



Cuernavaca, Morelos a 9 de junio de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **PATRICIA SOLÍS ROSALES**, con el título del trabajo: **Efecto de la dieta hipercalórica en la generación de centros germinales en órganos linfáticos asociados a mucosas.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: BIÓL. NAYELI SÁNCHEZ GUEVARA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE 1: DRA. MARISOL MÉNDEZ MARTÍNEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE 2: BIÓL. MARÍA LETICIA GARCÍA GÓMEZ

\_\_\_\_\_

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**NAYELI SANCHEZ GUEVARA** | Fecha: 2021-06-23 12:35:12 | Firmante

aae80Xt0u9Q46JLrqze8dRz5JywJj1HxYXIVgzENch4-0WuxaTHfAeTWVeE25MAsKcGvVNAkJUlocPwGvY3HMs1161aQgPmsnEb97iddDBRvrbRbpl55jeIC2kKw5t2QwsnE qQWid6spsBLNtMJPJ7b0kCMhbOQoNMOPBwzUVyZAYpu01P0gChjlcYDA1LQXzXofZLkdXVC92Tk2pdRr70y30DM0PMZHaNltpZ-YpDlvs0CPjt1cS5+C40eKhrZd5z4zvv oANI7cyxUAKSsdTxDHCL7NknZxRIBNq1+5iUSFFV06laxYORRkWNfxynmvIBNsVGSjCFQ--

**GABRIELA ROSAS SALGADO** | Fecha: 2021-06-23 12:42:39 | Firmante

IRENDORNipu+X3+exfak1Q9T3+Iq3oQ1apqTFV9HTh+9VGxxYZ3CQV28sWUdobYbQgJjcowllgnfVSVJaeNE1mGhMl5ysFT9h3cLcCaEDKvWfWAXm461pryOgg65W5dXuJI HYKmvYeps1HgOckTrqK6l3vKPltyDKwqXzCqF41c+ouoSLPvP5rF093mbt7DCX+s1VcJhtWkE8EE+uIE6mL1YZK51KmhC4EP56u0TtrB4DsqqPFLnF0L57BYNI+boPyk86Os Nc11RG256kQgChYhDez/EKlYXcNztQxRByozjWFf5gyUj4YdTV5dFNP0WswL76zdsJ3w--

**MARIA LETICIA GARCIA GOMEZ** | Fecha: 2021-06-23 13:36:23 | Firmante

ecq8QPhixvDM5jp3+5QtpL7JGMQB2siYq0unyAy+E2NE+mjp2nqsztZnkPNU+YkplBa+dAL0nTtnVqgmmvObo5Fnu+87uRd0esScOb0sA9JBeY8+YWSDFbh9sM8edn8UysCNC qT1AyqG4JIT3hclQIPTE2doavBvyeuqCnhWBPqdaQQM8Jdgr/Pf pBOyhSxe865AmeJN/13bxdXaUJfXOUdadz+HqCajAKFXfSpEkjgTw4BRzdtTA58R/yiCPIpZpCwLXLBJ4W u00VosKzrtIYkdVwbY4EckKu6ZFUFQzIPx9JTyIKhVVBKn9Ktr8FBdqHlHh6Z5TA--

**MARISOL MÉNDEZ MARTÍNEZ** | Fecha: 2021-06-23 14:46:22 | Firmante

c7w8loz1ryT9yEq8T10o1Gkif2RCa9HrW7YnTPSV0A/cyQp9VwKBPV0OpnaRDT00bCK17zd2ZrEDWgNYbOSrab2glas5jPGTf8TAsswZ6kL23TYhNPRPPIq1r6GTEpDh3qk 823eN+nZaelEvQ3nt+hKLejyqiyX8cPwvP8r3lzxMQVLax8fxC4W91NDLpYB5JdpS8IKQzrChASXuuMU/9x3CMV5XEo7g55TSHBSzH7IQ/292YE RuePo18lezmchHd0HnlMeK5 wkmqmPMWOWXHWz5AstIOGIBT254AO2uigk0Uj9pU5eUwWvsTTRxBw5Q09jCVTF5JBIA--

**JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER** | Fecha: 2021-06-24 13:52:40 | Firmante

RtHJ7fhaKcKOYxcZBqsZ2e6RIY461PQcb8CPWEW+0LsJlJn4oDeWob+gHL825IQMCT5gDVRIMq+8wnFEjdxPaARod9gCZJgAX7XmBVR0/RDX9VmyS/cmWdBC2x54rdh6 YNQA NU+EvC9b7CJMSALEm0rG/OgR85iNBuy08jY3oPhodFso9Kdp16vkX21hUqgOD+DPC87PMuaLUW/2AIIH+7TFmDEsErwgXJv61mGuEa67zXQh55dRuZTJNng+cwb3u 5T7JAcPml7bUzvgf6/WQE15+LYIT05VozjKKvbop4TzpxW75MAReBlHyJetEcx3PTupnXgW--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



JAGOai

<https://efirma.uaem.mx/no/Repudio/NKQH8BPQVjTeI70I7xNdfHty06xXoIU>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFFECTO DE LA DIETA HIPERCALÓRICA EN LA  
GENERACIÓN DE CENTROS GERMINALES EN ÓRGANOS  
LINFÁTICOS ASOCIADOS A MUCOSAS

TESIS

QUE PRESENTA:

**PATRICIA SOLIS ROSALES**

Para obtener el título de:

**BIÓLOGA**

Directora de Tesis:

**Dra. Gabriela Rosas Salgado**



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Marzo 2016

Cuernavaca Morelos

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Gabriela Rosas Salgado y asesorada las M. en C. Marisol Martinez Mendez y Celeste Trejo Moreno y financiada por el proyecto de CONACyT básico 169011

Esta Tesis contó con el apoyo técnico de la Biól. Beatriz Hernández Téllez y en bioterio del MVZ. M. en C. Gerardo Arrellín Rosas y la M.en C. Nancy Arias García. Y de los Histotecnólogos Lic. y H.T. Noemí Gelista Herrera, M.en C. Vanesa Báez Gelista y el Dr. Juan Carlos Báez Reyes. Así como el apoyo para la evaluación histopatológica del Dr. Gerardo Arrellín Rosas

## ÍNDICE

### 1. Introducción

#### 1.1 Efecto de la obesidad sobre el metabolismo.

#### 1.2 Efecto de la obesidad sobre el sistema inmune

##### 1.2.1 Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT)

##### 1.2.1.1 Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT)

##### 1.1.2.1.1 Placas de Peyer

##### 1.1.2.1.2 Nódulos Linfáticos Mesentéricos

##### 1.1.2.1.3 Centros Germinales

#### 1.3 Efecto de la obesidad sobre las poblaciones de células T reguladoras (FOXP3)

### 2. Justificación

### 3. Hipótesis

### 4. Objetivo General

### 5. Objetivos particulares

### 6. metodología

#### 6.1 Animales de experimentación

#### 6.2 Grupos experimentales

#### 6.3 Protocolo Experimental

#### 6.4 Inducción de obesidad y síndrome metabólico

#### 6.5 Medición del peso

#### 6.6 Determinación de índice de Lee

#### 6.7 Curva de tolerancia a la glucosa y curva de resistencia a la insulina

#### 6.8 Obtención de nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer, tejido adiposo visceral epididimal y tejido adiposo subcutáneo

## 6.9 Cuantificación de citocinas por ELISA de sandwich

### 6.9.1 Obtención de extractos tisulares de TAVE, TAS

### 6.9.2 Determinación de interleucinas por ELISA en sandwich

## 6.10 Inmunohistoquímica

## 6.11 Tinción de tricrómica de Massón

## 6.12 Tinción de Hematoxilina-eosina

## 6.13 Análisis estadístico

## 7. Resultados

### 7.1 La dieta hipercalórica indujo obesidad

### 7.2 La obesidad indujo resistencia a la insulina

### 7.3 La obesidad y resistencia a la insulina inducen un estado pronflamatorio en tejido adiposo

### 7.4 La obesidad y resistencia a la insulina influyen en la formación de centros germinales en Placas de Peyer y Nódulos Linfáticos Mesentericos

### 7.5 La obesidad y resistencia a la insulina influyen en la generación de daño de la mucosa intestinal

## 8. Conclusión

## 9. Perspectivas

## ABREVIACIONES

MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
NALT	Tejido linfoide asociado a nariz
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
SALT/DALT	Tejido asociado a glándulas o ductos salivales
LDALT	Tejido linfoide asociado a drenaje lacrimal
CALT	Tejido asociada a la conjuntiva
TALT	Tejido linfoide asociado a la trompa de Eustaquio
LALT	Tejido linfoide asociado a la laringe
PP	Placas de Peyer
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos (ratón)
GLM	Ganglios linfáticos mesentérico (humano)
Th	Linfocito T <i>helper</i>
Tc	Linfocito T citotóxico
ILF	Folículos linfoides aislados o solitarios
IECs	Células epiteliales intestinales
IELs	Linfocitos intraepiteliales
Treg	Células T reguladoras
NK	Células asesinas naturales (natural killer)
NKT	Linfocitos T asesinas naturales (natural killer)
nTreg	Linfocitos T reguladoras naturales
iTreg	Linfocitos T reguladoras inducidas
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón γ
IDO	Indolamina 2-3 Dioxigenasa
AR	Ácido retinoico
TAV	Tejido adiposo visceral
<i>Ad hoc</i>	Adecuado, dispuesto especialmente para un fin
Acu-Cs	Extracto acuoso de <i>Cucumis sativus</i>
ACe-rSe	Extracto acetónico de raíz de <i>Sechium edule</i>
DHC	Dieta hipercalórica
DIC	Dieta isocalórica
ANOVA	Análisis de Varianza

## 1.1 EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL METABOLISMO

La obesidad se define de acuerdo con la OMS, como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que es perjudicial para la salud (*Nota descriptiva:* Organización Mundial de la Salud., 2015) es un órgano fundamental en el mantenimiento del balance energético (Moreno et al.,2002). El tejido adiposo se encuentra distribuido a nivel dérmico, subcutáneo, mediastínico, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal, se divide en dos tipos; tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo o marrón. El tejido adiposo blanco es el mayor reservorio energético del organismo y no sólo eso, también tiene una gran importancia como productor de moléculas importantes con acción endocrina, paracrina y autocrina. En este grupo de moléculas se encuentran las implicadas en la regulación del peso corporal (leptina, Acrp30/adipoQ), relacionadas con el sistema inmune (TNF $\alpha$ , IL1, IL6), con función vascular (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), función reproductora (estrógenos) y resistencia a la insulina (resistina) entre otras (Wilcox 2005)

Estudios epidemiológicos revelan que a medida que aumenta el contenido de grasa corporal (IMC) aumenta el riesgo de diabetes y resistencia a la insulina, esto quiere decir que la grasa corporal tiene un efecto importante sobre la sensibilidad a la insulina (Bastard et al., 2006). La insulina es un regulador crítico de los adipocitos, promueve la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos, así como su maduración, estimula el transporte de glucosa, incrementa la captación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos (lipogénesis) así como su inhibición (Kahn et al., 2000).

Por otro lado, resistencia a linsulina se refiere a la sensibilidad deteriorada a la eliminación de glucosa mediada por la insulina (Wilcox 2005). Esta permite identificar el riesgo de desarrollar distintas alteraciones metabólicas que pueden llevar a otras enfermedades como diabetes, hipertensión arterial sistémica o cardiopatías (González-Chávez et al., 2011).

La obesidad puede llevar a la diabetes tipo 2, que es una enfermedad cardiovascular caracterizada por tener altos niveles de glucosa en sangre (Marja-Riitta., 2002), Ésta es una enfermedad crónica que se caracteriza por la resistencia a la insulina (E. Butler et al.,2003) y puede incidir en personas de todas las edades. La resistencia a la insulina se relaciona con estrés oxidante, dislipidemia e inflamación (Wellen et al., 2005)

## 1.2 EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE EL SISTEMA INMUNE

En los últimos años, la obesidad ha sobresalido por su prevalencia a nivel mundial, ya que afecta a más de 300 millones de personas (villa et al., 2004) y las tendencias muestran incremento y prevalencia a través del tiempo, por lo cual representa un problema de salud pública de primera magnitud, que ubica a México en los primeros lugares a nivel mundial con un 50% de la población adulta y un tercio de los niños (Sánchez et al., 2004). Recientemente se ha relacionado con un proceso inflamatorio crónico de bajo grado conocido como metainflamación (Guzman et al., 2013), en donde tanto el tejido adiposo visceral (TAV) como las distintas poblaciones de linfocitos efectores y macrófagos que lo pueblan, producen moléculas pro-inflamatorio que participa en la etiología de la respuesta inmune de la obesidad, así como en la resistencia a la insulina y el estado prooxidante que la caracterizan (Matrougui *et al*; 2011).

### 1.2.1 TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS

Una de las principales entradas de patógenos en el organismo es a nivel de mucosas en donde se encuentra un sistema complejo llamado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (IwLugtoll, 1999). Este tejido tiene diversas funciones primordiales y no solamente protege la superficie de las mucosas de los microorganismos del ambiente, sino también a nivel sistémico, ya que cuenta con una respuesta inmune especializada, que incluye tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Holmgren et al.,2005). Este tejido principalmente: a) protege las membranas de la mucosa contra la colonización y la invasión de microorganismos;

b) previene el consumo de antígenos no degradados incluyendo proteínas foráneas provenientes de los alimentos; y c) previene el desarrollo de una respuesta inmune exacerbada. Se divide morfológica y funcionalmente en dos partes principales: en tejidos linfoides inductores y en tejidos linfoides efectores. Los inductores son sitios de entrada para inmunógenos como son el tejido linfoide asociado a nariz (NALT), el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a glándulas o ductos salivales (SALT/DALT), el tejido linfoide asociado a drenaje lacrimal (LDALT), el tejido linfoide asociada a la conjuntiva (CALT), el tejido linfoide asociado a la trompa de Eustaquio (TALT) y el tejido linfoide asociado a la laringe (LALT) (IW Lugton et. al, 1999; Ramos et. al, 2008). Los efectores son células linfoides dispersas que se encuentran debajo del epitelio y es donde ocurre la interacción del antígeno con elementos efectores de la respuesta inmune. En estos tejidos se da la producción de IgAs, que son las principales inmunoglobulinas presentes en mucosas. La segunda función de los tejidos efectores es la supresión de hipersensibilidad local y periférica a sustancias inocuas en la superficie mucosal (tolerancia), esto previene daño de tejido y pérdida de energía (IW Lugton).

Los dos sitios constituyen el sistema inmune de mucosas y se unen por el mucus residente, de tal forma que las células activadas de los folículos linfoides pueden viajar hacia áreas de tejido linfoide difuso, donde pueden interactuar mejor con sus antígenos. La interacción de células y antígenos produce una respuesta humoral, celular o ambas que contribuyen a la producción de linfocitos T o a la liberación de anticuerpos que son producidos por células plasmáticas. (Rueda, *et al.*, 2009)

Dentro del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), un componente esencial es el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), ya que está expuesto constantemente con el microbioma comensal, sustancias potencialmente tóxicas y patógenos ingeridos así como también es el sitio donde se expone por primera vez el antígeno con células naive y se desarrollan células efectoras que pueden o no migrar a otros sitios (Ruth et al., 2013).

### 1.2.1.1 TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS DEL INTESTINO (GALT)

GALT es el tejido linfoide más grande del organismo, ya que mide aproximadamente 400 m<sup>2</sup> y tiene una actividad inmunológica constante que permite el desarrollo y maduración del sistema inmune sistémico (Ramiro-Puig et. al, 2008). La capa mucosal es el sitio residente tanto de organismos comensales como de potencialmente patógenos, aunado a que en él se encuentran al menos el 50% de los linfocitos T distribuidos entre la lámina propia (LP) y la capa mucosal. Por estas razones en este tejido debe existir un delicado equilibrio entre la activación y la regulación de la respuesta inmune (Ramiro-Puig et al., 2008, Ruth et al., 2013; Tomonori et al., 2013).

GALT está constituido por tejidos agregados y dispersos. Los agregados son las Placas de Peyer (PPs), los nódulos o ganglios linfoides mesentéricos (NLM) y folículos linfoides solitarios (ILF (Ramiro-Puig et. al. 2008, R. Ruth et. al 2013, Ramos et. al, 1992). Los dispersos son la lámina propia, las células epiteliales intestinales (IECs) y linfocitos intraepiteliales (IELs) (R. Ruth et. al 2013)

- **Células epiteliales intestinales (IECs):** Son una capa de células unidas y comunicadas entre sí, forman una barrera fisiológica, la membrana y los espacios celulares generalmente son impermeables a grandes moléculas. Sólo iones son capaces de pasar. Sin embargo esto no pasa en estado de inflamación o en estado perinatal ya que las uniones son menos estrechas y dejan el paso de macromoléculas hacia la lámina propia (Mayer et. al 2003, J.Sansonetti 2004, M. Hershberg et. al,2000)
- **Linfocitos intraepiteliales (IELs):** Son una población muy abundante de linfocitos inmunocompetentes muy heterogénea y la mayor parte presenta un fenotipo supresor o citotóxico CD8 $\alpha\alpha^+$  (este CD8 es característico de mucosas) que se distribuyen en toda la capa epitelial así como en todas las mucosas. Estas células actúan como centinelas y presentan un constante

fenotipo activado (típico de células efectoras/memoria) por lo que proporcionan una respuesta inmediata y muy efectiva sobre células epiteliales infectadas. Por otro lado, los IELs tienen capacidad inmunorreguladora ya que desempeñan un papel crucial en la prevención de la sensibilización a antígenos lumenales, es decir son mediadores del proceso de tolerancia oral (Ramiro-Puig *et al.* 2008).

- **Lámina Propria:** Compreendida entre el epitelio y la capa muscular de la mucosa, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T principalmente Th, y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos (estas poblaciones se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación) (Ramiro-Puig *et al.* 2008).

#### 1.1.2.1.1 PLACAS DE PEYER

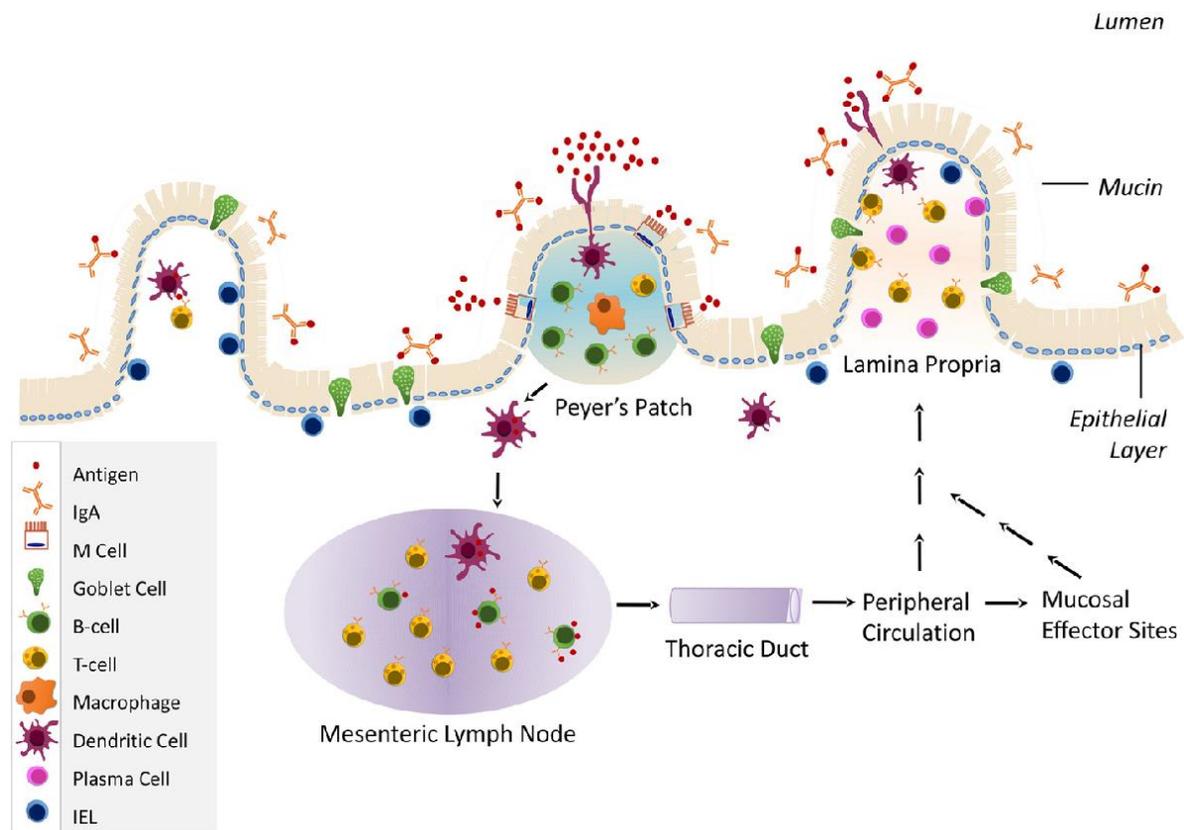
inmunológicamente son importantes por dos razones: 1) Son el sitio donde se lleva a cabo uno de los principales mecanismos de transcitosis efectuados por las células M que continuamente están muestreando el contenido intestinal, captan antígenos lumenales, lo que permite el contacto del antígeno con células de la respuesta inmune presentes en la placa como los linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas (R. Ruth *et al.* 2013).

2) Son el sitio inductor primario de la respuesta inmune humoral en mucosas, ya que es donde se lleva a cabo la activación de las células B por las TCD4. Una vez activadas las células B migran hacia los NLM donde se diferencian hacia células plasmáticas y de memoria (R. Ruth *et al.* 2013).

#### 1.1.2.1.2 NÓDULOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS

Se localizan en el mesenterio del intestino, y se organizan en: 1) corteza, donde se encuentran folículos primarios y secundarios que contienen linfocitos B y células dendríticas; 2) paracorteza, que tiene una elevada proporción de linfocitos T y células dendríticas; y 3) médula, la conforma linfocitos T, B y células plasmáticas

(Ramiro-Puig *et al.* 2008). En la corteza las células dendríticas residentes, internalizan y procesan los antígenos que llegan a través de la linfa, ya maduras migran hacia la paracorteza donde presentan el antígeno a los linfocitos T *helper* (Th) o a los linfocitos T citotóxicos, (Tc) vírgenes y de esta forma se originan células T efectoras.



(Figura 1 Diagrama del tejido linfoide asociado al intestino R. Ruth et. al 2013)

### 1.1.2.1.3 CENTROS GERMINALES

Los centro germinales se dividen en 2 compartimentos, zona oscura y la zona clara; la zona oscura está localizada próxima a las áreas de células T y contiene altas densidades de células B grandes y proliferantes con regulación a la baja expresión

de inmunoglobulinas de superficie conocida como centro blastos; la zona clara se encuentra en la zona distal donde la densidad de las células B es menor debido a la presencia de una red celular dendrítica folicular (FDC) estas células son células estromales radio resistentes con procesos largos que forman una red que ocupa gran parte de la zona de luz de CG (Hermsdorff *et. al* 2008, Wang *et al.*, 2009). Los CG se desarrollan en órganos linfoides secundarios en respuesta a la proliferación de células B por lo tanto, una sola célula B puede dar a lugar un clon que contiene variantes con diferentes afinidades por el antígeno y en su forma inactiva expresa IgM/IgD pero tras activarse pueden producir IgA, IgE, IgG Las células B son necesarias para a inducir la respuesta de los CG en particular la interacción de la familia de receptores de TNF miembro de CD40, que se expresa constitutivamente por células B y su ligando, CD40L (CD154), que se expresa por activación células TH, estas células son cruciales para la formación de CG por lo que se cree que los centros germinales dependen en gran medida de las células TH. La decisión de diferenciación de las células B están vinculadas a la migración de células B activadas en distintas regiones de los órganos linfoides secundarios por pistas ambientales por lo que se concluye que la obesidad indujo un aumento en el número de CG. Se ha reportado que la formación de centros germinales se debe a la activación y proliferación de células B para la formación de células plasmáticas productoras de anticuerpos (MacDonald *et al.*, 2005, Carbajal *et al.*, 2020) debido al mutualismo que existe entre la flora intestinal y el epitelio al reconocer de ligandos como TLR2 o TLR9 que aumentan la función de la barrera intestinal

### 1.3 EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS T REGULADORAS (FOX p3)

La obesidad es causado por interacciones entre factores genéticos predisponentes, exceso de calorías por ingesta / o poca actividad física (Matarese *et al.*,2010) asociada a una inflamación crónica caracterizada por la producción anormal de citocinas y la activación de vías de señalización inflamatorias que predominan en el tejido adiposo y en el hígado, la interacción entre adipocitos y las células del sistema

inmune vinculan el metabolismo y la inflamación. Por otro lado las células Treg es un subconjunto de células T que constituyen el 5 al 15% de las células TCD4 controlan las repuestas de las células T efectoras por lo que controlan las respuestas inmunes inapropiadas que caracterizan la autoinmunidad y alergias, esto al suprimir diferentes poblaciones de células activadas del sistema inmune como linfocitos T (CD4 y CD8), células B, células dendríticas, Células NK (natural killer), células NKT (células T natural killer) macrófagos/monocitos, mastocitos, basófilos y eosinófilos (Peterson 2012) y lo hacen a través de modulación del microambiente y receptores de superficie (Hershberg et al., 2000) (Mizrahi et. al, 2009) su comportamiento inmunomodulador se ve reducido en enfermedades autoinmunes así como en personas que presentan diabetes tipo 1 (Eller et al., 2011)

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la inflamación juega un papel preponderante para la generación de las patologías asociadas al síndrome metabólico en la obesidad, sin embargo, no se conoce bien el papel que juega el sistema inmune asociado a mucosas en esta condición. También se ha reportado que cuando hay activación de los órganos linfoides asociados a mucosas como las PP o los NLM asociados a mucosas en ellos se forman centros germinales. Ambas premisas llevan al planteamiento de la pregunta de investigación que sustenta este trabajo, que es ¿La dieta hipercalórica tiene efectos en la generación de centros germinales en los órganos linfáticos asociados a mucosas? buscando a la formación de centros germinales como una expresión de activación de los órganos linfoides por efecto de la DHC.

## 3. HIPÓTESIS

La dieta hipercalórica activa a los órganos linfoides asociados a mucosas por lo que presentan centros germinales

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en Placas de Peyer y Nódulos linfáticos mesentéricos el efecto de la dieta hipercalórica para generar centros germinales

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Inducir obesidad por efecto del consumo de una dieta hipercalórica
- 2.- Evaluar el efecto de la dieta sobre la resistencia a la insulina
- 3.-Evaluar el efecto de la resistencia a la insulina sobre la concentración de las citocinas IL10, TGF, IL6, TNF en tejido adiposo visceral, epididimal y subcútaneo
- 4.-Evaluar el efecto de la concentración de IL10, TGF, IL6, TNF sobre la formación de centros germinales en Placas de Peyer y Nódulos linfáticos mesentéricos
- 5.- Evaluar el efecto de la concentración de IL10, TGF, IL6, TNF sobre el daño en la mucosa intestinal

#### 6. METODOLOGÍA

##### 6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 con un peso de  $20g \pm 1$  que se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. Los animales se trataron con estricto apego a la norma NOM-062-ZOO-1999.

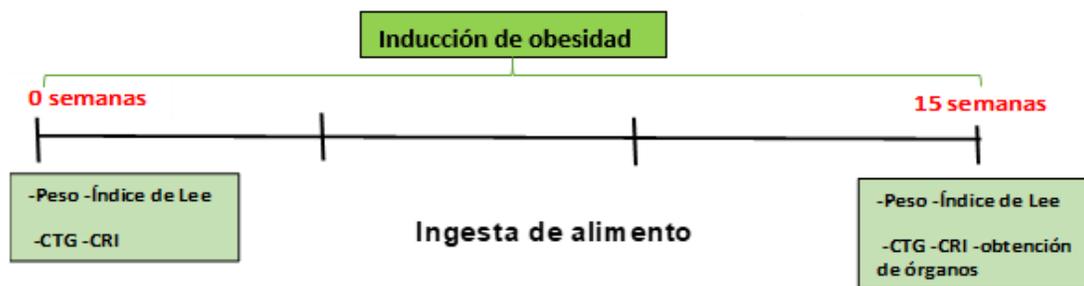
##### 6.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se realizaron 4 experimentos con una N total de 44 animales alimentados con dieta Isocalórica como control (DIC) y de 95 alimentados con dieta hipercalórica (DHC), las calorías de la dieta están distribuidas de la siguiente manera: 60% grasa (37% saturadas, 47% monosaturadas y 16% poliinsaturadas), 18.4% proteína y 21.3% carbohidratos.

### 6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El protocolo experimental comprendió 15 semanas, durante las cuales los grupos fueron mantenidos con la dieta asignada. Durante este tiempo fueron evaluados metabólicamente al inicio (semana 0) y final del experimento (15 semanas). Los ratones fueron evaluados de manera individual en cuanto a peso, índice de masa corporal (IMC); así como glicemia en ayunas lo que permitió identificar aquellos que habían desarrollado obesidad y resistencia a la insulina.

En este momento los ratones de cada grupo fueron sacrificados para la obtención de órganos (PP, NLM, TAVE, TAS).



**Figura 2**

### 6.4 INDUCCIÓN DE OBESIDAD

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6/J con un peso de  $20g \pm 1$  y se alimentaron con una dieta hipercalórica (DHC) (Harlan TD.06414 AdjustedCaloriesDiet (60/Fat) de manera crónica y están distribuidas de la siguiente manera: 60% grasa (37% saturadas, 47% monosaturadas y 16% poliinsaturadas), 18.4% proteína y 21.3% carbohidratos ó una dieta isocalórica (DIC) con 5.3% de lípidos, 12% humedad, 5.7% minerales ceniza, 4.2% fibra, 22% proteína, 50.8% carbohidratos. A las 15 semanas los ratones fueron clasificados de acuerdo a los parámetros físicos y químicos que modificaron, con la intención de saber qué patologías del síndrome metabólico presentaron.

## 6.5 MEDICIÓN DEL PESO

Los ratones fueron pesados al inicio de la administración de ambas dietas (semana 0) y al final del experimento (15 semanas)

## 6.6 DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE LEE

Una vez pesados los ratones, se midieron las longitudes naso-anales para calcular el índice de Lee mediante la siguiente fórmula: Índice de obesidad de Lee= peso (g) x 0.33/ longitud naso-anal (cm)<sup>2</sup>. En los mismos tiempos mencionados.

## 6.7 CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y CURVA DE RESISTENCIA A LA INSULINA

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó con previo ayuno y se tomó una muestra inicial que fue la medición basal, y posteriormente se administró oralmente una solución de glucosa con una concentración de 2g/Kg de peso del ratón. Se tomó muestras de sangre cada 30 minutos hasta los 120 minutos. Para la curva de resistencia a la insulina se tomó la primera medición sin ayuno previo, esto como medición basal y después se administró vía intraperitoneal insulina con PBS a una concentración 1 µl/mg, de igual manera se tomó una muestra cada 30 minutos hasta los 120 minutos. Las determinaciones se hicieron con un glucómetro de marca Accu-chek Performance de Roche.

## 6.8 OBTENCIÓN DE NÓDULOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS, PLACAS DE PEYER, TEJIDO ADIPOSO VISCERAL EPIDIDIMAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO

Una vez que los ratones cumplieron 15 semanas de ingesta de la DHC, 5 ratones de cada condición, DIC o DHC, fueron anestesiados con xilacina (30 µl) vía intraperitoneal y una vez inconsciente se perfundió con PBS frío (140mM NaCl, 2mM de KCl y 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) después se obtuvieron las PP y NLM y fueron colocadas en PBS frío (4 °C) y se prepararon para técnica histológica en parafina. Por otro lado se realizó la disección tejido adiposo subcutáneo (TAS) y tejido adiposo visceral

epididimal (TAVE) y una vez aislados los órganos (TAS y TAVE), fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior evaluación.

## 6.9 CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS POR ELISA DE SANDWICH

### 6.9.1 Obtención de extractos tisulares de TAS, TAVE

Los órganos se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  por dos horas. Se pulverizaron de manera individual y se les adicionó PBS 0-1% de PMFS (Phenylmetanesulfonyl fluoride) (Sigma Aldrich P7626) (inhibidor de proteasas de serina) en isopropanol en una proporción 1:5. La suspensión se homogeneizó con un homogenizador (DragonLab (WT130) se centrifugó a 3500 rpm durante 8 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se alícuoteó (200  $\mu\text{l}$ , para cada citocina) y congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (máximo 8 días). Al sobrenadante se le cuantificaron proteínas por medio del método de Bradford.

### 6.9.2 Determinación de interleucinas por ELISA en sándwich

En los extractos tisulares se determinó la concentración de las citocinas: IL-10, TGF- $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  utilizando los kits: IL-10 BD OptEIA ELISA Kit, Mouse IL-6 BD OptEIA ELISA Kit y Mouse TGF- $\beta$  de pharmingen y Mouse TNF- $\alpha$  de pharmingen siguiendo las instrucciones del reactivo, brevemente: las placas de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100  $\mu\text{l}$  por pozo de anticuerpo de captura diluido en buffer de fosfatos de sodio 0.2 M pH 6.5 a una concentración de 1:250 para IL-10; 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para TGF- $\beta$ ; 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para IL-6; y 1:200 para TNF $\alpha$  y se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%, posteriormente se incubaron con PBS-SFB 10% durante una hora y, pasado este tiempo se realizaron otros 3 lavados. Después de los lavados, se adicionaron por pozo 100  $\mu\text{l}$  de muestra o de la solución idónea de la interleucina correspondiente para la realización de la curva estándar, y se incubó durante 2 horas a TA. Posteriormente la placa fue lavada nuevamente y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  por pozo de una concentración 1:250 del anticuerpo de detección correspondiente en PBS-SFB

10% más la enzima HRP (1:250) y se incubó durante 1 hora, pasado ese tiempo se lavó nuevamente. La lectura de densidad óptica se realizó en un lector de ELISA marca VersaMax (Molecular Device) a 405 nm, después de 10 - 30 minutos de incubación con el substrato TMB y su posterior paro de reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.

#### 6.10 INMUNOHISTOQUIMICA

Una vez obtenidos los órganos se fijaron en Samboni (2.0% formaldehído, 0.2% ácido pícrico, pH 7.0) durante tres días y se procesaron para técnica histológica realizada en parafina y se realizaron cortes de 6 micras. Los cortes se calentaron por 15 minutos en la estufa a una temperatura de 65 °C, se pasaron por el tren de alcoholes (xilol 1, xilol 2; 5 min cada uno, alcohol absoluto 1, alcohol absoluto 2; por 3 minutos cada uno, alcohol 90%, alcohol 80%, alcohol 70% lavados cada uno) para desparafinar e hidratar, para despertar el antígeno, en una jarra coplin se colocaron en buffer de citratos 10 mM (pH 6.0) y posteriormente se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol para eliminar la peroxidasa endógena por 20 minutos. Los cortes se lavaron con el buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), y se bloquearon con el sistema "carrier protein" (Dako LSAB kit, Dako A/S, Glostrup, Denmark) por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se incubaron con anti FOXP3 (rat anti-mouse) toda la noche a 4 °C. Se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó otro lavado y se reveló con DAB que se contra teñirán con Hematoxilina.

#### 6.11 TINCIÓN DE TRICROMICA DE MASSÓN

Las muestras se cortaron en secciones de unas 6 micras de grosor y adheridas al portaobjetos con la técnica histológica de parafina. La muestra se pasó por el tren alcoholes para desparafinar y rehidratar el tejido (xilol, alcohol al 100% 10 minutos, alcohol al 96% 10 minutos, alcohol al 80% 10 minutos, alcohol al 50% 10 minutos y finalmente agua destilada por 5 minutos). Para diferenciar los núcleos de la célula se agregó Hematoxilina férrica de Weigert (concentración?) que se dejó por 5

minutos, para enjuagar el excedente se pasó por agua corriente por otros 5 minutos y 3 minutos en agua destilada; el siguiente paso fue teñir el citoplasma de las células, para lo cual se agregó el colorante fucsina-escarlata a una concentración de ..... por 5 minutos, para quitar el exceso, se hizo un lavado de 2 minutos en agua destilada. Posteriormente se dejó la laminilla en ácido fosfomolibdico al 5% con agua destilada por 15 minutos, pasado ese tiempo las preparaciones se incubaron con colorante verde luz al 2 %, se dejó por 10 minutos y se pasó por unos segundos en agua destilada; para la diferenciación de colores se agregó ácido acético al 1% en agua destilada durante 3 minutos. El deshidratado fue rápido en el tren de alcoholes (unos segundos por cada parada) en alcohol de graduación creciente: 80%, 96%, 100% y 10 min en xilol, finalmente se montó con resina.

#### 6.12 TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Las muestras se cortaron en secciones de unas 6 micras de grosor y adheridas al portaobjetos con la técnica histológica de parafina. Para desparafinar se pasó por el tren de alcoholes (xilol, alcohol al 100%, alcohol al 96%, alcohol al 80% y alcohol al 50%) 10 minutos en cada parada respectivamente, para que la laminilla no se secase se dejó 5 minutos en agua destilada; el siguiente paso fue agregar la Hematoxilina de Mayer y se dejó 10 minutos, después por 15 minutos se pasó por agua corriente, para quitar el excedente; y para que la muestra no se deshidrate se dejó por 1 minuto en agua en agua destilada, esto nos ayudó en la diferenciación de colorantes; se dejó por 2 minutos en Eosina al 0.2 % en agua. Para deshidratar la muestra se pasa por el tren de alcoholes, sólo por algunos segundos en cada parada (70% de alcohol, 96% de alcohol, 100% de alcohol, xilol). El montado final de la muestra es con resina.

#### 6.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

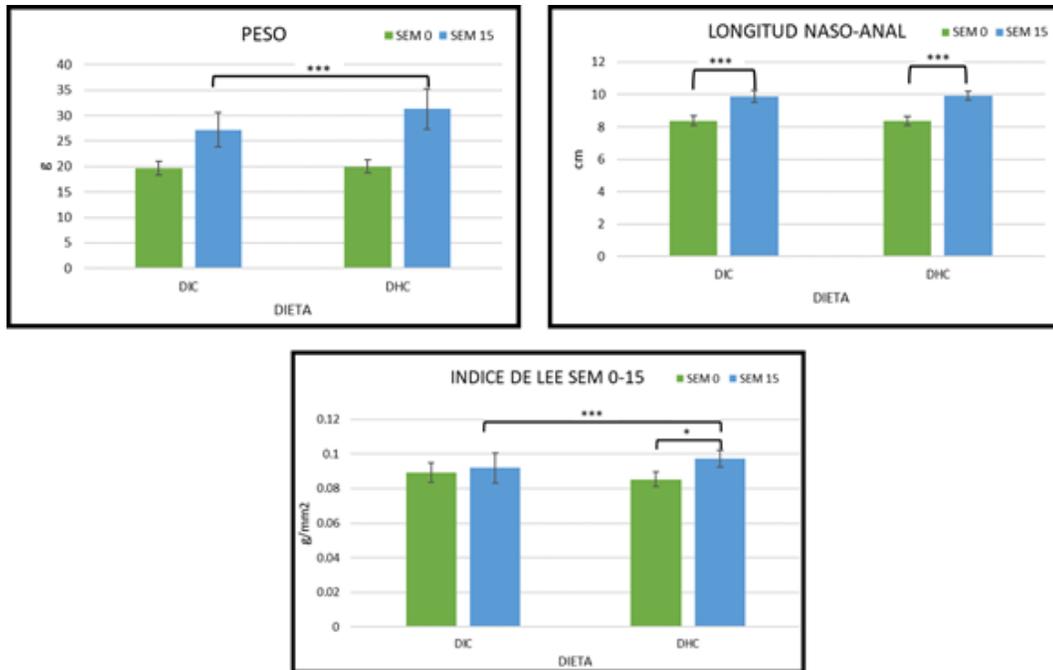
Los datos serán recopilados en una base de datos de Excel y posteriormente serán sometidos a un análisis con el software INSTAT, determinando la significancia de la

diferencia entre los grupos a través de un análisis de varianza (ANOVA) con una  $P \leq 0.05$  y una prueba posterior de Turker-Kramer.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 LA DIETA HIPERCALÓRICA INDUCE OBESIDAD

Con la intención de conocer el efecto de la obesidad en el sistema inmune de mucosas, se indujo esta condición en ratones a través de la ingesta de una dieta hipercalórica durante 15 semanas. El índice de Lee fue el parámetro utilizado como referencia de este indicador, y se calcula a través de la relación de la longitud naso-anal con el peso. Ambas medidas se tomaron al inicio del experimento (tiempo 0) y al final (semana 15). En la figura 3 se observa que, a lo largo del tiempo experimental, tanto los ratones alimentados con DIC como DHC incrementaron su peso, sin embargo, sólo fue significativo ( $P < 0.05$ ) en el grupo alimentado con DHC. El incremento de este grupo fue de 56.26% con respecto al peso registrado en la semana 0. En la figura 3B se observa que la dieta no afectó el crecimiento del ratón, por lo que no hubo diferencia significativa en la longitud naso-anal de los ratones alimentados con la DIC o DHC a las 15 semanas. Con respecto al Índice de Lee (figura 3C), que es el parámetro realmente eficiente para determinar obesidad, a las 15 semanas se observa incremento significativo ( $P < 0.05$ ) tanto con respecto al tiempo 0 de los ratones alimentados con DHC (8.52%) como a las 15 semanas de los ratones alimentados con DIC (1.69%). Estos resultados indican que la DHC administradas por 15 semanas les indujo obesidad a los ratones.

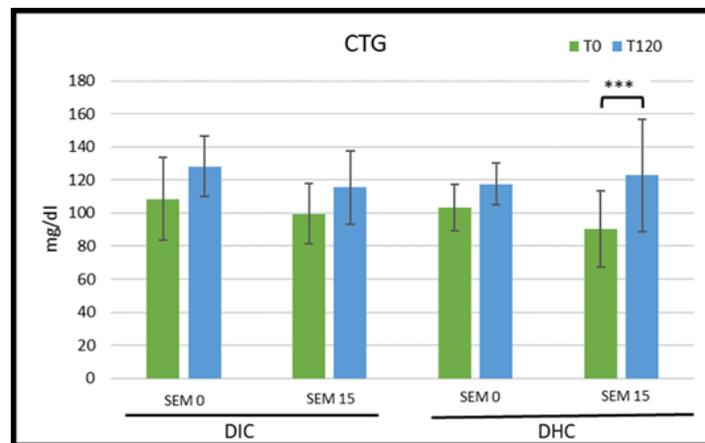


**Figura 3. Efecto de las dietas en el PESO, LONGITUD NASO-ANAL E ÍNDICE DE LEE.** Los ratones fueron sometidos a una dieta isocalórica (DIC) o hipercalórica (DHC) durante 15 semanas. A) Peso; B) Longitud naso-anal; C) Índice de Lee. El análisis estadístico se realizó con la prueba (ANOVA) con una  $P < 0.05$  que se consideró significativa.

## 7.2 LA OBESIDAD INDUJO RESISTENCIA A LA INSULINA

Se ha reportado que, por lo general, la obesidad induce problemas metabólicos asociados al metabolismo de la glucosa como la resistencia a la insulina (B. Kahn et al., 2000). Con la intención de evaluar si la obesidad inducida por la DHC indujo esta patología en los ratones, se realizó una curva de intolerancia a la glucosa. Para lo cual se dejaron a los ratones en ayuno por 12 horas, se les administró la glucosa y se midió la glucemia cada 30 minutos, siendo la inicial (min 0) antes de la administración de la glucosa. Para poder comparar la condición de los ratones al inicio y al final de los experimentos, este experimento se realizó tanto a la semana experimental 0 y a la 15.

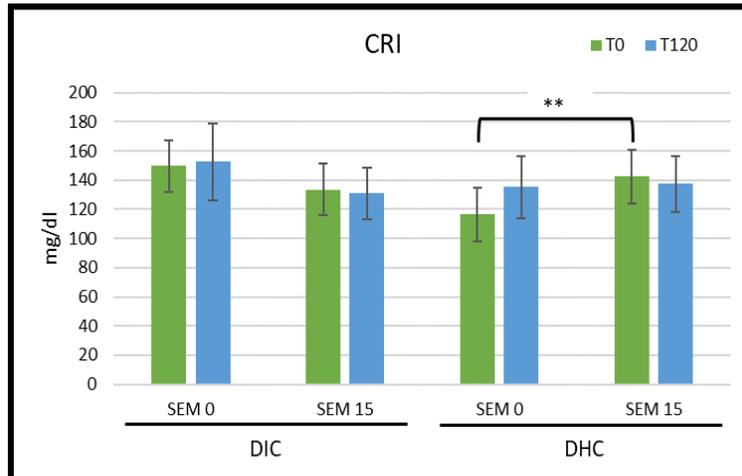
En la figura 4 se observa que en los ratones DIC no hay diferencia significativa entre su glucosa en ayunas (min 0) y la posprandial (min 120) de las curvas de tolerancia a la glucosa ni en la semana 0 ni en la 15, lo que indica un correcto manejo metabólico de la glucosa-insulina. Por otro lado, los ratones alimentados con DHC no presentan diferencias significativas a la semana 0, sin embargo, después de 15 semanas del consumo de la dieta, son incapaces de recuperar los valores iniciales de glicemia, por lo que hay diferencia significativa  $P < 0.05$  del 35.89% entre el tiempo 0 y 120 a las 15 semanas. Esto indica que los ratones desarrollaron intolerancia a la glucosa o hiperglicemia asociado a la resistencia a la insulina



**Figura 4. Curva de tolerancia a la glucosa.** Fueron evaluados 44 ratones para DIC y 95 para DHC a las 0 y 15 semanas. El promedio total de la curva en el tiempo cero (T0) y tiempo 120 (T120) comparando la semana 0 con la 15. En la barra verde están los valores obtenidos al tiempo 0 donde se toma el valor inicial y en azul el comportamiento al tiempo 120.

Para evaluar la resistencia a la insulina de manera más directa, a los ratones se les midió la glucemia, se les administró insulina sin ayuno previo y se repitió la medición cada 30 minutos hasta los 120. Con estos valores se construyó una curva de resistencia a la insulina por ratón y se promediaron las áreas bajo la curva de los ratones pertenecientes a cada grupo. En la figura 5 se observa que los ratones con

DIC no presentan diferencias significativas entre las 0 y 15 semanas, mientras que el grupo DHC, a la semana 15 muestra un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) del 3.5% con respecto a las CRI del inicio del experimento (sem 0). Estos resultados, aunados a los anteriores indican que la DHC les indujo a los ratones resistencia a la insulina.



**Figura 5. Curva de resistencia a la insulina.** En la figura se puede observar en las barras color verde la DIC al T0 y T120 y en color azul la DHC respectivamente

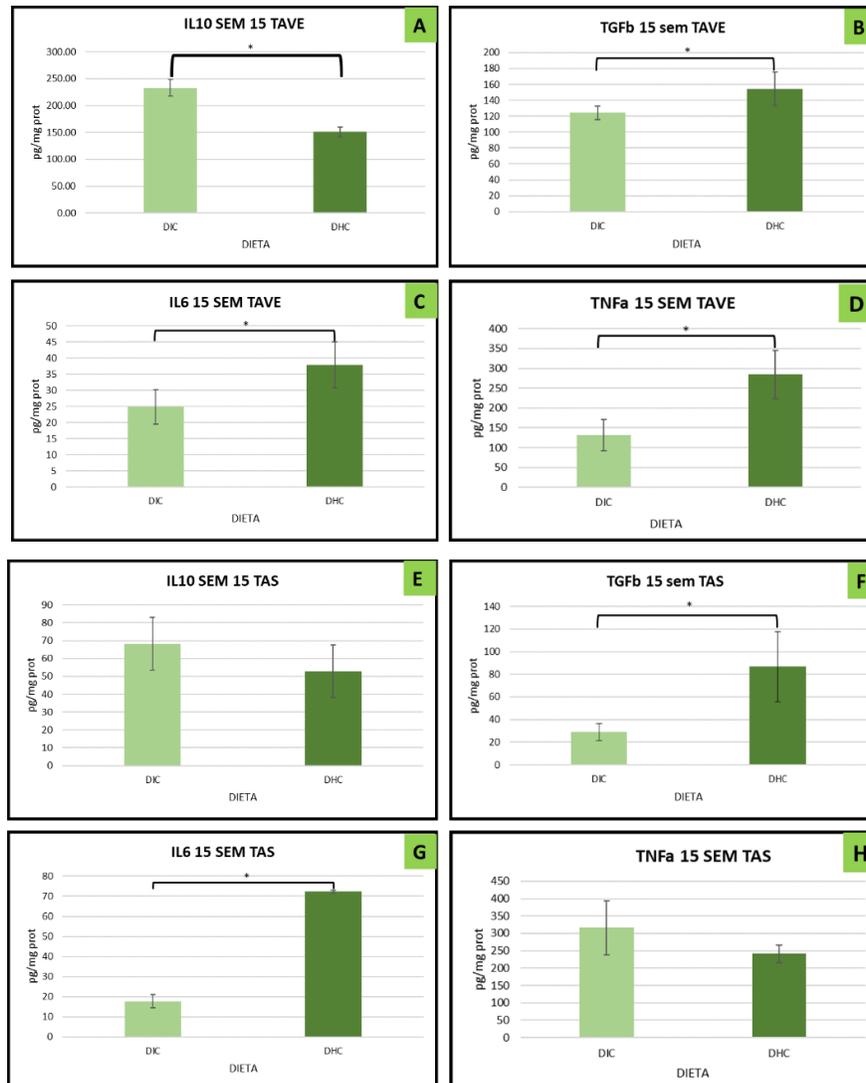
### 7.3 LA OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCEN UN ESTADO PROINFLAMATORIO EN TEJIDO ADIPOSO

Con la intención de hacer un acercamiento a la condición inmunológica inducida en los ratones mantenidos bajo las diferentes dietas, se cuantificó en extractos de TAVE y TAS la concentración de citocinas inflamatorias (IL6 y  $TNF\alpha$ ) como no-inflamatorias (IL10 y  $TGF\beta$ ) por ELISA en sándwich.

En la figura 6 se observan las gráficas de las concentraciones de citocinas, correspondientes a TAVE (paneles A, B, C, D) y a TAS (E, F, G, H). De las citocinas proinflamatorias, la IL6 (C y G) incrementa significativamente ( $P < 0.05$ ) en ambos tejidos mientras que el  $TNF\alpha$  (D y H) solo incrementa significativamente ( $P < 0.05$ ) en TAVE (panel D). Por otro lado, de las no-inflamatorias, IL10 (A y E) sólo

disminuye significativamente ( $P < 0.05$ ) en TAVE (A) mientras que  $TGF\beta$  (B y F) aumenta significativamente ( $P < 0.05$ ) en ambos.

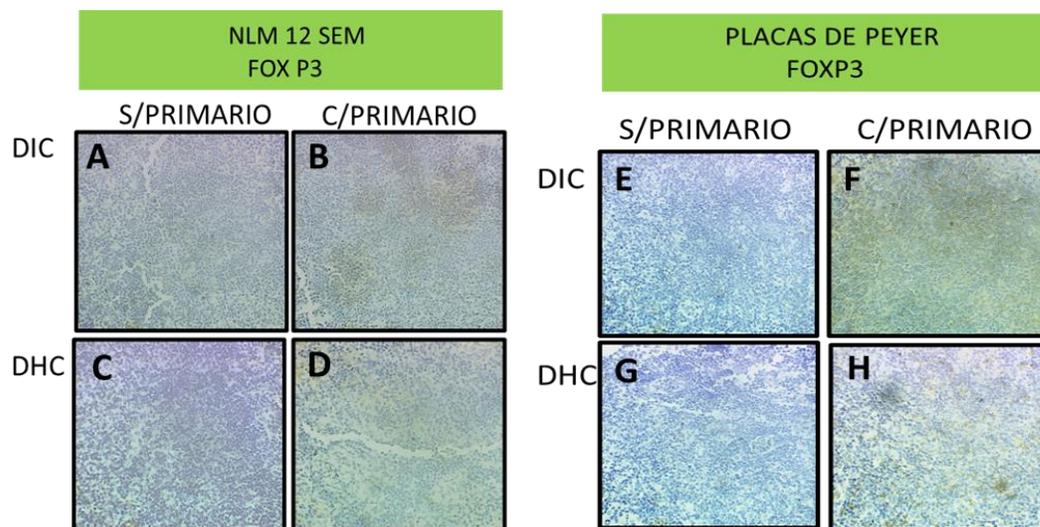
Las concentraciones de las citocinas evaluadas en los tejidos adiposos indican un perfil inmunológico tendiente hacia un estado proinflamatorio provocado por la dieta.



**FIGURA 6. CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y NO-INFLAMATORIA EN TEJIDO ADIPOSITO VISCERAL EPIDIDIMAL (TAVE) Y TEJIDO ADIPOSITO SUBCUTÁNEO (TAS) EN RATONES ALIMENTADOS POR 15 SEMANAS CON DIC Ó DIC. En el eje de las X de las gráficas están las dietas (DIC, DHC) y en eje de las Y la concentración de las interleucinas**

Con la intención de conocer cómo influyen las adipocinas sobre los tejidos asociados a mucosas en la diferenciación hacia células T efectoras, se hizo evidente

por inmunohistoquímica la expresión de FOXP3, que es el factor de transcripción encargado de la diferenciación de células T hacia células reguladoras (Shohei Hori et. al, 2003). En la figura 7 los paneles A-D corresponden a los NLM y los paneles E-H a las PP. En los órganos provenientes de los animales mantenidos con la DHC (panel C, D, G, H) se observa una disminución de la marca de detección de este factor de transcripción. Esto indica de una manera no cuantitativa la disminución de la diferenciación de CT hacia T reguladoras, lo que secunda el ambiente proinflamatorio detectado por la concentración de citocinas en tejido adiposo.



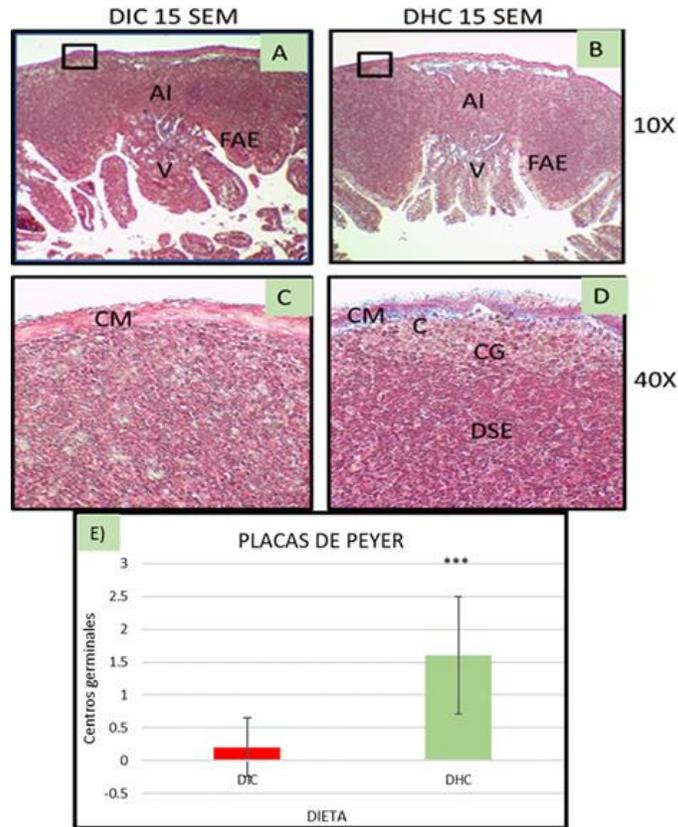
**FIGURA 7. INMUNOHISTOQUIMICA ANTI-FOX P3 EN RATONES ALIMENTADOS POR 15 SEMANAS CON DIC Ó DHC EN NLM Y PP**

#### **7.4 LA OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE CENTROS GERMINALES EN PLACAS DE PEYER Y NLM**

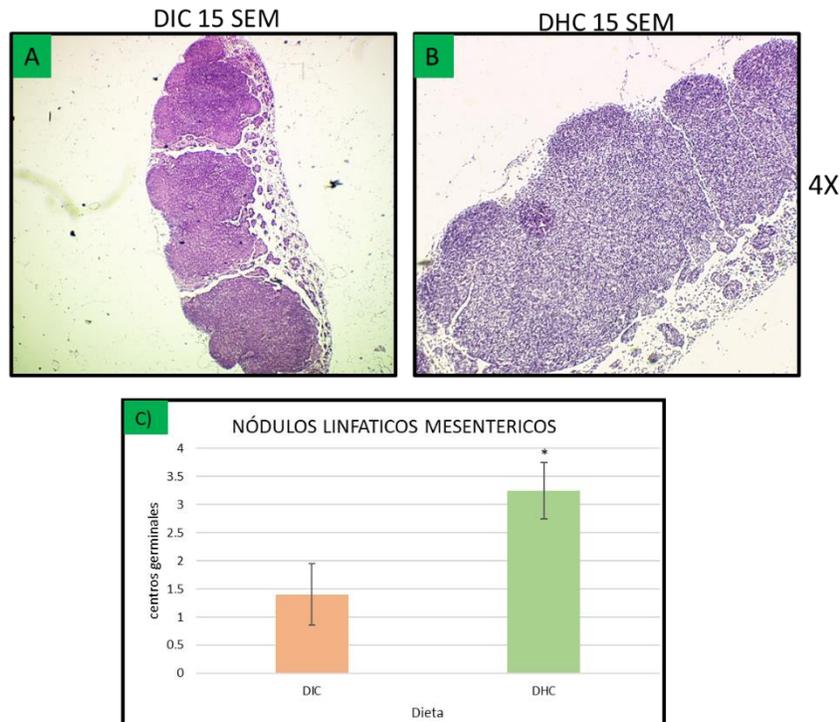
La formación de centros germinales en los órganos linfoides es una forma en que se puede manifestar el estado de activación del sistema inmune (A. M. Magnuson et. al 2007). Con la intención de analizar cómo influye la metainflamación asociada a la obesidad y a la resistencia a la insulina en la formación de centros germinales

en órganos linfoides asociados a mucosas, a las quince semanas de administración de las dietas se sacrificaron 5 ratones de cada grupo y se analizó por HE (hematoxilina eosina) y Tricrómica de Masson la presencia de estas estructuras. En la figura 8 se muestran micrográficas representativas de las PP de los animales alimentados con ambas dietas en donde A y C corresponden a la DIC; B y D la DHC. En los paneles B y D se observa la presencia de CG caracterizados por una zona clara apical (panel B), que contiene mayor cantidad de células reticulares con citoplasma acidófilo y una zona oscura de posición basal (DSE) formada por abundantes linfocitos voluminosos muy agrupados. También se observa en las PPDHC (paneles B y D) mayor acumulación de colágena (marcas azules) en comparación con PPDIC (paneles A y C), indicando un estado inflamatorio; así como mayor celularidad de las cuales no se observan en las PPDIC. En la figura 7 se observa que, el número de CG aumenta significativamente ( $P < 0.05$ ) por efecto de la condición que induce la DHC.

Por otro lado, los NLM presentan el mismo comportamiento que las PP siendo los provenientes de los animales con DHC (Fig 8) los que presentan actividad y un mayor número de centros germinales, sin embargo, aunque se ve un claro crecimiento celular (zona oscura) las células B no se están diferenciado hacia plasmoblastos, que son las principales células que conforman la zona clara (Turner et.,al). El panel C se muestra la gráfica de los números de centros germinales cuantificadas en los animales de ambas dietas donde se puede ver una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en los NLMDHC respecto a los NLMDIC.



**FIGURA 8. TINCIÓN TRICRÓMICO DE MASSON EN PLACAS DE PEYER A 10X Y 40X.** FAE: Folículo asociado al epitelio; CG: Centro germinal; C: Colágena; DSE: Domo subepitelial; CM: Capa muscular; Área interfollicular (AI); Vellosidades (V). **PLACAS DE PEYER DE RATONES ALIMENTADOS DURANTE 15 SEMANAS CON DIC Ó CON DHC.** Número de PP cuantificadas en los animales alimentadas con las diferentes dietas. El análisis estadístico se realizó con la prueba (ANOVA) con una  $P < 0.05$  que se consideró significativa.

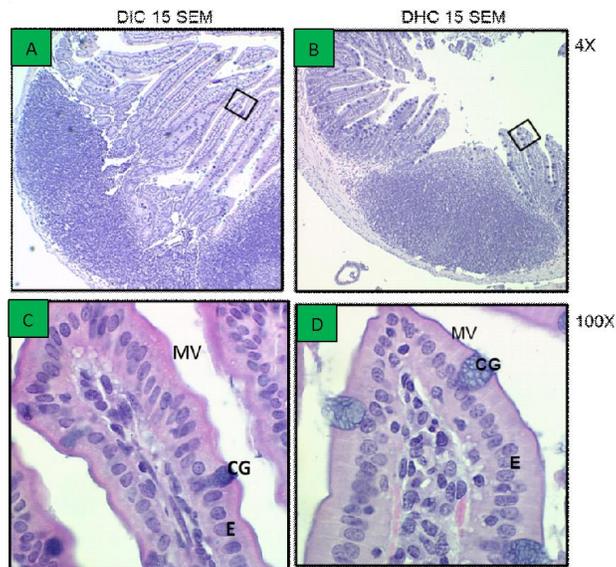


**FIGURA 9. CENTROS GERMINALES EN NÓDULOS LINFÁTICOS MESENTERÍCOS DE RATONES ALIMENTADOS DURANTE 15 SEMANAS CON DIC Ó CON DHC.** A) y B) micrografías a 4x de NLMDIC y NLMDHC respectivamente teñidas con HE. C) Número de NLM cuantificadas en los animales alimentadas con las diferentes dietas. Se realizó el análisis estadístico con la prueba (ANOVA) con una  $P < 0.05$  que se consideró significativo.

### 7.5 LA OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA INSULINA INFLUYEN EN LA GENERACIÓN DE DAÑO DE LA MUCOSA INTESTINAL.

Se ha reportado que la condición inducida en la mucosa intestinal por el consumo constante de una DHC perjudica su condición (Winer et al.,2016). Las estructuras histológicas que se pueden usar como marcadores de este daño sería el ancho de las vellosidades intestinales y el tamaño y activación de las células Goblet (cG) (Lecomte et al.,2015)

De una manera no cuantitativa, se observó en los cortes histológicos de los intestinos de los animales alimentados con ambas dietas, la condición de las vellosidades y de las células Goblet , y se hizo evidente que hay una disminución de vellosidades y aumento en el crecimiento de las cG (figura 10). En esta misma figura se observan micrografías de cortes transversales de intestino delgado de ratones alimentados por 15 semanas con una dieta isocalórica o hipercalórica teñidas con hematoxilina-eosina a 4x y 100x. Se puede ver en los paneles A y B una diferencia clara en el tamaño tanto de las vellosidades como de los CG. Incluso en el panel D se observa la secreción de mucina (Lecomte et al.,2015).



**FIG 10. CÉLULAS GOBLET DE RATONES ALIMENTADOS DURANTE 15 SEM. CON DIC Ó DHC A 4X Y 100X. CG: células Goblet; E: enterocitos; MG: Microvellocidades**

## 8. Discusión

Los resultados indican que al alimentar a los ratones durante 15 semanas con DHC se indujeron las condiciones esperadas de obesidad y resistencia a la insulina, condición requerida para responder la pregunta de investigación planteada en este trabajo. Una consecuencia de la obesidad es el estado proinflamatorio de bajo grado o metainflamación que se mantiene constante en el organismo (Cipolleta *et al.*, 2011; Eller *et al.*, 2011, Guzman *et al.*,2013, Manabe, 2011; Yang *et al.*,2012), lo que se vio que se relaciona con el aumento significativo de CG en PP y NLM (figura 8 y 9) que nosotros atribuimos a la respuesta a la condición proinflamatoria. Este estado se observó, por un lado, a través de la concentración de citocinas clave como IL6, TNFa, IL10 y TGFb producidas por los tejidos fuente TAVE y TAS (figura 6) (Moore, K. W. *et. al* 2001, J J Letterio, *et. al* 1998) y por otro, por la disminución de la expresión de FOXP3 en PP y NLM (figura 7). Con base en las concentraciones de citocinas medidas en TAVE y TAS, se puede decir que TAVE presenta una condición más inflamatoria que TAS, ya que este resultado coincide con lo reportado por Ulrich Kintscher y colaboradores donde reportan el rol crítico que juega TAVE en la inflamación crónica así como la patogénesis de la resistencia a la insulina. Por otro lado, en los órganos linfoides asociados a mucosas se observó la disminución de FOXP3 que es un indicador de que no se están formando células Treg por lo que el ambiente inmunológico tiende hacia un estado proinflamatorio (Matarese *et al.*,2010)(Eller *et al.*, 2011).

Se ha reportado que un agente importante para modificar el estado inmunológico del organismo es la flora intestinal (Hrncir *et al.*,2008) que se modifica con gran facilidad por efecto de la dieta (Jian Shen *et al.*, 2013). Cuando la alimentación es hipercalórica se tiende al crecimiento de bacterias proinflamatorias que apoyan en gran manera a la condición local y sistémica además de aumentar la permeabilidad de las células endoteliales intestinales, estos factores contribuyen a mantener los CG (Shen *et al.*,2013) (Castro *et al.*,2015).

## Conclusión

La dieta hipercalórica activa a los órganos linfoides asociados a mucosas por lo que presentan centros germinales

## 9. Perspectivas

- 1.-Conocer el efecto de la DHC sobre los principales phyla inducidos por la DHC utilizada.
- 2.- Analizar a mayor profundidad el efecto de la DHC sobre la histopatología de la mucosa intestinal PP y NLM
- 3.-Por medio de IHQ conocer el efecto de la DHC sobre la relación de la expresión de interleucinas y las células que las producen tanto en el intestino como en PP y NLM

## Bibliografía

lwLugton 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria 77, 364-372.

Ramos Ligonio Angel, Guapillo Vargas Mario Robert B, López Monteón Aracely. La inmunología de las mucosas volumen 2, Agosto 2008

Holmgren J. and Czerkinsky C., 2005. Mucosal immunity and vaccines, nature medicine supplement, volumen 1, number 4, april 2005.

Rueda Ríos Cesar Mauricio, Velilla Hernandez Paula Andrea, Rugeles López Maria Teresa. Células T reguladoras naturales durante la infección por VIH: el tejido como blanco primario de la replicación viral. Octubre 2009

Megan R. Ruth, J. Field Catherine. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue, 2013.

Ramiro-Puig E<sup>1</sup>, Pérez-Cano FJ, Ramos-Romero S, Pérez-Berezo T, Castellote C, Permanyer J, Franch A, Izquierdo-Pulido M, Castell M. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. August 2008.

Tomonori Nochi, W. Denton Paul, Wahl Angela, J. Victor Garcia. Cryptopatches are essential for the development of human GALT. 2013.

Mizrahi et. al, 2009 Nature Rev Immunol, 4:699-710.

Mayer Lloyd 2003. Mucosal Immunity vol. 111 No. 6

Hershberg Robert M, Mayer Lloyd Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. Volume 21, Issue 3, p123-128, 1 March 2000.

Haverson K., Bailey M. Stokes C.R. T-cell populations in the pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics. 96: 66-73, 1999

Chirido G. Fernando, Millington R. Owain, Beacock-Sharp Helen, Mcl. Mowat. Immunomodulatory dendritic cell in intestinal lamina propria. 35: 1831-1840, 2005

Buckland Matthew, Lombardi Giovanna Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cell. Vol. 188, p.197-213 2009.

Moore CE, Paul J, Foster D. Mahar SA, Griffiths D, Knox K, Peto TE, Walker AS, Crook DW. Reduction of invasive pneumococcal disease 3 years after the introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the Oxfordshire region of England. Oct. 2014

Guzmán-Flores Juan Manuel y Portales-Pérez Diana Patricia. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). 149:630-8, 2003.

Wu BY<sup>1</sup>, Wang YY, Li J, Song Z, Huang JD, Wang XS, Chen Q. An optical biosensor for kinetic analysis of soluble Interleukin-1 receptor I binding to immobilized Interleukin-1 $\alpha$ . Jan 2006.

Kassan M<sup>1</sup>, Galan M, Partyka M, Trebak M, Matrougui K. Interleukin-10 released by CD4(+)CD25(+) natural regulatory T cells improves microvascular endothelial function through inhibition of NADPH oxidase activity in hypertensive mice. Nov. 2011.

Villa Antonio R., Michelle H. Escobedo, Nahum Méndez-Sánchez. Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. Vol.140, 2004.

Sánchez-Castillo Claudia P., Pichardo-Ontiveros Edgar, López-R. Patricia. Epidemiología de la obesidad.

*Nota descriptiva:* Organización Mundial de la Salud. 2015

Matrougui K, AbdElmageed Z, Kassan M, Choi S, Nair D, Gonzalez-Villalobos RA, Chentoufi AA, Kadowitz P, Belmadani S, Partyka M. Natural regulatory T cells control coronary arteriolar endothelial dysfunction in hypertensive mice. 2011.

Ordóñez P<sup>1</sup>, Moreno M, Alonso A, Fernández R, Díaz F, González C. Insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats treated with different doses of 17beta-oestradiol or progesterone. Oct 2006.

Sainio K<sup>1</sup>, Suvanto P, Davies J, Wartiovaara J, Wartiovaara K, Saarma M, Arumäe U, Meng X, Lindahl M, Pachnis V, Sariola H. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. Oct 1997.

Mi-Kyung P, Jin-Sil P, Mi-La Cho, et al., 2011. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) differentially regulates Foxp3<sup>+</sup> regulatory and IL-17<sup>+</sup> pathogenic T cell in autoimmune arthritis. *Immunology letters* 135: 50-58.

Wong CP, Nguyen LP, Noh SK, et al., Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett.* 2011 Sep 30;139(1-2):7-13.

Xiang L, Marshall GD Jr. Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Neuroimmunomodulation.* 2011;18(1):1-10.

Deiuliis J., Shah Z., Shah N., Needleman B., Mikami D., Narula V., Perry K., Hazey J., Kampfrath T., Kollengode M., Sun Q., Satoskar A.R., Lumeng C., Moffatt-Bruce S., Rajagopalan S., 2011. Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers. *PLoS ONE* 6(1): e16376.

Buckland M, Lombardi G. Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cells. *HandbExpPharmacol.* 2009;(188):197-213.

Cipolleta D., Kolodin D., Benoist C. y Mathis D., 2011, Tissue-resident Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells that impact organismal metabolism, *Semin Immunol.*

Lee JK, Murakami A, Watanabe S, Ohigashi H. 2009. Suppressive properties of extracts from Japanese edible plants regarding nitric oxide generation. *Asian Pac J Cancer Prev.* Apr-Jun;10 (2):263-72.

Hermsdorff hm, Zulet m, Bressan, Martínez. 2008. Effect of diet on the low-grade and chronic inflammation associated with obesity and metabolic síndrome. *Endocrinol Nutr.* 2008;55(9):409-19

Daniel A. Winer, Helen Luck, Sue Tsai, Shawn Winer. 2016. The intestinal immune system in Obesity and insulin Resistance

Lecomte, M., Couëdelo, L., Meugnier, E., Plaisancié, P., Létisse, M., Benoit, Michalski, M. (2015). Dietary emulsifiers from milk and soybean differently impact adiposity and inflammation in association with modulation in association with modulation of colonic goblet cells in high-fat fed mice.

Eller, K., Kirsch, A., Wolf, A. M., Sopper, S., Tagwerker, A., Stanzl, U., Wolf, D., Patsch, W., Rosenkranz, A., Eller, P., 2011. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity- linked insulin resistance and diabetic nephropathy diabetes

Matarese, G., Procaccini, C., De Rosa, V., Horvath, T. L., & La Cava, A. (2010) Regulatory Tcells in obesity: the leptin connection

Castro, P., Martín, J. M., (2015). Sistema inmunitario de la mucosa intestinal

Shen. J., Obin, M., Zhao, L., (2012). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine* 34 39-58

MacDonald, T., Monteleone, G., (2005). Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut

Gatto, D., Brink, R., (2010). The germinal center reaction

Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst- Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., ... (2008). T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue

Hrncir, T., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., (2008) Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice BMC Immunology

Turner, V. B cell activation and the germinal centre response.

Bastard, J-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B., (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance

Wilcox, G., (2005). Insulin and insulin resistance

Moser, B., Willmann, K., (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance

Hermisdorff, H., Zulet, M., Bressan, J., Martinez, A. (2008). Effect of diet on the low-grade and chronic inflammation associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinología y Nutrición* pages 409-419

Taskinen, M-R. (2002). Diabetic dyslipidemia

Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., Butler, P. (2003). B- cell deficit and increased B-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes

Wellen, K. E., Hotamisligil, G. (2005). Inflammation, stress, and diabetes.

