índice HOMA y la velocidad de rodamiento, y positiva entre dicho índice y el rodamiento de las células PMN sobre las HUVEC. Un comportamiento similar presentan las concentraciones plasmáticas de insulina.

La PCRus, presenta una correlación positiva, estadísticamente significativa, con el rodamiento y la adhesión, no siendo significativa en este caso la correlación negativa con la velocidad de rodamiento.

El hierro presenta una correlación positiva, estadísticamente significativa con la velocidad de rodamiento y negativa con la adhesión, no siendo significativa la correlación negativa con el rodamiento.

En el caso de las determinaciones leucocitarias, dentro de las hematológicas, observamos que el número absoluto de leucocitos y de neutrófilos presentan una correlación negativa, estadísticamente significativa, con la velocidad de rodamiento y positiva con el rodamiento de las células PMN sobre las HUVEC, mientras que la correlación positiva con la adhesión no es significativa en este caso.

Es decir, que en general en nuestra muestra poblacional el aumento del z-IMC se relaciona no solo con un aumento del número de leucocitos y neutrófilos sino también con su activación, como demuestra la reducción de su velocidad de rodamiento y el aumento del número de dichas células que entran en rodamiento sobre las células endoteliales.

4.4.1.2. Estudio con los leucocitos mononucleares (PBMC)

Siguiendo un procedimiento similar a los PMN, analizamos con los leucocitos mononucleares (PBMC) aislados de las muestras de sangre de los niños obesos y controles, los parámetros representativos de la interacción leucocito-endotelio.

La Tabla 29 y Figura 37 refleja el comportamiento de los PBMC en los dos grupos evaluados: obesos y controles. Como podemos observar los niños obesos presentan una reducción, estadísticamente significativa, de la velocidad de rodamiento en comparación con los controles, así como un aumento del rodamiento y de la adhesión de estas células a las HUVEC. Cuando se desglosan estos resultados en función del sexo, se observa que las modificaciones comentadas se generan de forma similar en niños y en niñas (Tabla 30 y Figura 38).

	Controles	Obesos
n = 69	27	42
VR ($\mu\text{m/s}$)	420.7 \pm 15.26	348.6 \pm 15.96 ^{**}
R (células/min)	72.54 \pm 6.441	113.7 \pm 11.82 [*]
A (células/mm²)	16.45 \pm 1.803	27.81 \pm 2.935 ^{**}

Tabla 29. Resultados de la velocidad de rodamiento (VR), rodamiento (R) y adhesión (A) de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles y obesos. Los datos están expresados como Media \pm EEM. ^{*}p < 0.05 y ^{**}p < 0.01 respecto de los controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

	Niños		Niñas	
	Controles	Obesos	Controles	Obesos
n = 69	17	19	10	23
VR ($\mu\text{m/s}$)	421.4 \pm 18.13	347.9 \pm 28.20 [*]	419.6 \pm 28.69	349.1 \pm 18.16 [*]
R (células/min)	78.29 \pm 8.655	129.2 \pm 22.02 [*]	62.75 \pm 8.959	100.9 \pm 11.46 [*]
A (células/mm²)	17.21 \pm 2.353	29.92 \pm 5.410 [*]	15.02 \pm 2.834	26.06 \pm 3.037 [*]

Tabla 30. Resultados de la velocidad de rodamiento (VR), rodamiento (R) y adhesión (A) de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles y obesos tras su desglose en función del sexo. Los datos están expresados como Media \pm EEM. ^{*}p < 0.05 respecto de sus controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

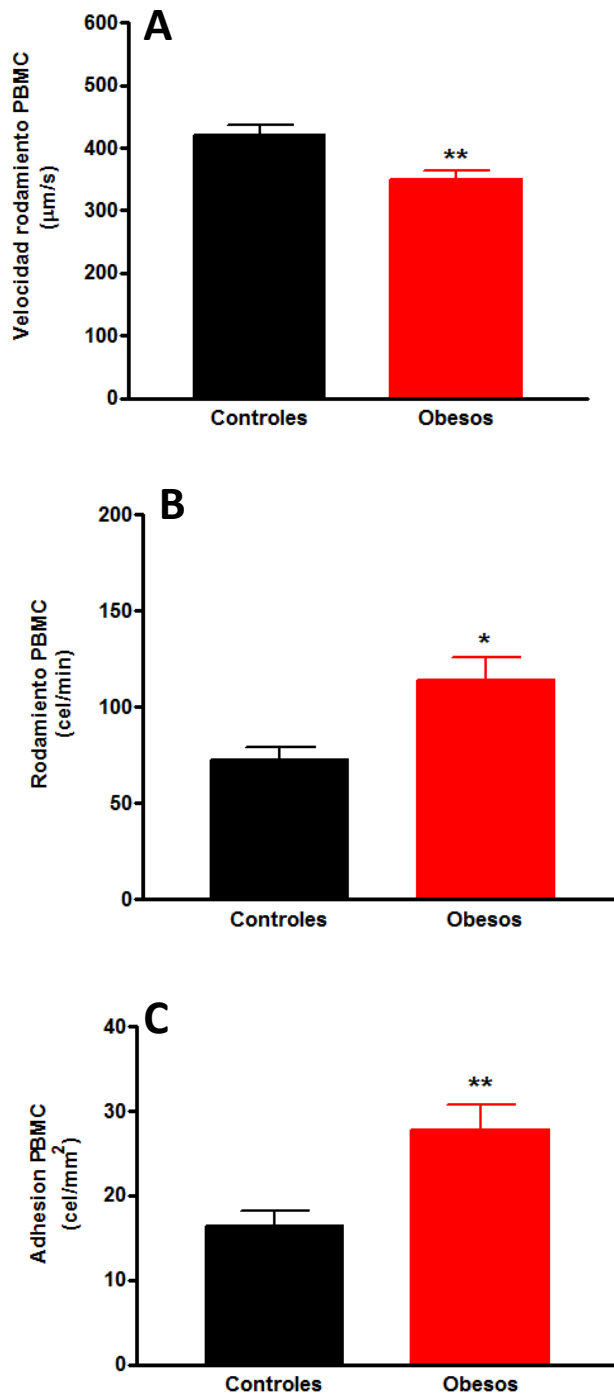


Figura 37. Valores de la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles (n=27) y obesos (n=42). Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto al grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

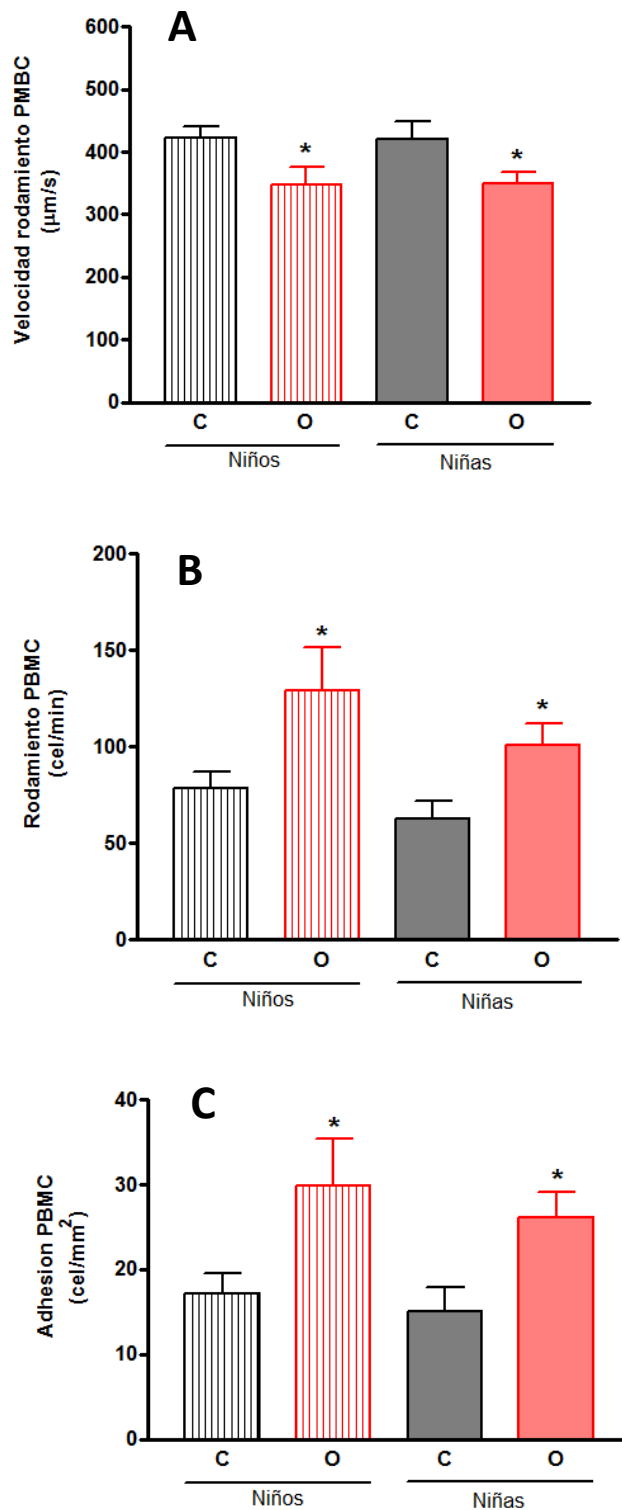


Figura 38. Valores de la velocidad de rodamiento (A), rodamiento (B) y adhesión (C) de los PBMC sobre las células HUVEC en los grupos de pacientes controles (c; niños n=17 / niñas n=10) y obesos (o; niños n=19 / niñas n=23) tras su desglose en función del sexo. Datos expresados como Media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto de sus controles. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

4.1.1.2.1. Análisis de la relación entre parámetros antropométricos y analíticos y los de la interacción PBMC-endotelio

Siguiendo un procedimiento similar a los PMN, analizamos con los leucocitos mononucleares (PBMC) la posible relación entre parámetros clínicos y los que nos muestran el comportamiento de los PBMC sobre las células endoteliales, en el modelo experimental estudiado, mediante un análisis de regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson.

4.1.1.2.1.1. Parámetros antropométricos

La Tabla 31 refleja la relación entre algunos parámetros antropométricos y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC sobre las células HUVEC. Como se observa, el z-IMC muestra una correlación negativa, estadísticamente significativa con la velocidad de rodamiento y positiva con la adhesión, mientras que la correlación con el rodamiento no es significativa.

Un comportamiento similar (Tabla 31) ha mostrado el porcentaje de masa grasa, siendo significativa, en este caso, tanto la correlación negativa con la velocidad de rodamiento como la positiva con el rodamiento y la adhesión (Figura 39). En relación al perímetro de la cintura, solo resulta estadísticamente significativa la correlación positiva con el rodamiento, mientras que la negativa con la velocidad de rodamiento y positiva con la adhesión, no resultan significativas.

Variable 1	Variable 2	r	p
z-IMC	VR	-0,2810	0,0203*
	R	0,1361	0,2684
	A	0,3200	0,0083**
Masa grasa (%)	VR	-0,2788	0,0234*
	R	0,2466	0,0460*
	A	0,3197	0,0094**
P cintura	VR	-0,1535	0,2587
	R	0,2941	0,0278*
	A	0,2590	0,0539

Tabla 31. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el parámetro indicado como variable 1 y cada uno de los indicados como variable 2. * p < 0.05 y ** p < 0.01. z-IMC: Índice de masa corporal expresado como z-Score; P cintura: perímetro de la cintura; VR: velocidad de rodamiento, R: rodamiento; A: adhesión.

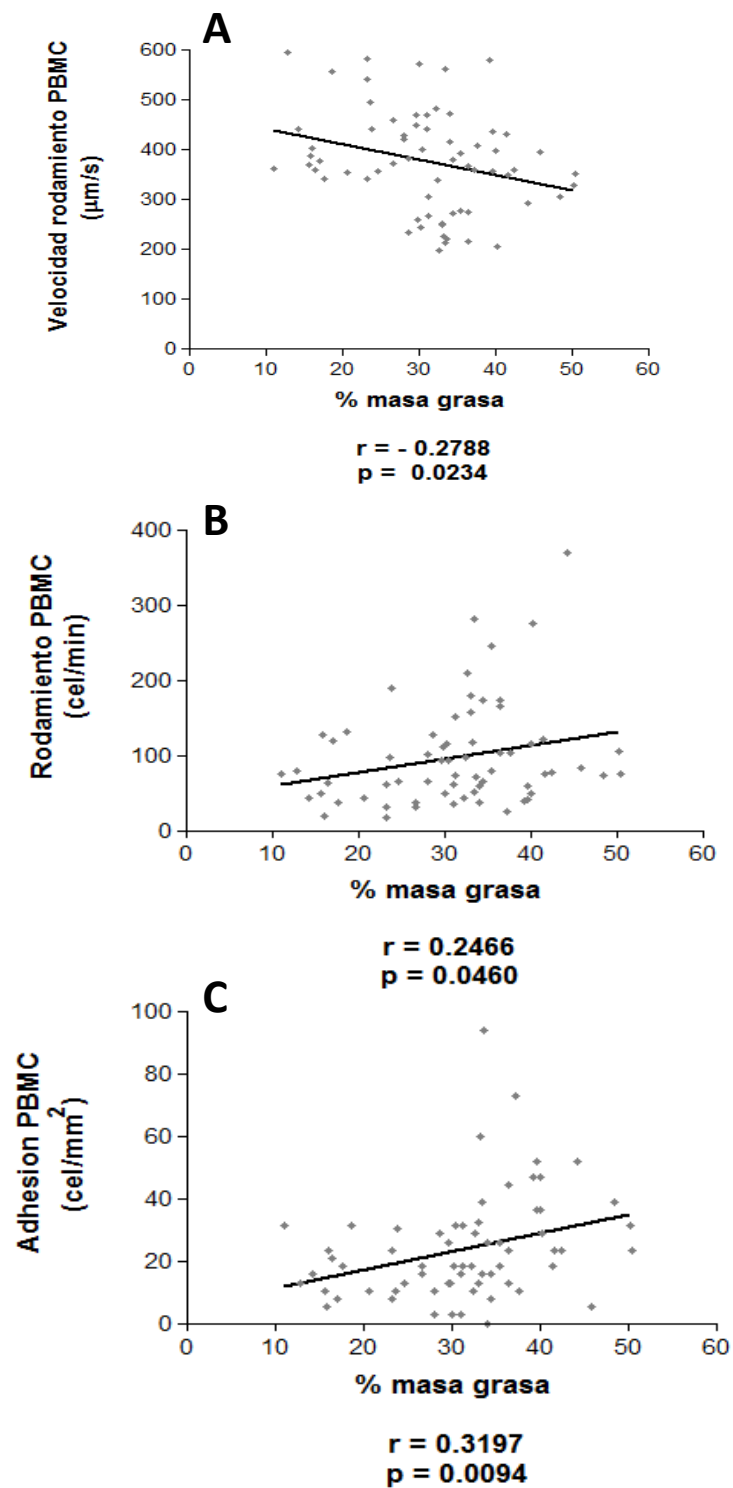


Figura 39. Análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación (r) de Pearson entre el porcentaje (%) de masa grasa y la velocidad de rodamiento (A), el rodamiento (B) y la adhesión (C) de las células PBMC a las HUVEC.

4.1.1.2.1.2. Parámetros analíticos

En el mismo sentido, hemos analizado la posible relación entre los parámetros analíticos, sobre todo aquellos que en mayor o menor medida se han sugerido como marcadores de una respuesta inflamatoria relacionada con patologías cardiovasculares, y la velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión de los PBMC sobre las células HUVEC.

Solo se ha observado alguna significatividad con la PCRus, cuyos resultados se resumen en la Tabla 32.

Variable 1	Variable 2	r	p
PCR	VR	-0,1634	0,1970
	R	0,3432	0,0055**
	A	0,3029	0,0158*

Tabla 32. Coeficiente de correlación (r) de Pearson entre la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR) y cada uno de los parámetros indicados como variable 2. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. VR: velocidad de rodamiento, R: rodamiento; A: adhesión.

Como se muestra la PCRus presenta una correlación positiva, estadísticamente significativa con el rodamiento y la adhesión de las células PBMC a las endoteliales. La correlación negativa que muestra con la velocidad de rodamiento no es significativa.

4.4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Hemos estudiado “in vitro”, mediante citometría de flujo, de acuerdo a lo descrito en el apartado de metodología, la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias, en una muestra de población obesa en comparación con controles.

Las moléculas de adhesión evaluadas fueron LFA-1 (con el anticuerpo CD11a), Mac-1 (CD11b), gp 150.95 (CD11c) que son moléculas de adhesión tipo integrinas β_2 , formadas por una subunidad específica α (a la que se unen dichos anticuerpos) y una subunidad común β de este tipo de integrinas β_2 , evaluada con el anticuerpo CD18; VLA-4, que es una integrina $\alpha_4\beta_1$ (con el anticuerpo CD49d) y L-selectina, que pertenece a la familia de las selectinas y se expresa en los leucocitos (con el anticuerpo CD62L).

En conjunto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes obesos y el grupo control en ninguna de las moléculas de adhesión evaluadas en las 3 poblaciones leucocitarias estudiadas: neutrófilos, monocitos y linfocitos (Tabla 33). Solo cabe reseñar un incremento, estadísticamente significativo, del CD11a, en la población linfocitaria del grupo de obesos, respecto de los controles y una reducción, que no llega a ser significativa, del CD62L, fundamentalmente en los neutrófilos del grupo de obesos, respecto de los controles.

	Neutrófilos	
	Controles	Obesos
n = 43	19	24
CD11a	100,00 ± 2,62	96,75 ± 3,59
CD11b	100,00 ± 8,51	97,44 ± 8,70
CD11c	100,00 ± 8,63	96,55 ± 7,20
CD18	100,00 ± 4,32	91,56 ± 6,01
CD49d	100,00 ± 4,65	89,17 ± 6,34
CD62L	100,00 ± 5,14	87,47 ± 5,24
	Monocitos	
	Controles	Obesos
n = 43	19	24
CD11a	100,00 ± 5,14	87,72 ± 5,24
CD11b	100,00 ± 10,94	83,69 ± 8,98
CD11c	100,00 ± 10,73	79,99 ± 7,67
CD18	100,00 ± 6,79	86,11 ± 7,99
CD49d	100,00 ± 4,35	88,49 ± 4,52
CD62L	100,00 ± 8,47	94,91 ± 8,32
	Linfocitos	
	Controles	Obesos
n = 43	19	24
CD11a	100,00 ± 17,53	149,40 ± 16,80*
CD11b	100,00 ± 5,94	103,80 ± 8,59
CD11c	100,00 ± 7,58	99,29 ± 5,91
CD18	100,00 ± 14,94	109,80 ± 13,33
CD49d	100,00 ± 10,35	102,40 ± 7,85
CD62L	100,00 ± 20,15	101,00 ± 15,46

Tabla 33. Expresión de las moléculas de adhesión estudiadas en las 3 poblaciones leucocitarias evaluadas. Los valores expresan el % de la mediana de la intensidad de la fluorescencia respecto del grupo control. Los resultados se expresan como Media ± EEM. *p < 0.05 respecto del grupo control. Analizado mediante el test t-Student para muestras no pareadas.

4.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La obesidad constituye en la actualidad un serio problema de salud pública, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo (2, 146-147). En la población pediátrica la incidencia de esta patología ha alcanzado unos niveles preocupantes en las últimas décadas, con la repercusión que ello puede tener a largo plazo como factor etiológico de múltiples enfermedades en el adulto, si tenemos en cuenta la larga esperanza de vida de este grupo de población (148). Estudios epidemiológicos han descrito una estrecha asociación entre obesidad infantil y mortalidad en adultos por causas cardiovasculares (149).

La obesidad infantil se asocia con un amplio abanico de problemas durante esta fase de la vida y con posterioridad en el adulto (150). Este proceso en edades tempranas de la vida conlleva una serie de alteraciones metabólicas que suponen un factor de riesgo para el desarrollo precoz de enfermedades cardiovasculares de base aterosclerótica. Frecuentemente la obesidad se va a acompañar de trastornos del metabolismo lipídico, con la aparición de dislipemias, y del metabolismo hidrocarbonado, con un aumento progresivo de la resistencia a insulina y una hiperinsulinemia compensadora que acaben induciendo finalmente una DM tipo 2.

Estas alteraciones metabólicas, en especial la resistencia insulínica, actuando a nivel vascular sobre las células endoteliales, van a inducir una estimulación del estrés oxidativo y del retículo endoplásmico, modificando sus propiedades fisiológicas y generando una disfunción endotelial que activa una respuesta inflamatoria crónica de baja intensidad y subclínica, que puede ser la base de un proceso aterosclerótico (132, 151).

En consecuencia, la propia obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas suponen una agresión que induce una respuesta inflamatoria, tanto local como sistémica. Ésta se inicia con la activación de las células endoteliales, lo cual va a tener un efecto sobre otras células como son los leucocitos circulantes. Ambos tipos celulares van a expresar en su superficie una serie de moléculas de adhesión que van a permitir la interacción entre los leucocitos que circulan por la luz vascular y las células endoteliales que tapizan dicha luz, lo que constituye el proceso denominado interacción leucocito-endotelio, base de la respuesta inflamatoria y primer paso en la formación de la placa de ateroma (152-153).

En niños y adolescentes con exceso de peso se ha descrito la presencia de diversas anomalías vasculares funcionales y morfológicas de base aterosclerótica (20-22, 154) que se han relacionado con la disfunción y activación endotelial y la respuesta inflamatoria asociada, en base a la determinación de biomarcadores sanguíneos de cada uno de estos procesos como son, entre otros, determinadas moléculas de adhesión solubles (sICAM-1, sVCAM-1 y sSelectinas) y la PCRus (126-127, 155-156). Sin embargo, no hay estudios en la edad pediátrica que hayan evaluado directamente el estado de la interacción leucocito-endotelio en los niños obesos, en comparación con niños control.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar, en un modelo experimental “in vitro”, las alteraciones en la interacción leucocito-endotelio en muestras de sangre de niños con sobrepeso u obesidad, en comparación con controles, y evaluar su posible relación con diversos parámetros antropométricos y analíticos, especialmente aquellos que se han asociado con alteraciones cardiometabólicas y de respuesta inflamatoria.

4.5.1. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y CLÍNICOS

El presente trabajo se ha realizado sobre una población pediátrica con una distribución homogénea de los grupos en relación a la edad, observándose diferencias en cuanto al desarrollo puberal, siendo éste (dentro de un mismo grupo de edad) más precoz en el grupo de obesos que en los controles y en las niñas que en los niños (en ambos grupos). Este dato está de acuerdo con descripciones previas que relacionan la obesidad con un adelanto en el desarrollo puberal tanto en niños como en niñas, pero fundamentalmente en estas últimas (157-162).

En la población pediátrica, al igual que en el adulto, existe una buena correlación entre el IMC (estandarizado en el caso de los niños por z-Score), el porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura, pudiendo utilizarse estos parámetros (163) o diversas transformaciones matemáticas más complejas que los relacionan entre sí o con otras variables, como el perímetro de cadera y la altura (164), como expresión del grado de obesidad en general. Sin embargo, se considera que la obesidad visceral, indicada por el porcentaje de masa grasa y, principalmente, por el perímetro de la cintura, es la que mejor se relaciona con la aparición de muchas de las complicaciones

sistémicas asociadas a esta patología, como la resistencia a la insulina y la respuesta inflamatoria subclínica a nivel vascular (36-38, 165).

En nuestro estudio el IMC (expresado como z-Score) presenta una correlación positiva con el porcentaje de masa grasa y ambos parámetros con el perímetro de la cintura, lo que nos demuestra que en la muestra poblacional evaluada el incremento de peso es debido a un aumento de la adiposidad (principalmente central) y no a un incremento de la masa magra, y que cualquiera de los 3 parámetros nos sirve como indicador para evaluar la situación de obesidad.

En la edad pediátrica la obesidad se ha relacionado con un incremento de la presión arterial (155). En esta línea, en nuestro trabajo hemos observado un incremento de la presión arterial tanto sistólica como diastólica, pero fundamentalmente de la primera, en el grupo de obesos frente a los controles, presentando una correlación positiva con el grado de obesidad. Sin embargo, hay que resaltar que estos valores se han mantenido en casi todos los casos dentro de los límites considerados de normalidad.

El interés de este aspecto radica en la importancia que se está dando a la obesidad y la HTA en los niños y adolescentes como factores etiológicos precoces en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en el adulto, incluyendo a estos parámetros dentro de los factores de riesgo cardiometabólico (166). Se ha descrito que la obesidad durante la infancia aumenta el riesgo de obesidad a medio y largo plazo y el riesgo de complicaciones cardiovasculares y muerte en adultos relativamente jóvenes (167-168). Diversos estudios epidemiológicos han subrayado un incremento en la prevalencia y/o el riesgo de HTA en niños obesos en comparación con niños controles (169-172), siendo más acentuado en caso de obesidad severa, lo que se asocia a un alto riesgo para la salud (173).

Cuando se evalúa la posible relación entre la presión arterial y el grado de severidad de la obesidad en niños, adolescentes y adultos jóvenes, se observa que, en comparación con los pacientes con normopeso, el incremento en el IMC se relaciona con un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica, principalmente de la primera, y con un mayor riesgo de HTA, especialmente en pacientes con obesidad grave (174-175). El seguimiento longitudinal de estos parámetros, a lo largo de un periodo de tiempo, ha demostrado que los cambios en el IMC que se van produciendo se

correlacionan con modificaciones en el mismo sentido de la presión arterial, de tal manera que en aquellos pacientes en los que se incrementa su IMC, también se aumenta la presión arterial, mientras que, por el contrario, en los niños en los que se reduce su IMC, también disminuye la presión arterial (175).

En esta Tesis Doctoral también se ha evaluado, en una muestra poblacional que prácticamente abarca toda la edad pediátrica a partir de los 6 años, el metabolismo hidrocarbonado y el perfil lipídico. En el primer caso, observamos una elevación de los niveles séricos de insulina y de los valores de insulinoresistencia (evaluados mediante el índice HOMA) en los niños y niñas con exceso de peso en comparación con los controles, y una correlación positiva (estadísticamente significativa) del IMC, porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura con la concentración plasmática de insulina y con el índice HOMA. Estos hallazgos siguen la misma línea que los descritos previamente en anteriores estudios y revisiones (50, 176). Cabe resaltar que los valores de glucemia sérica no presentaron diferencias entre ambos grupos y que en ninguno de los casos superaron los valores considerados dentro de la normalidad para la edad pediátrica.

En la alteración del metabolismo hidrocarbonado asociada a la obesidad se ha descrito que el paso desde la tolerancia normal a la glucosa a la intolerancia a la misma y, finalmente, a la DM tipo 2 está íntimamente relacionado con el aumento del IMC, siendo esta situación potencialmente reversible si se produce una reducción del peso del paciente a tiempo (177).

Cuando se analiza la sensibilidad a la insulina en adolescentes, siempre se debe tener en cuenta que durante el desarrollo normal de la pubertad se produce un aumento fisiológico y transitorio de la resistencia a la insulina (al final de la pubertad, en adolescentes sanos, los niveles vuelven a valores cercanos a la época prepuberal); efecto que es más marcado en niñas que en niños (24, 26-27). Este fenómeno es el que justifica que en nuestros resultados, tanto en el grupo control como en el grupo obesos, las niñas presenten mayor índice HOMA que los niños.

En relación al perfil lipídico, al comparar el grupo de sobrepeso/obesidad con el grupo control, hemos obtenido un incremento de los valores plasmáticos de triglicéridos y de VLDL-colesterol y una disminución del HDL-colesterol; así como una correlación positiva del IMC,

porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura con los dos primeros parámetros bioquímicos y negativa con el tercero. Estos resultados son compatibles con aportaciones previas en las que se ha evaluado la relación entre el IMC y varios factores considerados de riesgo cardiometabólico en muestras poblacionales de niños, adolescentes y adultos jóvenes (3-19 años de edad); y en las que se concluye que la obesidad se asocia a una elevada prevalencia de dislipemia (50, 155, 174, 178). Las únicas discrepancias encontradas en algunos de estos estudios respecto a nuestros resultados radican en los valores alterados (aunque de forma discreta) de colesterol total, LDL-colesterol y glucemia en los pacientes obesos con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, ya que en nuestro trabajo éstas no se aprecian.

Por el contrario, otro trabajo que ha estudiado los posibles cambios en el metabolismo hidrocarbonado y perfil lipídico inducidos por la obesidad en adultos y adolescentes, muestra que en los primeros frecuentemente existe una situación de incremento de la insulina plasmática (e incluso insulinoresistencia) y dislipemia; mientras que en adolescentes, aunque hay diferencias en los parámetros metabólicos determinados (colesterol total, triglicéridos, glucosa, insulina e índice HOMA) entre obesos y normopeso, éstas no son estadísticamente significativas. Estas diferencias probablemente puedan atribuirse al pequeño tamaño muestral del estudio y a las diferencias de la población estudiada, pues en este caso se restringe a adolescentes con un abanico de edades estrecho (179).

La resistencia a la insulina se encuentra en el eje central del desarrollo de las complicaciones cardiometabólicas asociadas a la obesidad (24, 50, 176). De hecho, se ha observado que las diferencias en el grado de insulinoresistencia son la base de las diferencias existentes entre niños obesos con un IMC similar en cuanto al riesgo de complicaciones se refiere (180).

En nuestro estudio, la presencia de resistencia a la insulina se ha correlacionado negativamente con los valores de HDL-colesterol y positivamente con los de triglicéridos y VLDL-colesterol; hallazgos que están de acuerdo con los mostrados en estudios previos (24-25, 28, 50). Por ello se ha descrito que la dislipemia característica del síndrome metabólico y del perfil aterogénico en la edad pediátrica se basa en un aumento de los triglicéridos y una disminución del HDL-colesterol. En un estudio reciente,

Marcovecchio et al. (181) determinaron que pacientes pediátricos obesos con tolerancia a la glucosa normal pero en el límite alto ya presentaban alteración en la sensibilidad a la insulina y un perfil cardiometabólico perjudicial (con disminución de HDL-colesterol y aumento de triglicéridos).

Aunque las VLDL-colesterol no aparezcan inicialmente dentro del perfil aterogénico en muchos estudios, el resultado obtenido en nuestro trabajo en cuanto a estas moléculas también se justifica por la presencia de resistencia a la insulina. Hay que tener en cuenta que las VLDL-colesterol son lipoproteínas que principalmente se encargan de transportar triglicéridos. La insulina, como ya se ha dicho previamente, es una hormona con una actividad anti-lipolítica (tanto en el hígado como en el tejido adiposo), por lo que inhibe la secreción hepática de partículas ensambladas VLDL-triglicéridos, y es activadora de la lipoprotein-lipasa, encargada de liberar los triglicéridos de las VLDL circulantes para ser introducidos y reesterificados en la célula (50, 182). Ante una situación de insulinoresistencia, estos efectos se pierden y ello lleva al aumento de estas moléculas en sangre.

Todos estos resultados en conjunto, se corresponden con un incremento del riesgo de desarrollo de DM tipo 2 y de aterosclerosis temprana.

Hoy en día está suficientemente probado que la obesidad infantil genera una respuesta inflamatoria crónica subclínica a nivel vascular, que supone un incremento de diversas moléculas proinflamatorias en sangre. Entre ellas destaca la PCRus, considerada un biomarcador importante de este tipo de respuesta a nivel sistémico, que se determina de forma rutinaria dentro de los parámetros analíticos en el seguimiento de los pacientes obesos (155, 165, 183-185).

Se ha observado que los niños con sobrepeso/obesos tienen más elevadas las concentraciones séricas de esta proteína que los niños con normopeso y que el IMC, o de forma más ajustada el porcentaje de masa grasa o el perímetro de la cintura (165), se correlaciona positivamente con la misma, lo cual indica que a mayor grado de obesidad la exposición a la inflamación sistémica es mayor. Esta respuesta inflamatoria asociada a una situación de obesidad se llega a generar en edades muy tempranas de la vida, puesto que algunos de estos estudios, que se han realizado en poblaciones pediátricas con edades entre 1 y 17 años, han observado que la relación comienza a ser significativa a partir de los 3 años (184-185). La repercusión

de este último dato es importante porque indicaría que un IMC elevado en la infancia induciría una inflamación a largo plazo que podría generar una lesión vascular acumulativa y un incremento significativo del riesgo de patologías coronarias a lo largo de la vida (183). Hay que mencionar que en el estudio comparativo entre adolescentes y adultos obesos comentado con anterioridad (179), también se obtuvo un incremento de la PCRus en ambas poblaciones (junto con otros indicadores de una respuesta inflamatoria de baja intensidad), frente a pacientes controles; sin embargo, mientras en los adultos dicha respuesta se observó unida a cambios metabólicos (fundamentalmente resistencia a insulina y dislipemia), en los adolescentes no se presentó esa asociación.

Un mecanismo que podría explicar esta relación entre obesidad y aumento de la PCRus se centra en los adipocitos como células con actividad metabólica que producen citocinas y activan macrófagos (82-84). Entre las primeras destacan el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) y las interleucinas IL-6 e IL-1, que actúan a nivel del hepatocito induciendo una amplia gama de factores implicados en la fase aguda de la respuesta inflamatoria, entre los que se puede resaltar la PCRus. Cabe destacar que se considera que este proceso es reversible puesto que se ha observado que ante una reducción del peso se produce una disminución de la PCRus y de TNF- α (79-81). Estas afirmaciones dan un papel central al tejido adiposo en la génesis de las señales proinflamatorias, entre ellas el incremento de la PCRus (186).

Estas aportaciones estarían de acuerdo con nuestros resultados, en los que observamos un incremento de la PCRus en los niños con exceso de peso, en comparación con los controles, y una relación directa entre el incremento del IMC, porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura con el aumento de los niveles de PCRus.

La RBP4 es una adipocina, perteneciente a la familia de reactantes de fase aguda, que se produce principalmente a nivel del hígado, pero que también se expresa en otros tipos celulares como los adipocitos (52, 187). Se ha descrito en adultos obesos un incremento de esta proteína y, aunque no se ha podido establecer claramente una correlación entre IMC y esta molécula, se ha propuesto como factor que podría contribuir a las alteraciones cardiometabólicas (188-189).

Ahora bien, profundizando en el estudio de esta proteína, todavía no está claro el papel de la RBP4 en la fisiopatología de la obesidad y sus complicaciones. Por un lado, se ha sugerido que la RBP4 estaría relacionada con la presencia de insulinoresistencia en modelos animales, describiéndose que esta proteína estimula la síntesis de glucosa por el hígado y dificulta la señalización de la insulina en el músculo (190). En una revisión de 2015, Park et al. (191) refieren que en diversos trabajos se ha descrito la RBP4 como un biomarcador relacionado con el grado de insulinoresistencia, DM tipo 2 y síndrome metabólico. Pero, por otro lado, en esta misma revisión (191) también señalan varios estudios en los que esta asociación es inconsistente, lo que podría deberse a la influencia de diversos factores de confusión. En este sentido, Janke et al. (2006) (192) señalan en su estudio las diferencias entre los hallazgos en roedores descritos previamente y los obtenidos en humanos en la regulación de la RBP4, tanto a nivel de expresión en el adipocito como de la proteína circulante, y cuestionan la relación entre RBP4 y alteración hidrocarbonada en la obesidad, pero hay que tener en cuenta que dicho estudio fue realizado en una muestra de 30 mujeres menopáusicas.

Doumatey et al. (2016) (187) también observaron un aumento de sus niveles en obesos clasificados como metabólicamente sanos (no presentan criterios de síndrome metabólico), en contraposición a los metabólicamente anómalos (que sí presentan características de síndrome metabólico), llegándose a sugerir un perfil inflamatorio favorable en la obesidad metabólicamente sana (aunque en este estudio el tamaño muestral fue pequeño y no se tuvieron en cuenta diversos factores de confusión que podrían haber afectado a los niveles séricos de las proteínas analizadas).

Aunque en adultos la evidencia de la asociación entre aumento de RBP4 y obesidad y sus complicaciones no está clara, en niños y adolescentes se ha observado de forma más consistente (incluso con el desarrollo de resistencia a la insulina) (193-194); de manera que en la edad pediátrica parece ser que esta proteína sí que tiene un papel importante en la obesidad y el desarrollo de componentes del síndrome metabólico, sobre todo en fases tempranas (195). Recientemente se ha descrito un incremento de RBP4 en niños obesos y una asociación entre un aumento en la expresión de 4 variantes del gen de esta proteína con la obesidad y con posibles complicaciones metabólicas (196-197). En esta línea, en nuestro trabajo hemos observado que los niños obesos presentan un incremento de RBP4, en comparación con los

controles, y que existe una correlación estadísticamente significativa de los niveles de esta citocina con el IMC. Respecto al porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura, aunque sí existe esa correlación, no es estadísticamente significativa; y en nuestro caso, no hemos encontrado relación entre niveles séricos de RBP4 e índice HOMA. Por tanto, consideramos que, en la población pediátrica, la RBP4 puede ser un biomarcador de obesidad, pero hacen falta más estudios y con muestras más grandes para determinar mejor el papel de esta molécula dentro del desarrollo de complicaciones y de riesgo cardiovascular asociado a la obesidad.

En relación a la concentración plasmática de los minerales evaluados en nuestro estudio, diversas aportaciones han indicado en pacientes pediátricos una alteración del metabolismo del hierro, en base a la determinación de alguno de los marcadores del mismo (hierro sérico, ferritina o porcentaje de saturación de transferrina), relacionada con el incremento del IMC por aumento de la adiposidad. En este sentido, se ha observado un déficit de hierro en niños y adolescentes con sobrepeso y obesos (198) y una correlación positiva entre el IMC y los niveles de ferritina, con una prevalencia elevada de valores bajos de hierro plasmático (185, 199). Además, se ha observado en la población pediátrica con obesidad, una correlación negativa entre el IMC y los valores séricos de hierro, al igual que entre éstos y la PCRus. Teniendo en cuenta que dicha proteína es un indicador de respuesta inflamatoria asociada a riesgo cardiovascular (que también se relaciona con el IMC), se concluye que en la obesidad existiría una inflamación crónica en la que los niveles plasmáticos de hierro estarían reducidos (184).

Una hipótesis sobre el mecanismo por el que existe dicha disminución de este mineral involucra a una proteína relacionada con la inflamación denominada hepcidina, que estaría aumentada en la obesidad y tendría un papel regulador de la homeostasis del hierro, pudiendo actuar a nivel intestinal, reduciendo su absorción, y a nivel de los macrófagos, promoviendo su captación por parte de estas células, dando como resultado unos valores reducidos de hierro circulante (200). Se considera, así, que la obesidad genera una respuesta inflamatoria subclínica de baja intensidad, que puede incrementar los depósitos de hierro (ferritina) en el organismo a expensas del sérico y también lo secuestra a nivel leucocitario (hepcidina), lo cual daría lugar a una reducción del hierro plasmático disponible para la eritropoyesis (200).

En esta línea, en nuestro estudio, de todos los minerales evaluados, sólo el hierro ha presentado una reducción de sus niveles estadísticamente significativa en los niños obesos, en comparación con los controles. Además, el IMC, porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura se han correlacionado negativamente con los valores de dicho mineral; resultado que también hemos encontrado al comparar los niveles de PCRus con los de hierro. Todo ello nos indica que el incremento de la masa grasa corporal en la obesidad se relaciona con una reducción en los niveles plasmáticos del hierro, y ello probablemente se deba a un secuestro por parte de las células inflamatorias; por lo que este mineral podría constituir un marcador de respuesta inflamatoria y, por tanto, se podría enmarcar dentro del contexto del síndrome metabólico. Cabe decir que, a pesar de la reducción de los niveles de hierro en sangre, en nuestra muestra poblacional no observamos ninguna diferencia en los parámetros eritrocitarios (números de hematíes, hematocrito y hemoglobina).

En el adulto, en pacientes obesos con síndrome metabólico asociado a inflamación y disfunción endotelial, se ha observado que el ácido úrico se encuentra elevado y se considera que puede tener un papel clave en este proceso y en posteriores complicaciones de base aterosclerótica a nivel cardiovascular (201-202). En este contexto, en niños obesos prepúberes, en comparación con no obesos, se ha descrito un aumento estadísticamente significativo del IMC, del perímetro de la cintura y del ácido úrico, junto con cambios en marcadores de respuesta inflamatoria (incremento de PCRus e IL-6, aunque éste último no es significativo), de disfunción endotelial (incremento de sICAM-1, la molécula tipo 1 de adhesión intercelular soluble), y de síndrome metabólico (aumento de insulina, índice HOMA y triglicéridos, y disminución significativa de HDL-colesterol y Apo A1). En el análisis de estos datos se ha visto una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre el ácido úrico y el IMC y los biomarcadores PCRus, IL-6, sICAM-1, insulina, índice HOMA y triglicéridos; y negativa con el HDL-colesterol y Apo A. Por todo ello se considera que los marcadores de inflamación, disfunción endotelial y síndrome metabólico se encuentran elevados en los niños obesos prepúberes y se correlacionan con los niveles séricos de ácido úrico (203).

En línea con esta última descripción, en nuestro estudio hemos observado en los niños obesos, en comparación con los controles, un

incremento de los niveles séricos de ácido úrico, que se correlacionan de forma positiva con el IMC, el perímetro de la cintura y el índice HOMA. De igual manera, como se ha comentado con anterioridad, también hemos observado una correlación positiva de los indicadores de obesidad con la PCRus como indicador de inflamación, y con diversos indicadores de posible síndrome metabólico: insulina, índice HOMA, triglicéridos, reducción del HDL-colesterol y presión arterial sistólica.

La asociación entre obesidad y GGT se ha descrito en adultos junto con un incremento de la GPT, observando una correlación positiva entre el IMC y la relación cintura/cadera con ambos parámetros, mientras que, por el contrario, la frecuencia en la actividad física se ha correlacionado negativamente, lo cual, lógicamente, reafirma la asociación (204). En la misma línea, en estudios en niños y adolescentes, se ha relacionado la obesidad con valores elevados de GGT (205) junto con factores considerados de riesgo cardiovascular como son un aumento de ácido úrico, una reducción en los valores de HDL-colesterol y un aumento en la presión sanguínea (206). Este aumento de la GGT también se ha asociado a una mayor GPT y a una reducción de la relación GOT/GPT (207), lo que justificaría una mayor prevalencia de esteatosis hepática, descrita en la población pediátrica obesa (208).

La GGT y el ácido úrico pueden tener puntos en común. La primera es un enzima que interviene en el metabolismo del glutatión, que tradicionalmente ha sido considerada un marcador de enfermedad hepática y con posterioridad se ha propuesto como factor de riesgo de patologías cardiovasculares, mientras que el ácido úrico procede del metabolismo de las purinas y ha sido aceptado como marcador de síndrome metabólico y aterosclerosis. Ambos se han relacionado con el estrés oxidativo, con una posible repercusión sobre la función endotelial: el ácido úrico por su capacidad para interferir con el óxido nítrico y la GGT a nivel del glutatión (202, 209).

En general, nuestros resultados están de acuerdo con los descritos previamente, pues encontramos un aumento de la GGT en los niños obesos frente a los controles, junto al del ácido úrico ya mencionado. De igual manera, la GGT también presenta una correlación positiva, estadísticamente significativa, con el IMC, el porcentaje de masa grasa y el perímetro de la cintura. Cabe mencionar que, a diferencia de lo descrito, el incremento

observado de la GPT en los niños obesos frente a los controles no es estadísticamente significativo, mientras que la reducción de la GOT si lo es, con lo cual la relación GOT/GPT disminuiría.

En publicaciones previas se ha descrito, en la población pediátrica, una asociación entre obesidad y aumento de la TSH, que revierte con la pérdida de peso (210), sin repercusión clínica (211) o con afectación de los niveles periféricos de hormonas tiroideas (212). En línea con estas aportaciones, en nuestro estudio hemos observado un incremento en las concentraciones de TSH en el grupo de niños obesos, en comparación con los controles, existiendo una correlación positiva entre el IMC y la TSH. Es decir, que un incremento del IMC se corresponde con un aumento de TSH.

Reuniendo los últimos aspectos revisados, se ha descrito una posible asociación entre obesidad, esteatosis hepática, alteración en la regulación de la función tiroidea y cambios en los factores de riesgo metabólico. Se ha observado que entre los niños obesos existe una mayor prevalencia de esteatosis hepática, diagnosticada mediante ecografía y con un aumento de las concentraciones séricas de GGT, GPT y GOT; y, dentro de los parámetros que indican la función tiroidea, un incremento de los niveles de TSH, pero sin modificaciones en las determinaciones de las hormonas tiroideas periféricas. El grado de esteatosis presenta una correlación con el incremento de TSH y ambos parámetros con el aumento de GGT y GPT, pero no de GOT. Dentro de los factores de riesgo metabólico asociados a la obesidad, se ha observado en los pacientes afectos de alteración hepática, en comparación con los que no presentan dicha alteración, un incremento en las concentraciones plasmáticas de insulina, índice HOMA, colesterol total y triglicéridos; y una reducción, aunque no significativa, del HDL-colesterol junto a un aumento de la presión arterial sistólica. Todos estos datos permiten concluir que en los niños y adolescentes obesos existe una prevalencia de esteatosis hepática que se asocia con niveles elevados de TSH, sin mayores cambios en la función tiroidea. Posiblemente estos cambios leves en la regulación endocrina influyan en las determinaciones de un perfil general que se puede circunscribir dentro del denominado síndrome metabólico (213).

La implicación de una respuesta inflamatoria a nivel sistémico en el desarrollo, progresión y pronóstico del proceso aterosclerótico, como base de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad, está adquiriendo una elevada relevancia (214). Se ha descrito la relación entre diversos

biomarcadores clínicos del proceso inflamatorio y estas enfermedades cardiovasculares, como ya hemos mencionado previamente. Entre ellos, un aumento de la PCRus (215), del número absoluto de neutrófilos (216) o de la relación neutrófilos/ linfocitos (217-218). En concreto, los neutrófilos están adquiriendo un papel predominante en la génesis de estos procesos a través de múltiples moléculas que expresan en su superficie y que contienen en su interior (219).

Estudios previos ya habían observado un incremento del número de leucocitos en niños obesos, que adicionalmente se relacionaba con un aumento de la PCRus (155). En la misma línea, las determinaciones de neutrófilos se encuentran incrementadas en los niños con sobrepeso/obesos en comparación con un IMC dentro de la normalidad (a partir de los 3 años de edad), junto con un incremento de la PCRus y una reducción del hierro sérico, lo cual permite afirmar que la relación entre obesidad y estos biomarcadores de inflamación puede establecerse de forma precoz y, por tanto, teóricamente sería reversible (165, 179, 185).

En esta línea, en la presente Tesis doctoral hemos observado que en nuestra muestra poblacional la obesidad se relaciona fundamentalmente con un incremento en el número de leucocitos totales y de neutrófilos. Estos últimos se correlacionan con los 3 parámetros antropométricos, mientras que los leucocitos solo con el z-IMC.

Estos datos, junto con los restantes parámetros comentados con anterioridad, nos indican que en el grupo estudio evaluado (niños con un z-IMC ≥ 1), en comparación con el grupo control, existe una respuesta inflamatoria incipiente a nivel vascular que sería la base para el desarrollo de posteriores complicaciones cardiometabólicas enmarcadas en el síndrome metabólico y la aterosclerosis.

4.5.2. ESTUDIO “IN VITRO” DE LA INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

En el presente trabajo hemos observado por primera vez, dentro de la información de la que tenemos constancia, de forma directa mediante un modelo experimental, la activación de la interacción leucocito-endotelio en niños con sobrepeso/obesidad, en comparación con controles. El estímulo de este proceso constituye el primer paso de una respuesta inflamatoria que, con el tiempo, puede generar el posterior desarrollo de forma precoz de enfermedades cardiovasculares de base aterosclerótica en el adulto (152).

Para evaluar dicha interacción hemos utilizado una aproximación experimental consistente en un modelo “in vitro” de adhesión dinámica, en el que se utiliza un sistema de cámara paralela en el cual se dispone una monocapa de células endoteliales sobre las que se perfunde una solución de leucocitos procedentes de los pacientes objeto de estudio, a una velocidad similar al flujo sanguíneo. Este modelo ha sido utilizado previamente en el laboratorio del Departamento de Farmacología en trabajos en los que se ha estudiado un posible daño vascular a largo plazo de diversas moléculas o grupos farmacológicos a través de la evaluación de su capacidad para interferir en la interacción leucocito-endotelio (140-145, 220). En estas condiciones se reproducen experimentalmente las primeras fases de la interacción entre ambos tipos celulares de forma similar al inicio de la respuesta inflamatoria, pudiendo evaluar tres parámetros característicos de este proceso: la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales. Hay que tener en cuenta que estos pasos de la interacción leucocito-endotelio son reversibles, mientras que el último (la migración), que no se puede evaluar con esta metodología, ya no lo es (221).

Hemos observado que los niños obesos, en comparación con los controles, presentan una reducción de la velocidad de rodamiento y un aumento del rodamiento y de la adhesión de los leucocitos (tanto PMN como PBMC) a las células endoteliales; lo que nos indica que en el grupo estudio las células inflamatorias se encuentran activadas e iniciando el fenómeno de la interacción. Cuando se analizan estos resultados en función del sexo, se observa que las modificaciones comentadas se generan de forma similar en niños y en niñas.

Como hemos comentado previamente, los niños con sobrepeso/obesidad de nuestro estudio presentan un conjunto de factores de riesgo cardiovascular entre los que destacan el aumento del perímetro de la cintura, un incremento de la resistencia a la acción de la insulina, alteraciones en el metabolismo lipídico con reducción del HDL-colesterol e incremento de triglicéridos y VLDL-colesterol, y tendencia a incrementar la presión arterial. Estos niños también presentan una serie de características indicativas de la presencia de una inflamación crónica sistémica, como son un incremento de la PCRus y de los leucocitos y neutrófilos circulantes en el territorio vascular, así como una disminución de los niveles plasmáticos de hierro.

Por ello, buscando dar un paso más en el estudio de la inflamación asociada a la obesidad infantil, en nuestro trabajo hemos evaluado directamente la relación de los factores de riesgo cardiovascular y los indicadores de respuesta inflamatoria mencionados con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio. En este sentido, observamos que, en general (salvo alguna excepción puntual), existe una correlación significativa de los indicadores antropométricos de obesidad (IMC, expresado como z-Score; porcentaje de masa grasa y perímetro de la cintura) y los marcadores de resistencia a insulina (insulina plasmática e índice HOMA) y de presencia de una respuesta inflamatoria (PCRus, número absoluto de leucocitos y neutrófilos, y hierro) con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio (velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión) en los leucocitos PMN. Sin embargo, con los PBMC sólo se observa esta asociación con los parámetros antropométricos y con la PCRus, con alguna excepción. Estos datos nos indicarían que la obesidad, en la edad pediátrica, afecta fundamentalmente a los neutrófilos como población leucocitaria inicialmente implicada en la respuesta inflamatoria, base de la génesis de la aterosclerosis.

Con ello, hemos demostrado que tanto diversos factores de riesgo cardiometabólicos como algunos parámetros descritos como indicadores inflamatorios a nivel vascular se correlacionan directamente con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio; lo que significa que en el grupo estudio (en comparación con los controles) existe una inflamación crónica subclínica, principalmente asociada a una situación de resistencia insulínica, que activa las primeras fases de la interacción leucocito-endotelio y que los neutrófilos son los leucocitos principalmente implicados en estos primeros estadios del proceso aterosclerótico.

En adultos, en diversas patologías en las que se ha observado una base aterosclerótica que implica un incremento del riesgo de morbi-mortalidad a nivel cardiovascular, como son la DM tipo 2 (222-224), la dislipemia (225), el síndrome del ovario poliquístico (226-227), e incluso la anorexia nerviosa (aunque es más frecuente en adolescentes) (228); se ha demostrado la existencia de una respuesta inflamatoria sistémica subclínica y alteraciones en la interacción leucocito-endotelio como uno de los primeros pasos en iniciar el proceso aterosclerótico.

En este contexto, se ha descrito que en pacientes afectados de DM tipo 2 también se observa un aumento de marcadores de respuesta inflamatoria (como PCRus) y citocinas proinflamatorias (como TNF- α e IL-6). Estos pacientes presentan un aumento del estrés oxidativo, atribuido a un deterioro de la función mitocondrial, que sería responsable de una disfunción endotelial con activación de dichas células, lo que generaría un incremento de los niveles plasmáticos de las moléculas solubles de adhesión endotelial sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina (222-224). Todo esto induciría la activación de la interacción leucocito-endotelio, que se muestra en el estudio “in vitro” con una reducción de la velocidad de rodamiento de los leucocitos y un incremento del rodamiento y la adhesión de estas células sobre las células HUVEC (222, 224). Una demostración adicional de este razonamiento es que moléculas con capacidad para reducir el estrés oxidativo revierten las alteraciones en los citados parámetros de la interacción leucocito-endotelio (223).

En el mismo sentido, pacientes con dislipemia y con un incremento de la resistencia a insulina, presentan un incremento del estrés oxidativo, disfunción endotelial, niveles elevados de las moléculas solubles de adhesión sICAM-1 y sE-selectina, y un aumento del reclutamiento de leucocitos (229).

Fármacos utilizados en el tratamiento de esta alteración metabólica revierten dichas modificaciones y los parámetros indicadores de la interacción leucocito-endotelio, en el mismo modelo experimental utilizado en la presente Tesis Doctoral: aumentan la velocidad de rodamiento y reducen el rodamiento y la adhesión leucocitaria (225).

De manera similar, mujeres con síndrome de ovario poliquístico (patología con una elevada incidencia de insulinoresistencia) también presentan un incremento del estrés oxidativo, de las citocinas proinflamatorias

IL-6 y TNF- α , y de las moléculas solubles de adhesión endotelial sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina. En estas condiciones se ha observado que los leucocitos presentan una reducción de la velocidad de rodamiento y un incremento del rodamiento y la adhesión a las células HUVEC. Todo ello demuestra que, en esta patología, existe un deterioro de la función endotelial, ligado a un aumento del estrés oxidativo por afectación mitocondrial, que implica la activación de estas células e inducción de la interacción leucocito-endotelio dentro del desarrollo inicial del proceso aterosclerótico (226-227).

La anorexia nerviosa también se ha relacionado con un incremento en el riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular. Por ello se ha evaluado la existencia de un proceso inflamatorio que pudiera generar alteraciones de base aterosclerótica que justificaran los problemas cardiovasculares asociados a los trastornos metabólicos descritos en estos pacientes. En dicho contexto, se ha observado que estos pacientes presentan un incremento de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , y de la molécula soluble de adhesión sVCAM-1; y que en los estudios “in vitro” de interacción leucocito-endotelio se muestra una activación de este proceso a través de una reducción en la velocidad de rodamiento y un aumento del rodamiento y la adhesión leucocitaria sobre las células HUVEC. Por tanto, todos estos datos justifican la asociación entre anorexia nerviosa, respuesta inflamatoria y estímulo de la interacción leucocito-endotelio que podrían explicar el aumento del riesgo cardiovascular en dicha patología (228).

Diversas aportaciones clínicas han descrito que en edades pediátricas ya existe una relación entre el exceso de peso (frecuentemente asociado a insulinoresistencia y otras manifestaciones del denominado síndrome metabólico, como dislipemia y aumento de la presión arterial), y una respuesta inflamatoria subclínica a nivel vascular con incremento de los niveles plasmáticos de PCRus o del número de leucocitos (y dentro de ellos, de los neutrófilos), de otras citocinas proinflamatorias, como el TNF- α o la IL-6, y de biomarcadores de activación endotelial, como son las moléculas solubles de adhesión endotelial sICAM-1, sVCAM-1 y sSelectinas (126-127, 156, 230-232). Estas moléculas se incrementan por la activación endotelial ante una agresión y generan la activación de las células leucocitarias para iniciar la interacción leucocito-endotelio como primer eslabón en la respuesta inflamatoria, que cuando se mantiene en el tiempo se considera el primer paso en el proceso de aterosclerosis (152).

En este sentido, Glowinska et al. (2005) (126) describieron en un estudio en niños y adolescentes obesos, con HTA y diabéticos, un aumento de las moléculas solubles de adhesión endotelial sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina. Este incremento era similar al descrito previamente en adultos, que revertía con la pérdida de peso (233), llegando a la conclusión de que la unión entre obesidad, disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares era el resultado de la asociación entre obesidad, resistencia a la insulina e inflamación (234).

Ezgi et al. (2005) (156) en un estudio realizado en niños obesos prepúberes (en comparación con controles), determinaron, en condiciones basales y tras un test de tolerancia a glucosa, los valores plasmáticos de PCRus (como marcador de inflamación), sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina (como moléculas solubles de adhesión endotelial, marcadores de activación de este tipo celular) y el perfil hidrocarbonado y lipídico, entre otros. En condiciones basales observaron un incremento en la resistencia a insulina y en la PCRus, y tras la sobrecarga de glucosa se mostró un incremento en la sVCAM-1 que se correlacionaba con el aumento de la insulinoresistencia. A su vez, las tres moléculas de adhesión endotelial se correlacionaban entre sí, por lo que llegaban a la conclusión de que en estos pacientes existía una inflamación endotelial asociada fundamentalmente a la resistencia insulínica, aunque también a alteraciones lipídicas y al IMC.

Kapiotis et al. (2006) (22) observaron en niños obesos un incremento de la PCRus, de la citocina proinflamatoria IL-6 y de la molécula soluble de adhesión endotelial sE-selectina junto con un deterioro de la función endotelial y de la morfología vascular.

Caballero et al. (2008) (127) describieron en niños obesos (en comparación con controles) un incremento en la resistencia a insulina y en los niveles de triglicéridos, y un aumento de los valores de PCRus, de TNF- α y de sICAM-1. De acuerdo con ello concluían que en estos niños existía una inflamación subclínica con disfunción endotelial asociada a la insulinoresistencia.

En el mismo sentido, más recientemente se ha demostrado que los niños obesos presentan un elevado índice de resistencia a insulina y un incremento de los niveles plasmáticos de la PCRus y de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α (como indicadores de la existencia de una

respuesta inflamatoria sistémica). Estos sujetos también muestran un aumento del estrés oxidativo (que acaba generando una disfunción endotelial) y de las moléculas solubles de adhesión endotelial sICAM-1 y sVCAM-1, que indican la presencia de una activación endotelial que supondría el inicio de la interacción leucocito-endotelio (104-105, 132, 230- 231). De manera similar, Maggio et al. (2012) (235), observaron en adolescentes obesos, en comparación con controles, un aumento de la PCRus y de las moléculas de adhesión endotelial sVCAM-1 y sE-selectina.

En resumen, en la obesidad infantil existe un incremento de la adiposidad central, un aumento patológico de la resistencia a la insulina y una respuesta inflamatoria subclínica sistémica asociada. Esto da lugar a un estímulo del estrés oxidativo que a nivel vascular provoca una disfunción de las células endoteliales (con la consiguiente activación de las mismas), lo que origina un incremento de las moléculas solubles de adhesión endotelial, iniciándose así el primer paso en la interacción leucocito-endotelio. Todo ello sería el determinante para generar el comportamiento de los leucocitos sobre las células endoteliales observado en la presente Tesis Doctoral con el estudio dinámico “in vitro” sobre la interacción leucocito-endotelio, evaluando la velocidad de rodamiento, el rodamiento y la adhesión de las células leucocitarias sobre las HUVEC, con un comportamiento similar al descrito en adultos en diversas patologías con una base inflamatoria descrita y asociada a la aterogénesis.

En nuestros resultados, son los neutrófilos las células inflamatorias principalmente involucradas en las alteraciones de la interacción leucocito-endotelio asociadas a la obesidad y sus complicaciones. Este dato está de acuerdo con recientes aproximaciones que han incidido en la importancia del papel de los neutrófilos en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, principalmente en fases tempranas como iniciadores de la lesión (116-117). Nuestro estudio está realizado en sujetos en edad pediátrica y, por tanto, nos encontramos en las etapas tempranas del proceso aterosclerótico; de ahí que nuestro trabajo refuerce estas descripciones sobre los neutrófilos.

Para intentar explicar alguno de los mecanismos por el que en los niños con sobrepeso/obesidad, en comparación con los controles, observamos una reducción en la velocidad de rodamiento y un aumento del rodamiento y la adhesión de los leucocitos sobre las células HUVEC (características de una activación de la interacción entre ambos tipos celulares), evaluamos por

citometría de flujo la expresión en las células leucocitarias de diversas moléculas de adhesión implicadas en este proceso.

En estas condiciones, sólo observamos una reducción, no estadísticamente significativa, en la expresión de la molécula L-selectina (CD62L) fundamentalmente en los neutrófilos (aunque también se presenta en los monocitos), que nos indicaría una activación muy incipiente de éstas células y justificaría, con los datos de que disponemos, las alteraciones que observamos en los parámetros que indican un inicio de la interacción leucocito-endotelio. Sin embargo, teniendo en cuenta las múltiples moléculas que expresan los neutrófilos en su superficie o que contienen en su interior y que se han implicado en la génesis del proceso aterosclerótico (219, 236), no es posible descartar que existan otros mecanismos no evaluados responsables de la respuesta funcional que observamos al estudiar la interacción leucocito-endotelio.

Estos últimos resultados estarían en línea con lo descrito previamente, donde en pacientes adultos con obesidad mórbida susceptibles de ser tratados con cirugía bariátrica y con múltiples co-morbilidades asociadas a su obesidad (como HTA, DM tipo 2 o problemas tromboembólicos), y, por tanto, en una situación patológica mucho más acentuada que nuestra población (cuya obesidad tiene un menor tiempo de evolución y lógicamente con una menor repercusión y deterioro sobre el organismo); se observa exclusivamente una reducción, estadísticamente significativa, de la expresión de L-selectina (CD62L) en neutrófilos (237). Por el contrario, en pacientes adultos con DM tipo 2 complicada con microangiopatía diabética, comparados con diabéticos tipo 2 sin dicha complicación, se observa en los neutrófilos un incremento de la expresión de CD11b junto con una reducción del CD62L, lo cual indica una activación de estas células y una adhesión intensa al endotelio. Esto se une a un aumento de las moléculas de adhesión solubles (sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina) y de diversos marcadores de inflamación (PCRus e IL-6), todo lo cual se considera consecuencia de la complicación de la DM tipo 2 (238).

Por tanto, los cambios significativos en la expresión de las moléculas de adhesión leucocitarias relacionados con la obesidad se producirían en situaciones más avanzadas con repercusión patológica sobre el organismo; mientras que, por el contrario, en pacientes pediátricos con sobrepeso/obesidad (como es nuestra muestra poblacional), se generaría un proceso reversible caracterizado por una fase precoz de activación endotelial,

justificada por un incremento de las moléculas solubles indicadoras de dicho proceso (principalmente sICAM-1, sVCAM-1 y sE-selectina), con una repercusión muy incipiente sobre la expresión de la molécula de adhesión leucocitaria L-selectina, que se reduce. La activación de los leucocitos induce una reducción en la expresión de L-selectina debido a que esta molécula es liberada de la superficie celular por un proceso de proteólisis y aparece como forma soluble en la sangre periférica, lo cual se interpreta como un marcador de una respuesta inflamatoria crónica (55).

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La muestra de población pediátrica estudiada con sobrepeso/obesidad, en comparación con el grupo control, presenta un incremento del IMC que se correlaciona positivamente con el porcentaje de masa grasa y ambos con el perímetro de la cintura, lo cual nos indica que el aumento de peso es debido a una mayor adiposidad visceral y no a un incremento de la masa magra. Estos parámetros se correlacionan con un incremento de la presión arterial, fundamentalmente sistólica, pero manteniéndose dentro de los límites considerados de normalidad para la edad.
2. Los pacientes con sobrepeso/obesidad, en relación con los controles, muestran a nivel sanguíneo una alteración en diversos biomarcadores considerados de riesgo cardiometabólico y de respuesta inflamatoria, como son: incremento de la concentración plasmática de insulina y de resistencia a la acción de esta hormona (medida a través del índice HOMA); aumento de los niveles de triglicéridos, VLDL-colesterol, PCRus, RBP4, ácido úrico, TSH, GGT y número de leucocitos y neutrófilos; y reducción de los valores séricos de HDL-colesterol, hierro y GOT. En la mayor parte de los casos, los parámetros antropométricos citados se correlacionan con estas variables analíticas.
3. Al estudiar “in vitro” la interacción entre los leucocitos de los niños con sobrepeso/obesidad y una monocapa de células endoteliales (HUVEC), comparándolos con el comportamiento de los leucocitos del grupo control, observamos que tanto los PMN como los PBMC presentan una reducción en la velocidad de rodamiento y un incremento del rodamiento y la adhesión sobre las células endoteliales. El análisis de estos resultados en función del género nos muestra que las modificaciones se generan de forma similar en niños y en niñas.
4. Los parámetros antropométricos, indicadores de resistencia a insulina y de respuesta inflamatoria (en especial, PCRus y hierro sérico) presentan, salvo alguna excepción puntual, una correlación con los parámetros evaluados de la interacción leucocito-endotelio (velocidad de rodamiento, rodamiento y adhesión) en los leucocitos PMN; mientras que en los

PBMC sólo se observa esta relación con las variables antropométricas y con la PCRus, con alguna excepción.

5. El análisis de la expresión de diversas moléculas de adhesión en las células leucocitarias de los niños con sobrepeso/obesidad, en relación con los controles, sólo muestra una ligera tendencia a la reducción de la L-selectina, sobre todo en los neutrófilos.
6. Todos estos datos nos demuestran que la situación de sobrepeso/obesidad en la edad infantil y sus complicaciones (donde tiene un lugar destacado la resistencia a la insulina) se asocian a una respuesta inflamatoria subclínica y crónica, que se inicia a nivel vascular con la interacción fundamentalmente entre neutrófilos (como leucocitos principalmente implicados en estos primeros estadios) y células endoteliales; lo cual indica que los niños y adolescentes con estas características están predispuestos al desarrollo precoz de patologías de base aterosclerótica.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

1. Estudio ALADINO: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2011. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2013.
2. Flegal KM, Kruszon-Moran D, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA* 2016; 315: 2284-91.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe de la Comisión para acabar con la obesidad infantil. 2016 (disponible en www.who.int/end-childhood-obesity/publications/echo-report/es)
4. Estudio ALADINO 2013: Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España 2013. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid, 2014.
5. Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Perez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L. Obesidad en la infancia y adolescencia en España. Resultados del estudio enKid (1998-2000). *Med Clin (Barc)* 2003;121: 725-732.
6. Lloyd JJ, Wyatt KM, Creanor S. Behavioural and weight status outcomes from an exploratory trial of the Healthy Lifestyles Programme (HeLP): a novel school-based obesity prevention programme. *BMJ Open* 2012; 2: e000390. doi: 10.1136/bmjopen-2011-000390.
7. Singh AS, Mulder C, Twisk JW, Van MW, Chinapaw MJ. Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 2008; 9: 474-488.
8. Yeste D, Carrascosa A. Complicaciones metabólicas de la obesidad infantil. *An Pediatr (Barc)* 2011; 75:135.e1-e9.
9. Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 2371-9.
10. Griffiths LJ, Parsons TJ, Hill AJ. Self-esteem and quality of life in obese children and adolescents: a systematic review. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 282-304.

11. Biro FM, Wien M. Childhood obesity and adult morbidities. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 1499S-1505S.
12. Magnussen CG, Koskinen J, Chen W, Thomson R, Schmidt MD, Srinivasan SR, et al. Pediatric metabolic syndrome predicts adulthood metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis, and type 2 diabetes mellitus but is no better than body mass index alone: the Bogalusa Heart Study and the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation* 2010; 122: 1604-11.
13. Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB, Currie A, Peile E, Stranges S, et al. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep* 2008; 31: 619-626.
14. Weiss R, Kaufman FR. Metabolic complications of childhood obesity: identifying and mitigating the risk. *Diabetes Care* 2008; 31 (Suppl 2): S310–S316.
15. Zimmet P, Alberti K, George MM, Kaufman F, Tajima N, Silink M, et al. IDF Consensus Group. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 299-306.
16. Graf C, Ferrari N. Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Visc Med* 2016; 32: 357-362.
17. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350: 2362-74.
18. Saland JM. Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19: 183-91.
19. Wu YE, Zhang CL, Zhen Q. Metabolic syndrome in children (Review). *Exp Ther Med* 2016; 12: 2390-2394.
20. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, et al. Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:852-7.
21. Ianuzzi A, Licenziati MR, Acampora C, Salvatore V, Auriemma L, Romano ML, et al. Increased carotid intima-media thickness and stiffness in obese children. *Diabetes Care* 2004; 27: 2506-08.

22. Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2541-6.
23. Reinehr T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World J Diabetes* 2013; 4: 270-281.
24. Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol* 2008; 159 (Suppl 1): S67-74.
25. Maclaren NK, Gujral S, Ten S, Motagheti R. Childhood obesity and insulin resistance. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 73-78.
26. Bel Comós J, Murillo Valles M. Obesidad y síndrome metabólico. *Protoc diagn ter pediater*. 2011; 1: 228-35
27. Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, et al. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes*. 1999; 48: 2039-44.
28. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valldecabres C, Carmena R. Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in non diabetic subjects. *Med Clin (Barc)* 2001; 117: 530-533.
29. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
30. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; 32 (Suppl 3): 14-23.
31. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 447-52.
32. Matsuzawa Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 637-647.
33. Weiss R, Dufour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, et al. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet* 2003; 362: 951-7.
34. Thamer C, Machann J, Bachmann O, Haap M, Dahl D, Wietek B, et al. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 1785-91.

35. Caprio S, Hyman LD, Limb C, McCarthy S, Lange R, Sherwin RS, et al. Central adiposity and its metabolic correlates in obese adolescent girls. *Am J Physiol* 1995; 269: E118-126.
36. Lemieux S. Contribution of visceral obesity to the insulin resistance syndrome. *Can J Appl Physiol* 2001; 26: 273-90.
37. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Lorente RI, Martínez-Valls J, Carmena R. Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 101-6.
38. Ascaso JF. Obesidad abdominal, Resistencia a la insulina y riesgo metabólico y vascular. *Med Clin (Barc)* 2008; 131: 380-1
39. Cruz ML, Bergman RN, Goran MI. Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1631-6.
40. Weiss R, Taksali SE, Dufour S, Yeckel CW, Papademetris X, Cline G, et al. The «obese insulin-sensitive» adolescent: importance of adiponectin and lipid partitioning. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 3731-7.
41. Sinha R, Dufour S, Petersen KF, LeBon V, Enoksson S, Ma YZ, et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes.* 2002; 51: 1022-7.
42. Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention of Diabetes. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 2007; 369: 2059-61.
43. Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 471-82.
44. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152.
45. Borai A, Livingstone C, Ferns GA. The biochemical assessment of insulin resistance. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 324-342.
46. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MA, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000; 23: 57-63.

47. Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, et al. Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 1453-1458.
48. Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian SA. Waist circumference is an independent predictor of insulin resistance in black and white youths. *J Pediatr*. 2006; 148: 188-194.
49. Lee K, Song YM, Sung J. Which obesity indicators are better predictors of metabolic risk?: Healthy Twin Study. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 834-40.
50. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 108-13.
51. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-7.
52. Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Catalán V, Frühbeck G. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Rev Esp Obes* 2008; 6: 264-79.
53. Staros EB. Innate immunity: New approaches to understanding its clinical significance. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 305-12.
54. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010; 330: 362-6.
55. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 255-66.
56. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med* 2001; 194: 205-18.
57. Shigeta A, Matsumoto M, Tedder TF, Lowe JB, Miyasaka M, Hirata T. An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation. *Blood* 2008; 112: 4915-23.
58. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 2011; 118: 6743-51.

59. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994; 84(7): 2068-101.
60. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002; 99: 336-41.
61. Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 6105-11.
62. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-89.
63. Dimasi D, Sun WY, Bonder CS. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 1167-75.
64. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, Ziogas A, Hajishengallis G, Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther* 2015; 147: 123-35.
65. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203: 2569-75.
66. Huang MT, Larbi KY, Scheiermann C, Woodfin A, Gerwin N, Haskard DO, et al. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood* 2006; 107: 4721-7.
67. Schmitt MM, Megens RT, Zerneck A, Bidzhekov K, van den Akker NM, Rademakers T, van Zandvoort MA, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C. Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation* 2014; 129: 66-76.
68. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 355-62.

69. Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 365-367.
70. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282: 2131-35.
71. Frühbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004; 2: 197-208.
72. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004; 110: 1564-71.
73. Reyes M. Inflammatory characteristics of obesity. *Rev Chil Nutr* 2010; 37: 498-504
74. Ghomari-Boukhatem H, Bouchouicha A, Mekki K, Chenni K, Belhadj M, Bouchenak M. Blood pressure, dyslipidemia and inflammatory factors are related to body mass index in scholar adolescents. *Arch Med Sci* 2017; 13: 46-52.
75. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, et al. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499-511.
76. Saito I, Yonemasu K, Inami F. Association of body mass index, body fat, and weight gain with inflammation markers among rural residents in Japan. *Circ J* 2003; 67: 323-329.
77. Bustos P, Rosas B, Román P, Villagrán J, Amigo H. Association of C reactive protein levels with metabolic syndrome in adults: a population-based study. *Rev Med Chil* 2016; 144: 1239-1246.
78. Dickinson S, Hancock DP, Petocz P, Ceriello A, Brand-Miller J. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1188-93
79. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105: 564-9.

80. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1785-8.
81. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Ramírez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, et al. Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes Surg* 2007; 17: 1464-74.
82. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 367-77.
83. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316: 129-39.
84. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
85. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-30.
86. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53:1285-92.
87. Langin D, Arner P. Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17:314-20.
88. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002; 51: 2045-55.
89. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-15.
90. Dandona P, Aljada A, Mohanty P. The anti-inflammatory and potential anti-atherogenic effect of insulin: a new paradigm. *Diabetologia* 2002; 45: 924-930.
91. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24: 278-301.

92. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389: 610-4.
93. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 2006; 116: 1494-505.
94. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, et al. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 2007; 6: 386-97.
95. Bouzakri K, Zierath JR. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance. *J Biol Chem* 2007; 282: 7783-9.
96. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
97. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1654-9.
98. Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008; 3: 545-56.
99. Nijhuis J, Rensen SS, Slaats Y, Van Dielen FM, Buurman WA, Greve JW. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 2014-8.
100. Bluher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin Sci (Lond)* 2016; 130: 1603-14.
101. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2006; 30: 400-18.
102. Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology* 2010; 276: 85-94.
103. Rizzo AM, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol* 2010; 698: 52-67.

104. Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2011; 158: 369-84.
105. Codoñer-Franch P, Navarro-Ruiz A, Fernández-Ferri M, Arilla-Codoñer A, Ballester-Asensio E, Valls-Bellés V. A matter of fat: insulin resistance and oxidative stress. *Pediatr Diabetes* 2012; 13: 392-9.
106. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.
107. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 29-38.
108. Yesilbursa D, Serdar Z, Serdar A, Sarac M, Coskun S, Jale C. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with Orlistat on lipid peroxides levels. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005; 29: 142-145.
109. Woollard KJ. Immunological aspects of atherosclerosis. *Clinical Science*. 2013; 125: 221-235.
110. Mitchell RN. Vasos sanguíneos. En: Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds.). 9ª ed. Barcelona. Editorial Elsevier España SL; (2015). Págs. 491-500.
111. Millonig G, Schwentner C, Mueller P, Mayerl C, Wick G. The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 547-553
112. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 361-403.
113. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277: 49982-49988.
114. Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 2012; 217: 492-502
115. Koltsova EK, Ley K. How dendritic cells shape atherosclerosis. *Trends Immunol* 2011; 32: 540-547.
116. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013; 210: 1283-1299.

117. Pende A, Artom N, Bertolotto M, Montecucco F, Dallegri F. Role of neutrophils in atherogenesis: an update. *Eur J Clin Invest* 2016; 46: 252-263
118. Döring Y, Weber C, Soehnlein O. Footprints of Neutrophil Extracellular Traps as Predictors of Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1735-1736.
119. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008; 112: 1461-71.
120. Drechsler M, Megens RT, Van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122: 1837-1845.
121. Döring Y, Drechsler M, Wantha S, Kemmerich K, Lievens D, Vijayan S, et al. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 2012; 110: 1052-1056.
122. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J* 2001; 15: 1149-1157.
123. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Bjorkstrom NK, et al. Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice. *Am J Pathol* 2010; 177: 493-500.
124. Habib SA, Saad EA, Elsharkawy AA, Attia ZR. Pro-inflammatory adipocytokines, oxidative stress, insulin, Zn and Cu: Interrelations with obesity in Egyptian non-diabetic obese children and adolescents. *Adv Med Sci* 2015; 60: 179-85.
125. Paltoglou G, Schoina M, Valsamakis G, Salakos N, Avloniti A, Chatzinikolaou A, et al. Interrelations among the adipocytokines leptin and adiponectin, oxidative stress and aseptic inflammation markers in pre- and early-pubertal normal-weight and obese boys. *Endocrine* 2017; 55: 925-33.
126. Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sI-CAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sPselectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension and diabetes. *Metabolism* 2005; 54: 1020-26.
127. Caballero AE, Bousquet-Santos K, Robles-Osorio L, Montagnani V, Soodini G, Porramatikul S, et al. Overweight latino children and adolescents have marked endothelial dysfunction and subclinical

- vascular inflammation in association with excess body fat and insulin resistance. *Diabetes Care* 2008; 31: 576-82.
128. Mengel E, Tillmann V, Remmel L, Kool P, Purge P, Lätt E, et al. Changes in inflammatory markers in estonian pubertal boys with different BMI values and increments: A 3-Year Follow-Up Study. *Obesity (Silver Spring)* 2017; 25: 600-607.
 129. Valle M, Martos R, Gascón F, Cañete R, Zafra MA, Morales R. Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2005; 31: 55-62.
 130. Murdolo G, Nowotny B, Celi F, Donati M, Bini V, Papi F, et al. Inflammatory adipokines, high molecular weight adiponectin, and insulin resistance: a population-based survey in prepubertal schoolchildren. *PLoS One* 2011; 6: e17264. doi: 10.1371/journal.pone.0017264.
 131. Yeste D, Vendrell J, Tomasini R, Broch M, Gussinyé M, Megia A, et al. Interleukin-6 in obese children and adolescents with and without glucose intolerance. *Diabetes Care* 2007; 30: 1892-4.
 132. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Megías-Vericat J, Tortajada-Girbés M, Alonso-Iglesias E. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 2011; 215: 475-80.
 133. Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 2010; 5: 56-63.
 134. Araki S, Dobashi K, Yamamoto Y, Asayama K, Kusuhara K. Increased plasma isoprostane is associated with visceral fat, high molecular weight adiponectin, and metabolic complications in obese children. *Eur J Pediatr* 2010; 169: 965-70.
 135. Carrascosa Lezcano A, Fernández García JM, Fernández Ramos C, Ferrández Longás A, López-Siguero JP, Sánchez González E, Sobradillo Ruiz B, Yeste Fernández D; Grupo Colaborador Español. [Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood]. *An Pediatr (Barc)* 2008; 68: 552-69.

136. Marshall WA Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Childh* 1969; 44: 291-303
137. Marshall WA Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Childh* 1970; 45: 13-23.
138. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005; 115: e500-3.
139. Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Luscinskas FW, Mayadas TN. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* 2007; 110: 3682-90.
140. Ibiza S, Alvarez A, Romero W, Barrachina MD, Esplugues JV, Calatayud S. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C1588-95.
141. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, Blanquer A, Esplugues JV, Alvarez A. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS* 2010; 24: 1259-66.
142. De Pablo C, Orden S, Calatayud S, Martí-Cabrera M, Esplugues JV, Alvarez A. Differential effects of tenofovir/emtricitabine and abacavir/lamivudine on human leukocyte recruitment. *Antivir Ther* 2012; 17: 1615-9.
143. Orden S, De Pablo C, Rios-Navarro C, Martinez-Cuesta MA, Peris JE, Barrachina MD, et al. Efavirenz induces interactions between leucocytes and endothelium through the activation of Mac-1 and gp150,95. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 995-1004.
144. Ríos-Navarro C, de Pablo C, Collado-Díaz V, Orden S, Blas-García A, Martínez-Cuesta MÁ, et al. Differential effects of anti-TNF- α and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *Eur J Pharmacol* 2015; 765: 355-65.
145. Esplugues JV, De Pablo C, Collado-Díaz V, Hernández C, Orden S, Álvarez Á. Interference with purinergic signalling: an explanation for the cardiovascular effect of abacavir?. *AIDS* 2016; 30: 1341-51.

146. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1377-96.
147. Zylke JW, Bauchner H. The Unrelenting Challenge of Obesity. *JAMA* 2016; 315: 2277-8.
148. Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK, et al. Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014. *JAMA* 2016; 315: 2292-9.
149. Twig G, Yaniv G, Levine H, Leiba A, Goldberger N, Derazne E, et al. Body-Mass Index in 2.3 Million Adolescents and Cardiovascular Death in Adulthood. *N Engl J Med* 2016; 374: 2430-40.
150. Burke V. Obesity in childhood and cardiovascular risk. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 831-7.
151. Di Pietro N, Marcovecchio ML, Di Silvestre S, De Giorgis T, Cordone VG, Lanuti P, et al. Plasma from pre-pubertal obese children impairs insulin stimulated Nitric Oxide (NO) bioavailability in endothelial cells: Role of ER stress. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 443: 52-62.
152. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43
153. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-25.
154. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, et al. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation* 2004; 109: 1981-6.
155. Ford ES, Galuska DA, Gillespie C, Will JC, Giles WH, Dietz WH. C-reactive protein and body mass index in children: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Pediatr* 2001; 138: 486-92.
156. Ezgü FS, Hasanoglu A, Tümer L, Ozbay F, Aybay C, Gündüz M. Endothelial activation and inflammation in prepubertal obese Turkish children. *Metabolism* 2005; 54: 1384-9.
157. Styne DM. Puberty, obesity and ethnicity. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 472-8.

158. Ribeiro J, Santos P, Duarte J, Mota J. Association between overweight and early sexual maturation in Portuguese boys and girls. *Ann Hum Biol* 2006; 33: 55-63.
159. Ahmed ML, Ong KK, Dunger DB. Childhood obesity and the timing of puberty. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20: 237-42.
160. Dai YL, Fu JF, Liang L, Gong CX, Xiong F, Luo FH, et al. Association between obesity and sexual maturation in Chinese children: a multicenter study. *Int J Obes (Lond)* 2014; 38: 1312-6.
161. Zhai L, Liu J, Zhao J, Liu J, Bai Y, Jia L, et al. Association of Obesity with Onset of Puberty and Sex Hormones in Chinese Girls: A 4-Year Longitudinal Study. *PLoS One* 2015; 10: e0134656. doi: 10.1371/journal.pone.0134656.
162. Lee JM, Wasserman R, Kaciroti N, Gebremariam A, Steffes J, Dowshen S, et al. Timing of Puberty in Overweight Versus Obese Boys. *Pediatrics* 2016; 137: e20150164. doi:10.1542/peds.2015-0164.
163. Freedman DS, Wang J, Thornton JC, Mei Z, Sopher AB, Pierson RN Jr, et al. Classification of body fatness by body mass index-for-age categories among children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163:805-11.
164. Freedman DS, Thornton JC, Pi-Sunyer FX, Heymsfield SB, Wang J, Pierson RN Jr, et al. The body adiposity index (hip circumference ÷ (height)^{1.5}) is not a more accurate measure of adiposity than is BMI, waist circumference, or hip circumference. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 2438-44.
165. Singer K, Eng DS, Lumeng CN, Gebremariam A, Lee JM. The relationship between body fat mass percentiles and inflammation in children. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22: 1332-6.
166. Rademacher ER, Jacobs DR Jr, Moran A, Steinberger J, Prineas RJ, Sinaiko A. Relation of blood pressure and body mass index during childhood to cardiovascular risk factor levels in young adults. *J Hypertens* 2009; 27: 1766-74.
167. Field AE, Cook NR, Gillman MW. Weight status in childhood as a predictor of becoming overweight or hypertensive in early adulthood. *Obes Res* 2005; 13: 163-9.
168. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med* 2010; 362: 485-93.

169. Sorof JM, Lai D, Turner J, Poffenbarger T, Portman RJ. Overweight, ethnicity, and the prevalence of hypertension in school-aged children. *Pediatrics* 2004; 113: 475-82.
170. Lo JC, Sinaiko A, Chandra M, Daley MF, Greenspan LC, Parker ED, et al. Prehypertension and hypertension in community-based pediatric practice. *Pediatrics* 2013; 131: e415-24.
171. Daley MF, Sinaiko AR, Reifler LM, Tavel HM, Glanz JM, Margolis KL, et al. Patterns of care and persistence after incident elevated blood pressure. *Pediatrics* 2013; 132: e349-55.
172. Lo JC, Maring B, Chandra M, Daniels SR, Sinaiko A, Daley MF, et al. Prevalence of obesity and extreme obesity in children aged 3-5 years. *Pediatr Obes* 2014; 9: 167-75.
173. Lo JC, Chandra M, Sinaiko A, Daniels SR, Prineas RJ, Maring B, et al. Severe obesity in children: prevalence, persistence and relation to hypertension. *Int J Pediatr Endocrinol* 2014; 2014 (1):3. doi: 10.1186/1687-9856-2014-3.
174. Skinner AC, Perrin EM, Moss LA, Skelton JA Cardiometabolic Risks and Severity of Obesity in Children and Young Adults. *N Engl J Med* 2015; 373: 1307-17.
175. Parker ED, Sinaiko AR, Kharbanda EO, Margolis KL, Daley MF, Trower NK, et al. Changes in weight status and development of hypertension. *Pediatrics* 2016; 137: e20151662. doi: 10.1542/peds.2015-1662.
176. Nigro E, Scudiero O, Ludovica Monaco M, Polito R, Schettino P, Grandone A, et al. Adiponectin profile and Irisin expression in Italian obese children: Association with insulin-resistance. *Cytokine*. 2017; pii: S1043-4666(16)30604-4. doi: 10.1016/j.cyto.2016.12.018.
177. Schmitz KH, Jacobs DR Jr, Hong CP, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of physical activity with insulin sensitivity in children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1310-6.
178. Elmaogulları S, Tepe D, Uçaktürk SA, Karaca Kara F, Demirel F. Prevalence of Dyslipidemia and Associated Factors in Obese Children and Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2015; 7: 228-34.
179. Rigamonti AE, Agosti F, De Col A, Silvestri G, Marazzi N, Bini S, et al. Severely obese adolescents and adults exhibit a different association of circulating levels of adipokines and leukocyte expression of the

- related receptors with insulin resistance. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 565967. doi: 10.1155/2013/565967.
180. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Are obesity-related metabolic risk factors modulated by the degree of insulin resistance in adolescents? *Diabetes Care* 2006; 29: 1599-1604.
 181. Marcovecchio ML, Bagordo M, Marisi E, De Giorgis T, Chiavaroli V, Chiarelli F, et al. One-hour post-load plasma glucose levels associated with decreased insulin sensitivity and secretion and early makers of cardiometabolic risk. *J Endocrinol Invest* 2017; doi:10.1007/s40618-017-0638-6
 182. Carmena R. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Esp Cardiol (Supl.)* 2008; 8:19C-26C.
 183. Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med* 2007; 357: 2329-37.
 184. Richardson MW, Ang L, Visintainer PF, Wittcop CA. The abnormal measures of iron homeostasis in pediatric obesity are associated with the inflammation of obesity. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009; 2009:713269 doi: 10.1155/2009/713269.
 185. Skinner AC, Steiner MJ, Henderson FW, Perrin EM. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. *Pediatrics* 2010; 125: e801-e809.
 186. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-49.
 187. Doumatey AP, Zhou J, Zhou M, Prieto D, Rotimi CN, Adeyemo A. Proinflammatory and lipid biomarkers mediate metabolically healthy obesity: A proteomics study. *Obesity (Silver Spring)* 2016; 24: 1257-65.
 188. Rocha M, Bañuls C, Bellod L, Rovira-Llopis S, Morillas C, Solá E, et al. Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients. *PLoS One* 2013; 8: e78670. doi: 10.1371/journal.pone.0078670.
 189. Ottobelli Chielle E, De Souza WM, Da Silva TP, Moresco RN, Moretto MB. Adipocytokines, inflammatory and oxidative stress markers of clinical relevance altered in young overweight/obese subjects. *Clin Biochem* 2016; 49: 548-53.

190. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436: 356-62.
191. Park SE, Park CY, Sweeney G. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: past, present and future. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015; 4: 1-11.
192. Janke J, Engeli S, Boschmann M, et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006; 55: 2805-2810.
193. Goodman E, Graham TE, Dolan LM, Daniels SR, Goodman ER, Kahn BB. The relationship of retinol binding protein 4 to changes in insulin resistance and cardiometabolic risk in overweight black adolescents. *J Pediatr* 2009; 154: 67-73.
194. Yeste D, Vendrell J, Tomasini R, Gallart LL, Clemente M, Simón I, et al. Retinol-binding protein 4 levels in obese children and adolescents with glucose intolerance. *Horm Res Paediatr* 2010; 73: 335-40.
195. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol* 2011; 165: 703-11.
196. Codoñer-Franch P, Mora-Herranz A, Simó-Jordá R, Pérez-Rambla C, Boix-García L, Faus-Pérez A. Retinol-binding protein 4 levels are associated with measures of liver and renal function and oxidant/antioxidant status in obese children. *J Pediatr* 2013; 163: 593-5.
197. Codoñer-Franch P, Carrasco-Luna J, Allepuz P, Codoñer-Alejos A, Guillem V. Association of RBP4 genetic variants with childhood obesity and cardiovascular risk factors. *Pediatr Diabetes* 2016; 17: 576-583.
198. Moayeri H, Bidad K, Zadhoush S, Gholami N, Anari S. Increasing prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents (Tehran Adolescent Obesity Study). *Eur J Pediatr* 2006; 165: 813-4.
199. Bouglé D, Brouard J. Iron in child obesity. Relationships with inflammation and metabolic risk factors. *Nutrients* 2013; 5: 2222-30.
200. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011-23.
201. Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJ, Maggio M, Dixit VD, et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J* 2006; 27: 1174-81.
202. Coutinho TA, Turner ST, Peyser PA, Bielak LF, Sheedy PF 2nd, Kullo IJ. Associations of serum uric acid with markers of inflammation,

- metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. *Am J Hypertens* 2007; 20: 83-9.
203. Valle M, Martos R, Cañete MD, Valle R, Van Donkelaar EL, Bermudo F, et al. Association of serum uric acid levels to inflammation biomarkers and endothelial dysfunction in obese prepubertal children. *Pediatr Diabetes* 2015; 16: 441-7.
204. Lawlor DA, Sattar N, Smith GD, Ebrahim S. The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 1081-8.
205. Wiegand S, Thamm M, Kiess W, Körner A, Reinehr T, Krude H, et al. APV Study Group. German Competence Network Adipositas. Gamma-glutamyl transferase is strongly associated with degree of overweight and sex. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 635-8.
206. Kong AP, Choi KC, Ho CS, Chan MH, Ozaki R, Chan CW, et al. Associations of uric acid and gamma-glutamyltransferase (GGT) with obesity and components of metabolic syndrome in children and adolescents. *Pediatr Obes* 2013; 8: 351-7.
207. Labayen I, Ruiz JR, Ortega FB, Davis CL, Rodríguez G, González-Gross M, et al. Liver enzymes and clustering cardiometabolic risk factors in European adolescents: the HELENA study. *Pediatr Obes* 2015; 10: 361-70.
208. Guijarro de Armas MG, Monereo Megías S, Navea Aguilera C, Merino Viveros M, Vega Piñero MB. [Non-alcoholic fatty liver in children and adolescents with excess weight and obesity]. *Med Clin (Barc)* 2015; 144: 55-8.
209. Whitfield JB. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of disease. *Clin Chem* 2007; 53:1-2.
210. Eliakim A, Barzilai M, Wolach B, Nemet D. Should we treat elevated thyroid stimulating hormone levels in obese children and adolescents?. *Int J Pediatr Obes* 2006; 1: 217-21.
211. Lobotková D, Staníková D, Staník J, Cervenová O, Bzdúch V, Tichá L. Lack of association between peripheral activity of thyroid hormones and elevated TSH levels in childhood obesity. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2014; 6: 100-4.
212. Krause AJ, Cines B, Pogrebniak E, Sherfat-Kazemzadeh R, Demidowich AP, Galescu OA, et al. Associations between adiposity

- and indicators of thyroid status in children and adolescents. *Pediatr Obes* 2016; 11: 551-558.
213. Kaltenbach TE, Graeter T, Oeztuerk S, Holzner D, Kratzer W, Wabitsch M, et al. Thyroid dysfunction and hepatic steatosis in overweight children and adolescents. *Pediatr Obes* 2017; 12: 67-74.
 214. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
 215. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, et al. Emerging Risk Factors Collaboration C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 132-40.
 216. Meissner J, Irfan A, Twerenbold R, Mueller S, Reiter M, Haaf P, et al. Use of neutrophil count in early diagnosis and risk stratification of AMI. *Am J Med* 2011; 124: 534-42.
 217. Shah N, Parikh V, Patel N, Patel N, Badheka A, Deshmukh A, et al. Neutrophil lymphocyte ratio significantly improves the Framingham risk score in prediction of coronary heart disease mortality: insights from the National Health and Nutrition Examination Survey-III. *Int J Cardiol* 2014; 171: 390-7.
 218. Paquissi FC. The role of inflammation in cardiovascular diseases: the predictive value of neutrophil-lymphocyte ratio as a marker in peripheral arterial disease. *Ther Clin Risk Manag* 2016; 12: 851-60.
 219. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Neutrophil's weapons in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 2015; 99: 663-71.
 220. Alvarez A, Rios-Navarro C, Blanch-Ruiz MA, Collado-Diaz V, Andujar I, Martinez-Cuesta MA, et al. Abacavir induces platelet-endothelium interactions by interfering with purinergic signalling: A step from inflammation to thrombosis. *Antiviral Res* 2017 141: 179-185.
 221. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res* 2009; 105: 223-30.
 222. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, De Pablo C, et al. Human leukocyte/endothelial cell interactions and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic patients and their association with silent myocardial ischemia. *Diabetes Care* 2013; 36: 1695-702.

223. Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Rovira-Llopis S, De Marañon AM, Orden S, Alvarez A, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biol* 2016; 10: 200-205.
224. Rovira-Llopis S, Bañuls C, De Marañon AM, Diaz-Morales N, Jover A, Garzon S, et al. Low testosterone levels are related to oxidative stress, mitochondrial dysfunction and altered subclinical atherosclerotic markers in type 2 diabetic male patients. *Free Radic Biol Med* 2017; 108: 155-162.
225. Hernandez-Mijares A, Bañuls C, Rovira-Llopis S, Diaz-Morales N, Escribano-Lopez I, De Pablo C, et al. Effects of simvastatin, ezetimibe and simvastatin/ezetimibe on mitochondrial function and leukocyte/endothelial cell interactions in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 247: 40-7.
226. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, De Pablo C, Sanchez-Serrano M, et al. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3115-22.
227. Victor VM, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Martinez de Marañon A, Rios-Navarro C, et al. Insulin Resistance in PCOS Patients Enhances Oxidative Stress and Leukocyte Adhesion: Role of Myeloperoxidase. *PLoS One* 2016; 11: e0151960. doi: 10.1371/journal.pone.0151960.
228. Víctor VM, Rovira-Llopis S, Saiz-Alarcón V, Sangüesa MC, Rojo-Bofill L, Bañuls C, et al. Involvement of leucocyte/endothelial cell interactions in anorexia nervosa. *Eur J Clin Invest* 2015; 45: 670-8.
229. Rodrigues SF, Almeida-Paula LD, Granger DN. Synergistic effects of high blood cholesterol and hypertension on leukocyte and platelet recruitment in the cerebral microcirculation. *Hypertension* 2014; 63: 747-52.
230. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Porcar-Almela M, Navarro-Solera M, Arilla-Codoñer Á, Alonso-Iglesias E. Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths. *Clin Biochem* 2014; 47: 44-8.

231. Porcar-Almela M, Codoñer-Franch P, Tuzón M, Navarro-Solera M, Carrasco-Luna J, Ferrando J. Left ventricular diastolic function and cardiometabolic factors in obese normotensive children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015; 25: 108-15.
232. Reyes M, Quintanilla C, Burrows R, Blanco E, Cifuentes M, Gahagan S. Obesity is associated with acute inflammation in a sample of adolescents. *Pediatr Diabetes* 2015; 16: 109-16.
233. Ferri C, Desideri G, Valenti M, Bellini C, Pasin M, Santucci A, et al. Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension* 1999; 34: 568-73.
234. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hultén LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 166: 387-94.
235. Maggio AB, Wacker J, Montecucco F, Galan K, Pelli G, Mach F, et al. Serum resistin and inflammatory and endothelial activation markers in obese adolescents. *J Pediatr* 2012; 161: 1022-7.
236. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5: 1317-27.
237. Cottam DR, Schaefer PA, Fahmy D, Shaftan GW, Angus LD. The effect of obesity on neutrophil Fc receptors and adhesion molecules (CD16, CD11b, CD62L). *Obes Surg* 2002; 12: 230-5.
238. Mastej K, Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol* 2008; 45: 183-90.