

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.

DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T
REGULADORES EN SUJETOS CON Y SIN
OBESIDAD Y SU ASOCIACIÓN CON LA DIETA

POR:

ERIKA GUADALUPE SALCIDO ROMERO

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE DEL 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y se agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización del director general del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD

Las publicaciones en comunidades científicas o de divulgación de los datos contenidos en esta tesis deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

ATENTAMENTE

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Erika Guadalupe Salcido Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Jesús Hernández López

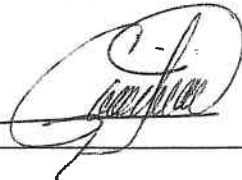
Director de Tesis



Dra. Maricela Montalvo Corral



Dra. Verónica Mata Haro



Dra. Graciela Caire Juvera



M.C. Adriana Bolaños Villar

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Fondo Sectorial SALUD-CONACYT 127013.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las instituciones que permitieron que se llevara a cabo esta investigación. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirme estudiar en su institución y también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado.

Quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Jesús Hernández por todo su apoyo, paciencia y comprensión, por tener siempre el tiempo para escuchar mis dudas a lo largo de este proyecto, pero sobre todo por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, ¡muchas gracias Doc!

A mis asesoras, Dra. Mary Montalvo: gracias por tu apoyo y por enseñarme tus conocimientos en el laboratorio. Dra. Verónica Mata: por sus comentarios y observaciones en las juntas de comité. Maestra Adriana Bolaños por checar mis presentaciones y por los comentarios para mejorar este trabajo y Dra. Graciela Caire por ayudarme en todo lo referente a estadística y cuestionarios de frecuencia. ¡Muchas gracias asesoras!

También quiero agradecer el valioso apoyo técnico de Mónica Resendiz en la realización de este trabajo. También muchas gracias a la Q.B. Bertha Pacheco Moreno, Q.B. René Valenzuela Miranda y M.C. Ana Cristina Gallegos por su apoyo brindado con los voluntarios y en el laboratorio. Al Sr. Fernando Leyva por conseguirme los artículos casi inmediatamente.

A mis compañeras Karina Chávez, Melisa Campa, Diana Luna y a la M.S.P Socorro Saucedo por su paciencia y su tiempo para enseñarme lo de los cuestionarios de frecuencia, así como su participación en la aplicación de los mismos, muchas gracias chicas.

A mis compañeros del laboratorio, los que ya no están Lily, José Luis, Anita, Elí y los que siguen, Era, Lupita, Edgar, Alexel. Muchas gracias chicos por

sus consejos y muestras de cariño, disfrute mucho el tiempo que pase con ustedes entre risas y decepciones pero al final siempre mirando hacia al frente. Era, fuiste una excelente maestra y amiga, muchas gracias por todo. Anita Teresa, fuiste y serás siempre una gran amiga, te agradezco mucho las risas y todo el cariño que me brindaste, te quiero mucho Teresa (a ti y chicharito). Edgar, a pesar de tener poco tiempo en el laboratorio me has alegrado el día con tus ocurrencias, muchas gracias por hacerme reír, te estimo mucho y espero contar siempre con tu amistad.

A la generación de maestría en ciencias 2009-2011 a cada uno de los casi 40 que fuimos, por el compañerismo, por las risas en clase, pero sobre todo por su amistad.

A las muchachas del área de nutrición, somos un grupo muy unido y a pesar de que muchas pronto nos separaremos, los lazos de amistad formados no se romperán. Las quiero mucho muchachas y gracias por todo.

A mis dos grandes amigas de la UNI, Gaby y Daniela. Gracias muchachas por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas tanto en lo personal como en lo académico, por echarme porras y darme siempre ánimos para seguir adelante, las quiero mucho chicas.

A los Sres. Rosa María Mendívil y José de la Luz Navarro por su apoyo recibido desde el comienzo de mi maestría y por impulsarme siempre a seguir adelante, muchas gracias a los dos, los quiero mucho.

DEDICATORIA

Este trabajo se los dedico a mis padres Oscar Salcido Martínez y Rosa Amelia Romero Pacheco. Muchas gracias por todo su amor y apoyo brindado, pero sobre todo por el ejemplo de honestidad y responsabilidad, ¡los amo papas!

A mis hermanos Patricia y Oscar por su cariño y ejemplo de lograr sus objetivos, los quiero mucho hermanos.

También te la dedico a ti César, por ser mi pilar y no dejar que me vaya abajo, por tu amor, paciencia y comprensión. ¡Te amo!

ÍNDICE TEMÁTICO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	3
Linfocitos T	3
Clasificación y función.....	3
Linfocitos T cooperadores	4
Linfocitos T citotóxicos	5
Linfocitos T reguladores	5
Obesidad	7
Epidemiología.....	7
Obesidad y su impacto en la respuesta inmune	9
Efectos de algunos nutrimentos de la dieta en la población celular de linfocitos	9
Vitamina A.....	10
Vitamina D.....	11
Vitamina D y obesidad	12
Vitamina D y respuesta inmune.....	12
Vitaminas A, D y linfocitos T reguladores.....	13
Ácidos grasos	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Diseño experimental y marco muestral.....	15
Muestras de sangre.....	16
Separación de células mononucleares.....	16

Cuantificación de citocina IL-10 por ELISA.....	17
Determinación de células T reguladoras	18
Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos	19
Análisis Estadístico	20
RESULTADOS	20
Características de la población	20
Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ totales.....	21
Distribución de linfocitos T reguladores	23
Determinación de IL-10.....	26
Asociación entre células T reguladoras y consumo de vitaminas A, D y ácidos grasos.....	27
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIÓN.....	38
REFERENCIAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presentación de antígenos en los linfocito T cooperadores y linfocitos T citotóxicos.....	4
Figura 2. Poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sujetos sin y con obesidad.....	22
Figura 3. Análisis de células Tregs.....	23
Figura 4. Porcentajes de células Tregs en sujetos sin y con obesidad.....	25
Figura 5. Determinación de IL-10 por ELISA en suero de sujetos sin y con obesidad.....	26

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de alimentos presentes en el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.....	19
Tabla 2. Características antropométricas de la población de estudio.....	21
Tabla 3. Consumo de alimentos de vitaminas A, D y ácidos grasos en sujetos con y sin obesidad.....	28
Tabla 4. Asociación de Tregs con Vitaminas A, D y grasas.....	30

RESUMEN

La obesidad se ha relacionado con la disfunción inmune, lo que se traduce en una inadecuada respuesta a patógenos y/o alteraciones en el estado de salud. El control de la respuesta inmune y autoinmune depende de un buen balance entre células T efectoras y células T reguladoras (Tregs). Se ha observado que la vitamina A, D y ácidos grasos, tienen la capacidad de promover la generación de células Treg. El objetivo de este trabajo fue medir los niveles de linfocitos Tregs en individuos sin y con obesidad, y su asociación con el consumo dietario de vitaminas y ácidos grasos. Se realizó un estudio de tipo transversal en individuos sin y con obesidad. Se analizaron las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y Tregs por citometría de flujo. Se evaluó la producción de IL-10 por ELISA y se aplicaron cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos. A partir de ellos se realizó un análisis de regresión múltiple. Los resultados muestran que la población de linfocitos T CD4⁺ tuvo una media de 51.6 ± 1.9% y 54.5 ± 1.4% en sujetos sin y con obesidad, respectivamente. Para CD8⁺ la media fue de 33.5 ± 1.8% y 33.4 ± 1.7% en los grupos sin y con obesidad, respectivamente. En los análisis de poblaciones de linfocitos CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺ y producción de IL-10, no se observaron diferencias significativas (p>0.05) entre los grupos. Se encontró una asociación del consumo de vitamina D y ácidos grasos saturados y monoinsaturados con el aumento de las poblaciones de linfocitos CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺ (p<0.05), así como los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (p<0.05). En conclusión no se encontraron diferencias en las células Tregs en los sujetos sin y con obesidad. Los Tregs no tuvieron asociación con la vitamina A a pesar de que el consumo en sujetos con obesidad fue mayor. En la población total del estudio, la vitamina D y ácidos grasos se asociaron con

un aumento en los porcentajes de Tregs por lo que podrían estar interviniendo con los niveles circulantes de estas células.

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune celular involucra a células especializadas como los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$), T citotóxicos ($CD8^+$) y T reguladoras (Tregs). Las células T $CD4^+$ producen citocinas que promueven la producción de anticuerpos por las células B, mejoran y mantienen la respuesta de las células T $CD8^+$ (Abbas y cols., 2002). Las células T citotóxicas eliminan células T infectadas con virus y células tumorales, mientras que las Tregs mantienen la tolerancia y la homeostasis (Jonuleit y cols., 2003). De esta manera, una persona sana puede hacer frente a la infección, sin embargo, algunos individuos pueden ser más susceptibles a infecciones virales y una de las causas es una inadecuada respuesta celular mediada por linfocitos.

La obesidad se ha relacionado con una disfunción de la respuesta inmune. En estudios realizados en ratones con obesidad inducida por dieta, se encontró que la población de células $CD4^+$ se encuentra elevada, pero hay una disminución de células $CD8^+$ (Smith y cols., 2009). Esto se explica por una migración tardía de estas células al sitio de la infección, ya que la presentación de antígeno por las células presentadoras de antígeno (CPA) se encuentra deteriorada. Se conoce que uno de los principales grupos de riesgo para enfermedades infecciosas son las personas con obesidad (Marcos y cols., 2003). Algunos estudios han observado que la población de Tregs en sujetos con obesidad se encuentran disminuidas; sin embargo otros estudios no han encontrado diferencias en los porcentajes de Tregs (Švec y cols., 2007; Yun y cols., 2010), por lo que aún se necesitan más estudios para saber qué determina que los sujetos con obesidad presenten cuadros clínicos más graves que sujetos sin obesidad.

Existe evidencia de que ciertos nutrimentos son importantes y promueven el buen funcionamiento del sistema inmune. Diferentes estudios han demostrado la capacidad anti-inflamatoria que poseen la vitamina A, D y ácidos grasos en la promoción de células Tregs en enfermedades autoinmunes (Kim y cols., 2010; Mora y cols., 2008). Sin embargo, no se han realizado asociaciones de los porcentajes de los Tregs con el consumo dietario de estos nutrimentos. El objetivo de este trabajo fue medir los niveles de linfocitos T reguladores en sujetos con y sin obesidad, y su asociación con el consumo dietario de vitaminas y ácidos grasos.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Linfocitos T

Los linfocitos T son células del sistema inmune que se generan en médula ósea y migran al timo para continuar con su desarrollo hasta células T maduras (Roitt y cols., 2001).

Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones, linfocitos T cooperadores (Th, T helper por sus siglas en inglés) que expresan en su membrana el marcador de superficie CD4 y citotóxicos (CTL citotoxic T lymphocyte) que expresan CD8. Se ha postulado un tercer tipo de células T, conocidas como células T reguladoras (Treg) que pueden ser CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺ o con capacidad supresora y anti-inflamatoria (Roitt y cols., 2001).

Clasificación y función

Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ reconocen distintas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), CD4 une al MHC de clase II y CD8 al MHC de clase I. Durante el reconocimiento del antígeno, dependiendo del tipo de célula T, las moléculas CD4 ó CD8 asociadas al receptor de células T se unen a sitios invariantes en la porción MHC del compuesto péptido ligando:MHC. Esta unión es requerida por la célula T para realizar una respuesta efectiva, en la cual CD4 y CD8 funcionan como correceptores (Janeway y cols., 2001).

Linfocitos T cooperadores. Las células Th secretan citocinas que ayudan a las células B a generar anticuerpos. Las Th mejoran y mantienen la respuesta de las células T CD8⁺, regulan la función de macrófagos proporcionando las herramientas necesarias para tener una respuesta inmune eficiente frente a varios microorganismos (Zhu y cols., 2010).

Los linfocitos necesitan reconocer antígenos a través de células presentadoras de antígeno (como células dendríticas y macrófagos principalmente) para poder convertirse en células efectoras (Figura. 1). Esta población celular se divide en células T Th1 y Th2, que se distinguen entre sí de acuerdo a las citocinas que producen. Las células Th1 producen interferón IFN- γ y factor de necrosis tumoral (TNF- α). En cambio, las células Th2 producen interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13 y algunas células producen IL-9 en casos de asma (Zhu y cols., 2010).

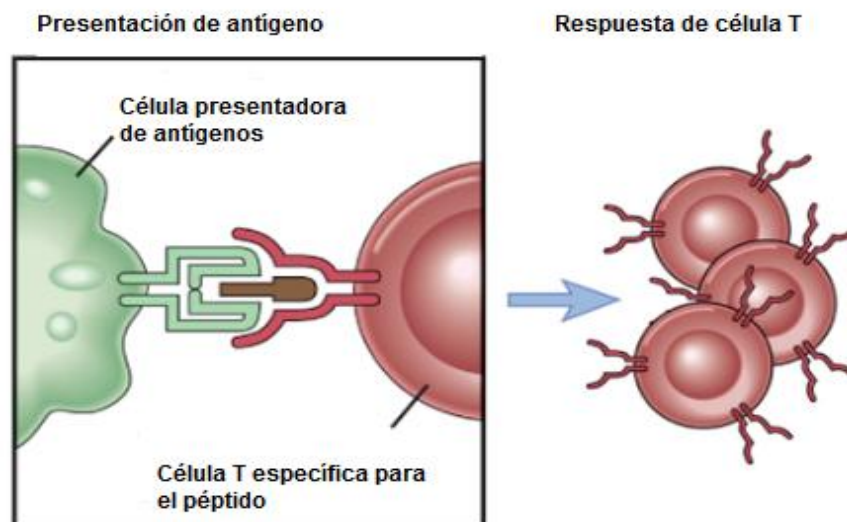


Figura.1 Presentación de antígenos en los linfocitos T (Abbas y cols., 2002).

Linfocitos T citotóxicos. El linfocito T citotóxico (CTL) controla a una variedad de bacterias intracelulares e infecciones virales. Estas células circulan a los sitios periféricos donde ocurre una infección y se dirigen específicamente a las células blanco infectadas (Williams y cols., 2007). Las funciones efectoras, por las cuales las células T CD8 interfieren con la replicación viral, incluyen la secreción de mediadores solubles tales como el TNF- α e IFN- γ y actividad citolítica por exocitosis de perforinas/granzimas o contacto dependiente vía interacciones Fas-FasL (Frebel y cols., 2010). Con la célula Th, el CTL no suele secretar muchas citocinas y, por el contrario muestra una actividad citotóxica (Goldsby y cols., 2004).

Los linfocitos CTL tienen una función vital en la vigilancia de las células del cuerpo y la eliminación de cualquiera que muestre antígeno, como células infectadas por virus, las células tumorales y las células de un injerto de tejido extraño (Goldsby y cols., 2004).

Linfocitos T reguladores. Tanto la respuesta inmune y autoinmune son controladas por un buen balance entre células T efectoras y Tregs. Las células Tregs pueden suprimir la respuesta inmune por un mecanismo dependiente de contacto célula-célula o por la secreción de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β . Estas células son una subpoblación de baja frecuencia, representando del 5 al 10% del total de linfocitos (Belkaid y cols., 2009).

El término de células T reguladoras se refiere a poblaciones de linfocitos T con propiedades reguladoras/supresoras y están dedicadas a mantener la tolerancia y homeostasis en la respuesta inmune. Se conocen tres subgrupos de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ con distintos mecanismos supresores las cuales se diferencian por su fenotipo, secreción de citocinas y el tejido de origen (Jonuleit y cols., 2003). Estas son las células T

reguladoras tipo 1 (Tr1), células T cooperadoras 3 (Th3) y las Tregs dependiente de contacto célula-célula, en donde cada población tiene la capacidad característica de inhibir activamente la proliferación y la función efectora de otras células T (Fukaura y cols., 1996; Groux y cols., 1997). Otro subgrupo pertenece a las células T CD8⁺ con propiedades reguladoras, sin embargo se conoce muy poco acerca de su ontogenia, regulación y función (Smith y cols., 2008).

Las células Tr1 fueron caracterizadas inicialmente en enfermedades inflamatorias en el intestino de ratón, como un potente supresor de la respuesta inmune mediada por la síntesis de IL-10 (Groux y cols., 1997). Las células Th3 fueron descubiertas en ratones como mediadores de la tolerancia oral, la cual actúa para inhibir la inducción de la inmunidad por medio de la secreción del factor transformante del crecimiento β (TGF- β) (Weiner, 2001). De las tres poblaciones celulares, las células Tregs se han convertido quizás, en la línea celular supresora más estudiada del sistema inmune. Las células Tregs son caracterizadas por tener altas cantidades del factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3), el cual es esencial para el desarrollo y función de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Zheng y cols., 2007).

Los mecanismos de acción de los Tregs se pueden dividir en: interacciones célula-célula, secreción local de citocinas inhibitorias y competencia local por factores de crecimiento (Belkaid y cols., 2009).

Las interacciones célula-célula se dan cuando el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) presente en las Tregs induce la expresión de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Ésta degrada el triptófano (importante para la activación de la célula T) y promueve la apoptosis de la célula T (Belkaid y cols., 2009). Otro mecanismo es la secreción local de citocinas inhibitorias como IL-10 y TGF- β . La IL-10 puede inhibir la

proliferación de células T CD4⁺ vírgenes y TGF- β está relacionado con el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios y prevención de enfermedades autoinmunes. (O'Garra y cols., 2004; Wahl y cols., 2004). Por último, la competencia local por factores de crecimiento como IL-2. Se ha comprobado que las Tregs pueden actuar como una “esponja” de esta citocina y así prevenir la activación y proliferación de las células T (de la Rosa y cols., 2004; Scheffold y cols., 2005).

Obesidad

El sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y cáncer. Existen estudios que la relacionan también con la susceptibilidad en procesos infecciosos. La obesidad y el sobrepeso se caracterizan por una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Una persona con un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 30 es considerada con obesidad, mientras que una persona con IMC igual o superior a 25 es considerada con sobrepeso (OMS, 2011).

Epidemiología

La obesidad es un problema mundial, con serias dimensiones sociales que afecta a individuos de todas las edades y grupos socioeconómicos. Su incidencia va en aumento y se estima que existe más de un billón de adultos con sobrepeso de los cuales al menos, 300 millones son obesos. Esto ha tenido un impacto importante en la contribución del aumento de enfermedades crónicas (OMS, 2011).

La aparición de una epidemia de obesidad en México ha surgido en la última década. Con una población de casi 110 millones de personas, México tiene la tercera población más grande en el Hemisferio Occidental (Ford y cols., 2008).

Entre las mujeres mexicanas de 15-49 años de edad, la prevalencia de obesidad en 1987 fue de 10.4% (Ford y cols., 2008). En 1999 se realizó un estudio que incluyó 567 hombres y 1018 mujeres de las ciudades de México, Hermosillo, Ciudad Juárez, Guadalajara, Veracruz, Puebla, León y Mérida. La prevalencia de obesidad fue de 31.7% entre hombres y 26.7% entre las mujeres resaltando la alta prevalencia de obesidad entre los mexicanos que viven en centros urbanos. La prevalencia de la obesidad también se encuentra influida por la variación geográfica, ya que las ciudades del norte presentan mayor prevalencia que las del sur del país (Arroyo y cols., 2000). Un estudio realizado en el periodo 2001-2002 publicó una prevalencia de 53.6% de obesidad en participantes de 18-100 años de las ciudades de México, Guadalajara, Monterrey, Puebla, León y Tijuana. Se observó que la prevalencia de obesidad aumentó con la edad en Brasil, Canadá, México y Estados Unidos. En hombres de 20-29 años de edad la prevalencia de obesidad fue de 16.9%, entre hombres de 50-59 años fue de 32.1% y disminuyó en hombres de 80 años o más a un 9%. Entre mujeres la prevalencia aumenta desde 20.5% entre edades de 20 a 29 años hasta 44.3% entre edades de 50-59 años y disminuye al 16.3% entre las edades de 80 años o mayores. (Ford y cols., 2008).

Obesidad y su impacto en la respuesta inmune

Los cambios inmunológicos que se producen en la obesidad afectan a la inmunidad humoral en la secreción de anticuerpos y, a la inmunidad celular en el número de leucocitos y proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos. Estas alteraciones en la respuesta inmune se han observado en modelos animales, pero investigaciones en humanos confirman una baja capacidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a un mitógeno (Lamas y cols., 2002). En un estudio se demostró que después de que los pacientes con obesidad pierden peso, se producen resultados favorables en respuesta a estímulos, a esto se le atribuye las condiciones de salud del sujeto con obesidad (Marcos y cols., 2003).

Los individuos con obesidad presentan respuestas inmunes ineficientes. En la obesidad las evidencias hasta la fecha indican que las células Tregs se encuentran disminuidas en número y función (IL-10 disminuida) en comparación con los sujetos sin obesidad (Yun y cols., 2010).

Efectos de algunos nutrimentos de la dieta en la población celular de linfocitos

Las vitaminas y sus metabolitos son esenciales para un gran número de procesos fisiológicos. Pueden actuar como hormonas y antioxidantes, reguladores de crecimiento y diferenciación de tejido, en el desarrollo embrionario, metabolismo de calcio entre otros (OMS, 1998)

Además se ha descrito que las vitaminas participan en la modulación del sistema inmune, tanto en la respuesta innata y adaptativa. Ejemplo de esto son las vitaminas A y D que pueden influenciar la respuesta de manera altamente específica (Chambers y cols., 2011; Lu y cols., 2010; Mora y cols., 2008). Por otra parte, los ácidos grasos, sobre todo los poliinsaturados

han demostrado tener una capacidad inmunosupresora y ejercer ciertos efectos benéficos en enfermedades de inflamación activa (Kim y cols., 2010)

Vitamina A

La vitamina A (retinol) es un nutriente esencial para el funcionamiento normal del sistema visual, crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la integridad del epitelio celular, función inmune y reproducción. Las necesidades alimenticias de vitamina A se proporcionan normalmente por el retinol preformado (ésteres de retinol) y por provitamina A (carotenoides) (OMS, 1998).

La vitamina A es obtenida de la dieta, ya sea como trans-retinol, retinol o ésteres de β -caroteno. Todo trans-retinol es convertido a éster de retinol y se almacena en el hígado en las células estrelladas. Un metabolito relacionado al trans-retinol es el 9-cis ácido retinoico que puede ser formado por isomerización espontánea del trans-ácido retinoico por medio de la oxidación del 9-cis-retinal por retinal dehidrogenasas (Mora y cols., 2008).

Una de las fuentes de vitamina A son alimentos de origen animal como leche entera, queso, mantequilla, yema de huevo e hígado. La ingesta de provitamina A (compuestos que pueden ser convertidos a vitamina A en el cuerpo a partir de caroteno) se obtiene a partir de vegetales de hojas verdes oscuras, zanahorias, además de ciertos frutos rojos y amarillos (Shekelle y cols., 1981). Los requerimientos diarios recomendados de ingesta de vitamina A son de 2081.25 unidades internacionales (UI) ó 625 $\mu\text{g}/\text{día}$ de equivalentes de retinol (Bourges, 2005).

Vitamina D

La principal fuente de vitamina D es la exposición a la luz solar y representa del 80-90% de la vitamina D circulante en el organismo, mientras que el consumo dietético de vitamina D proporciona del 10-20% restante (Prietl y cols., 2010). La forma activa de la vitamina D 1,25-dihidroxitamina D (1,25 [OH]₂D₃), es una hormona secoesteroidea que se genera por la biosíntesis catalizada por la luz del sol que comienza en la piel. La radiación ultravioleta (UVB) es absorbida por las células epidermales y dermales y dividen el anillo β del 7-dehidrocolesterol, conduciendo a la producción de pre-vitamina D₃. Ésta es rápidamente convertida a vitamina D₃ la cual deja a la piel y entra al hígado donde es convertido a 25-hidroxitamina D por la citocromo p450 (25-hidroxilasas).

La 25-hidroxitamina D es el metabolito circulantes que luego es convertido a la forma activa 1,25 [OH]₂D₃ utilizando la enzima mitocondrial 25-hidroxitamina D 1α-hidroxilasa. Se pensaba que esta conversión ocurría principalmente en células de riñón. Sin embargo, existe evidencia de otras fuentes extrarenales por células como macrófagos, células epiteliales y células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) las cuales son una fuente importante de vitamina D para acciones inmunomoduladoras en tejidos (Chambers y cols., 2011).

La síntesis en la piel de vitamina D es difícil de estimar, siendo afectada por componentes como la edad, estación del año, latitud, hora del día, exposición de la piel y el uso de bloqueadores. En sujetos con niveles normales de vitamina D, se estima una síntesis de alrededor de 10 µg/día con un consumo total estimado de 15 µg/día (WHO/FAO, 1998). Por otra parte, se reporta que un nivel sanguíneo de 30-50 ng/mL es necesario para una óptima salud y en ausencia de una inadecuada exposición al sol, se requiere una ingesta de 1000 UI de vitamina D diariamente para niños y adultos (Grant y cols., 2005).

Vitamina D y obesidad. Estudios previos han reportado que los individuos con obesidad tienen concentraciones séricas de 1,25 [OH]₂D₃ más altas comparados con sujetos sin obesidad (Al-Sultan y cols., 2011). Esto es de particular interés debido a que recientes reportes han sugerido que la 1,25 [OH]₂D₃ participa en la predisposición al sobrepeso en adultos. Así como a una ganancia de peso por la habilidad de la vitamina D de aumentar las concentraciones de calcio intracelular, particularmente en los adipocitos, estimulando la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis (Shi y cols., 2001). Se ha identificado que la vitamina D es clave importante para estimular la acumulación de triglicéridos en los sujetos con obesidad (Parikh y cols., 2004).

Vitamina D y respuesta inmune. El receptor de la vitamina D (VDR por sus siglas en inglés) se ha encontrado en varias células del sistema inmune como macrófagos, DCs y linfocitos T y B principalmente después de su activación. La función del VDR en las DC es que mejora su tolerogenicidad en las respuestas inmune adaptativa. Las DCs tolerogénicas inducidas por un corto tratamiento con agonistas de VDR, promueven la inducción de células Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ las cuales son capaces de mediar la tolerancia a trasplantes y detener el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Además se ha comprobado que la vitamina D inhibe procesos pro inflamatorios por supresión de la actividad de células Th1, Th2 y Th17 y la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α (Toubi y cols., 2010).

La mayoría de las propiedades inmunomoduladoras de 1,25 [OH]₂D₃ en las DCs se propone que ocurre en las DC mieloides (mDC) y no en las plasmocitoides (pDCs). Varios estudios han mostrado que un pretratamiento con 1,25 [OH]₂D₃ en mDCs y cocultivadas con células T no únicamente inhiben la producción de citocinas de T efectoras sino también inducen la diferenciación a células CD4⁺Foxp3⁺ con actividad supresora (Chambers y cols., 2011).

Vitaminas A, D y linfocitos T reguladoras. En un estudio se encontró que la vitamina D es un promotor importante de la regulación de la célula T *in vivo* en pacientes con esclerosis múltiple. Se demostró que los niveles de 1,25 [OH]₂D₃ están asociados con la función supresora de Tregs (Smolders y cols., 2009).

El ácido retinoico y la vitamina D son miembros de la misma familia de hormonas nucleares y comparten un receptor de señalización común RXR. No se ha esclarecido si el ácido retinoico y la vitamina D tiene funciones redundantes o complementarias en la inducción de Tregs, o si tienen un papel comparable en ratones y humanos (Chambers y cols., 2011).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés), son importantes para la estructura y función de las proteínas de la membrana plasmática, incluyendo receptores y enzimas. El ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexanoico (DHA, 22:6n-3) son productos de la elongación del ácido linolénico alfa (ALA, 18:3n-3) (Kim y cols., 2010). La obtención de estos ácidos es a través del consumo de pescado y aceite de pescado.

Los ácidos grasos, sobre todo los poliinsaturados han demostrado tener una capacidad inmunosupresora y ejercer ciertos efectos benéficos en enfermedades de inflamación activa. El EPA tiene efectos anti-inflamatorios como son la inhibición de linfocitos, estabilización de citocinas y lípidos de la membrana (Ye y cols., 2010). Se sabe que este ácido puede interrumpir el balance entre las Tregs y las células Th17 en un modelo murino, ya que cantidades micro molares pueden activar a PPAR- γ el cual es un antagonista de la respuesta Th17 y un agonista en la inducción de Tregs *in vitro* (Iwami y cols., 2010; Ye y cols., 2010). Por tales motivos, es interesante evaluar el

consumo de este ácido graso y determinar si existe un efecto en la población de los Tregs.

El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) es un modelo que nos permite conocer información del consumo habitual a largo plazo de una población, (Rodríguez Trinidad I., 2008). A través de este método se pueden obtener datos cualitativos y descriptivos de los patrones alimentarios, así como datos semicuantitativos del consumo de nutrientes. Para ello, se utiliza un cuestionario con información sobre la ingesta de ciertos alimentos ó grupo de ellos y la frecuencia con la que se consumen en un determinado tiempo (día, semana, mes, año) (Berganza, 2003).

En un estudio realizado por Yun y cols., se encontró que en la obesidad las Tregs se encuentran disminuidas en número y función (IL-10 disminuida) en comparación con el grupo sin obesidad. Por ello, se pretende evaluar los linfocitos Tregs en sujetos sanos con y sin obesidad, así como su asociación con el consumo de vitaminas y ácidos grasos. Esta información, podría explicar uno de los mecanismos del porqué las Tregs se encuentran disminuidas en los sujetos con obesidad y por qué los cuadros de inflamación son más severos al no contar con este sistema de regulación inmune.

HIPÓTESIS

Los niveles de linfocitos T reguladores varían en individuos con y sin obesidad, y son afectados por el consumo dietario de vitaminas y ácidos grasos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de linfocitos T reguladores en sujetos con y sin obesidad, y su asociación con el consumo dietario de vitaminas y ácidos grasos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar los porcentajes de linfocitos T reguladores, CD4⁺ y CD8⁺ en los sujetos con y sin obesidad.
- b) Cuantificar por ELISA la producción de la citocina IL-10 en suero de los sujetos de estudio.
- c) Asociar la población de linfocitos T reguladores con el consumo de vitaminas y ácidos grasos de la dieta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y marco muestral

El diseño experimental fue de tipo transversal. Se incluyeron hombres y mujeres entre 18 y 50 años de edad que asistieron a consulta en la clínica de obesidad del hospital Ignacio Chávez ISSTESON, así como voluntarios que fueron invitados y reclutados personalmente en su centro de trabajo o

domicilio. Se excluyeron a aquellos participantes que presentaron patologías crónicas e inmunosupresoras (cáncer, sida) y en el caso de mujeres, embarazo. El tamaño de muestra calculado fue de 44 sujetos (22 casos con obesidad, $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ y 22 casos sin obesidad, $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$).

Muestras de sangre

Se extrajeron 30 mL de sangre y se distribuyeron en 5 tubos: tres con 5mL sin anticoagulante para la obtención de las células mononucleares y 2 con 5 mL para obtención de suero.

Separación de células mononucleares

Las células mononucleares (CMN) se obtuvieron a partir de gradientes de densidad de Ficoll-Hystopaque (GE Healthcare systems) en una proporción 2:1 sangre:ficoll, centrifugándose por 30 min a 1600 rpm a 4°C. Posteriormente se tomó únicamente la capa de células localizada entre la capa de ficoll y el plasma. Éstas se lavaron dos veces con medio RPMI suplementado con [L-glutamina (2 mM), penicilina (200 IU/mL), estreptomycin (100 µg/mL), 2-mercaptoethanol ($5 \times 10^{-5} \text{ µM}$)]. Los eritrocitos se lisaron con cloruro de amonio (0.15 M NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA) por 5 min a temperatura ambiente. Las CMN fueron lavadas según se describió anteriormente. Finalmente, se resuspendieron en medio RPMI suplementado con antibióticos y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células se contaron en cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (Sigma) como colorante de exclusión, y se ajustó a una concentración de 1×10^6 células/mL.

Cuantificación de citocina IL-10 por ELISA

La presencia de la citocina IL-10 se determinó mediante ELISA (kit human IL-10 cytoset™, Invitrogen, Carsbland, CA), en suero de los diferentes grupos de individuos. El suero se colocó directamente en una placa de 96 pozos y se realizaron las mediciones por duplicado. Primero, se incubó la placa de 96 pozos con 100 µl por pozo de anticuerpo de captura por 18 horas a 4°C a una concentración de 2 µg/mL diluidos en buffer de carbonatos pH 9.6. Después de incubar toda la noche se desechó la solución y se bloqueó la placa con 300 µl de gelatina de pescado diluida en buffer de fosfatos (PBS 1x) durante 1 hora a 37°C. Después, se lavó con buffer de lavado y se añadieron 100 µl de los estándares de citocina por duplicado de concentraciones seriadas de 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 pg/mL. Al mismo tiempo se agregaron 100 µl de suero sin diluir en los pozos por duplicado junto con 50 µl de anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/mL. Se incubaron durante 2 horas a 37°C. Se lavó con buffer de lavado 4 veces y se agregó 100 µl de solución de estreptavidina-HRP con una concentración de 1/1250 por una hora a 37°C. Se lavó 4 veces con buffer de lavado y se agregó 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) por pozo y se incubó por 15 minutos en oscuridad. Para finalizar, se detuvo la reacción con 100 µl de H₂SO₄ a una concentración 1.8 N. Se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Microplate reader modelo 680 BIORAD) a 450 nm. Los datos fueron analizados en el software Graph-Pad PRISM versión 5.0 con un modelo de 4 parámetros log-log.

Determinación de células T reguladoras

La frecuencia de células T reguladoras se evaluó por medio de citometría de flujo para lo cual se utilizaron CMN obtenidas según se describió anteriormente.

Se determinó el porcentaje de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ utilizando anticuerpos específicos marcados con fluorocromos. Los anticuerpos que se utilizaron fueron anti-CD4-APC (aloficocianina), anti-CD8-APC, anti-CD3-PerCP Cy5 (proteína clorofila peridina), anti-CD25-APC CY7 (BD Biosciences) y anti-Foxp3-PE (ficoeritrina) (eBiosciences). El análisis de citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences). El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa FACSDiva.

Marcaje extracelular. Se añadieron 2×10^5 células en los tubos marcados como $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$ y $Foxp3^+$. Para los tubos marcados como sin teñir (ST) y control de isotipo se colocaron 5×10^5 células. Para el cuádruple marcaje ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ y $CD3^+CD8^+CD25^+Foxp3^+$), se tomaron 1×10^6 células y se homogeneizaron. Se les añadió 3 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) con SFB al 1% y se centrifugaron a 1400 rpm por 7 minutos. Después se decantaron los tubos y se homogeneizaron. Se les añadieron 3 μ L del anticuerpo correspondiente; al control de isotipo se le añadió solo 2 μ L de anticuerpo. Para el marcaje cuádruple se utilizaron 10 μ L de anticuerpo con sus respectivas diluciones. Se dejaron incubar por 1 hora a 4°C en oscuridad. Se lavaron con 2 mL de PBS con SFB en las mismas condiciones antes mencionadas. Se decantaron los tubos y se volvieron a homogeneizar las células para posteriormente realizar el marcaje intracelular para Foxp3.

Marcaje intracelular para Foxp3. Los tubos con marcaje intracelular fueron fijados utilizando el buffer de fijación comercial (eBioscience) por 1 h a 4 °C. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas con el buffer de permeabilización (eBioscience). Posteriormente se agregó 5 µL de anticuerpo anti-Foxp3 (eBioscience) a los tubos correspondientes y 2 µL al tubo marcado como control de isotipo (IgG1-PE). Se dejaron incubar por una hora a 4°C en oscuridad. Por último, se lavaron con buffer de fijación y PBS. Se ajustó el volumen total a 300 µL con PBS.

Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

El cuestionario que se utilizó en esta investigación cuenta con 133 alimentos los cuales fueron divididos en 11 secciones (Tabla 1). Personal de CIAD con entrenamiento en la aplicación de los cuestionarios, entrevistó a los voluntarios para obtener información sobre los tamaños de las raciones (chicas, medianas o grandes), así como la frecuencia del consumo (día, semana, mes, año y rara vez).

Tabla 1. Grupos de alimentos evaluados en el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

Sección	Tipo de alimentos
I	Frutas y jugos
II	Verduras y leguminosas
III	Productos lácteos y huevo
IV	Platillos preparados
V	Carnes y embutidos
VI	Aceites, salsas, aderezos y sazonadores
VII	Cereales, tortillas, panes y botanas
VIII	Pescados y mariscos
IX	Dulces y postres
X	Bebidas
XI	Frutos secos y semillas

Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de las variables utilizando la media geométrica y el intervalo de confianza al 95% para las variables dietarias, así como la media y el error estándar para los porcentajes de las poblaciones celulares. Para hacer las comparaciones entre el grupo personas sin y con obesidad, se realizaron pruebas de *t* para muestras independientes en los datos con distribución normal y la prueba de U Mann-Whitney para los no paramétricos. Para evaluar las asociaciones entre dieta y Tregs se llevó a cabo una regresión lineal múltiple. Se realizaron varios modelos tomando como variables dependientes $CD4^+CD25^{Total}Foxp3^+$, $CD4^+CD25^{Alta}Foxp3^+$ y $CD8^+Foxp3^+$ y como variables independientes la vitamina A, D y ácidos grasos. Se utilizaron como variables de ajuste en todos los modelos, el IMC, sexo, consumo de energía y edad. Todos los análisis se hicieron tomando en cuenta una significancia de 0.05. El análisis se llevó a cabo en los programas GraphPad Prisma versión 5.0 y en el programa STATA versión 8.0.

RESULTADOS

Características de la población

En este estudio se incluyeron 44 sujetos, los cuales se dividieron en dos grupos de acuerdo a sus características antropométricas, 22 sujetos sin obesidad y 22 sujetos con obesidad. En el grupo sin obesidad hubo 11 hombres y 11 mujeres con una media de edad de 32.7 ± 10.8 años; para el grupo con obesidad fueron 12 hombres y 10 mujeres con una media de edad de 34.2 ± 9.6 años (Tabla 2). Para las variables de talla se encontró una media de 1.69 ± 6.3 y 1.67 ± 9.2 cm en el grupo sin y con obesidad respectivamente. En el peso e IMC se encontraron diferencias significativas

entre grupos ($p < 0.05$) con 65.4 ± 10.3 Kg y 22.7 Kg/m² en los sujetos sin obesidad, y 108 ± 22.5 Kg y 38.4 Kg/m² en sujetos con obesidad.

Tabla 2. Características antropométricas de la población de estudio.

Características	Sin obesidad	Con obesidad	valor de p
Género (M/F)	11/11	12/10	NA
Edad	32.7 ± 10.8	34.2 ± 9.6	0.6
Talla (cm)	169 ± 6.3	167 ± 9.2	0.09
Peso (Kg)	65.4 ± 10.3	108 ± 22.5	0.0008*
IMC (Kg/m²)	22.7 ± 2.5	38.4 ± 6.6	0.0001*

Los valores representan la media y desviación estándar. NA = no aplica.

* Prueba *t* ($p < 0.05$).

Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales

Se determinó el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en los dos grupos de estudio. Se encontró que los linfocitos T CD4⁺ en el grupo sin obesidad presentó una media y error estándar de $51.65 \pm 1.95\%$ en comparación con los sujetos con obesidad que fue de $54.50 \pm 1.48\%$. Para los linfocitos T CD8⁺ se obtuvo en el grupo sin obesidad una media y error estándar de $33.51 \pm 1.85\%$ y, en el grupo con obesidad fue de $33.45 \pm 1.70\%$. Tanto para CD4⁺ y CD8⁺, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p > 0.05$) (Figura 2).

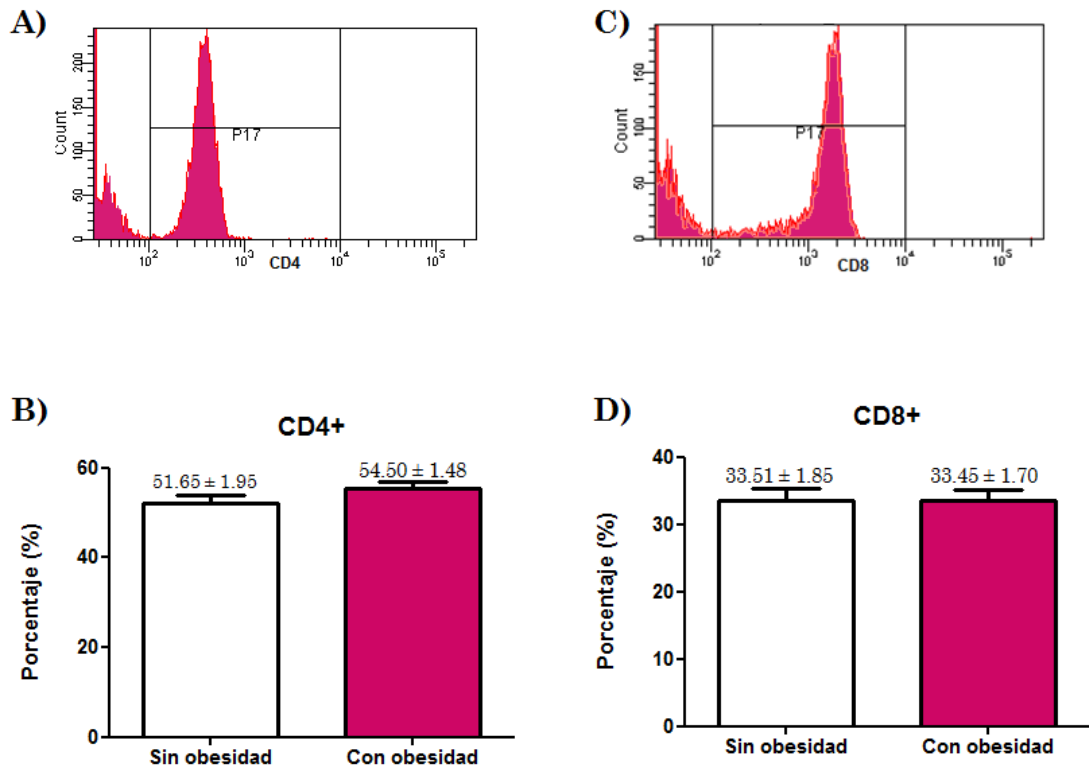


Figura 2. Poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sujetos sin y con obesidad. Las barras blancas representan a los sujetos sin obesidad y las barras rosas sujetos con obesidad. A) Se presenta un histograma en donde se encuentran seleccionada la región de los linfocitos T CD4⁺. B) Las barras representan el porcentaje de CD4⁺ en sujetos con y sin obesidad. C) histograma de la población de linfocitos T CD8⁺. D) las barras representan al porcentaje de CD8⁺ de los sujetos de estudio. La muestra fue de 22 sujetos del grupo sin obesidad y 22 sujetos en el grupo con obesidad. Las líneas representan el error estándar SEM. Las diferencias entre grupos fueron analizados mediante una prueba de *t* con un nivel de significancia de 0.05.

Distribución de linfocitos T reguladores

Para el análisis de las células Tregs $CD4^+$ con fenotipo $CD25^{Alta}Foxp3^+$, se identificaron los linfocitos $CD3^+$ y a partir de esta región se analizó la población $CD4^+$. Posteriormente, se elaboró un diagrama de puntos para analizar la expresión de $CD4$ y $CD25$ siguiendo lo descrito por Liu y cols., el cual fue dividido en cuatro regiones, la negativa (sólo $CD4^+$), total ($CD4^+CD25^+$), el intermedio o bajo ($CD4^+CD25^{Intermedio}$) y alta ($CD4^+CD25^{Alta}$) (Liu y cols., 2006) (Figura 3). De cada región se analizó la expresión de $Foxp3$. Para las células $CD8^+Foxp3^+$ se determinaron los linfocitos $CD3^+$ y a partir de esta población los $CD8^+$, se realizó un diagrama de puntos de $CD8$ vs $Foxp3$ donde se determinó el porcentaje de estas células.

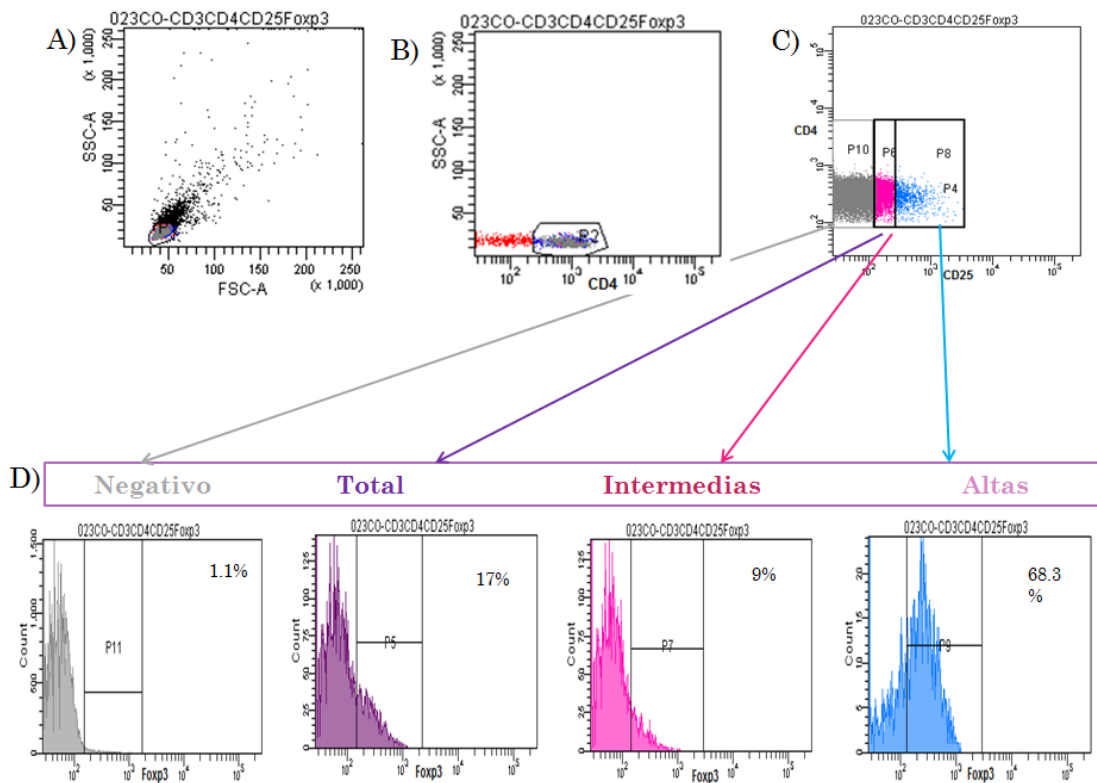


Figura.3. Análisis de células Tregs. A) Se muestra una gráfica de puntos en la que se encuentra seleccionada la población de linfocitos. B) Se realiza

una región en la gráfica de puntos seleccionando a los linfocitos CD4⁺. C) A partir de los linfocitos CD4⁺ (B) se realiza otro gráfico de puntos de CD4 vs CD25 en donde se determinaron 4 regiones: negativa, total, intermedia y alta expresión de CD25. D) De cada una de las regiones antes mencionadas se realizó un histograma para conocer la expresión de Foxp3⁺.

El factor de transcripción Foxp3⁺, se expresa en un porcentaje significativo de las células T CD4⁺ y se relaciona con la expresión del marcador de superficie CD25 (Sakaguchi y cols., 1995). Se determinó el porcentaje de células Tregs en los sujetos de estudio (Figura 4). Las barras representan el promedio del porcentaje de Foxp3⁺ en las células CD4⁺CD25^{Total}, CD4⁺CD25^{Alta} y SEM. Para el fenotipo de células T reguladoras CD4⁺CD25^{total} se encontró una media y error estándar en el grupo sin obesidad de $13.85 \pm 2.51\%$ y para los sujetos con obesidad de $11.89 \pm 2.53\%$. Para las células CD4⁺CD25^{Alta} los porcentajes son del $33.2 \pm 4.78\%$ y $35.67 \pm 6.26\%$ en el grupo sin y con obesidad, respectivamente. Para el fenotipo de células T reguladoras CD8⁺Foxp3⁺ fue de $0.35 \pm 0.05\%$ y $0.31 \pm 0.05\%$ en el grupo con y sin obesidad. No hubo diferencias entre grupos ($p > 0.05$) en los tres fenotipo de Tregs.

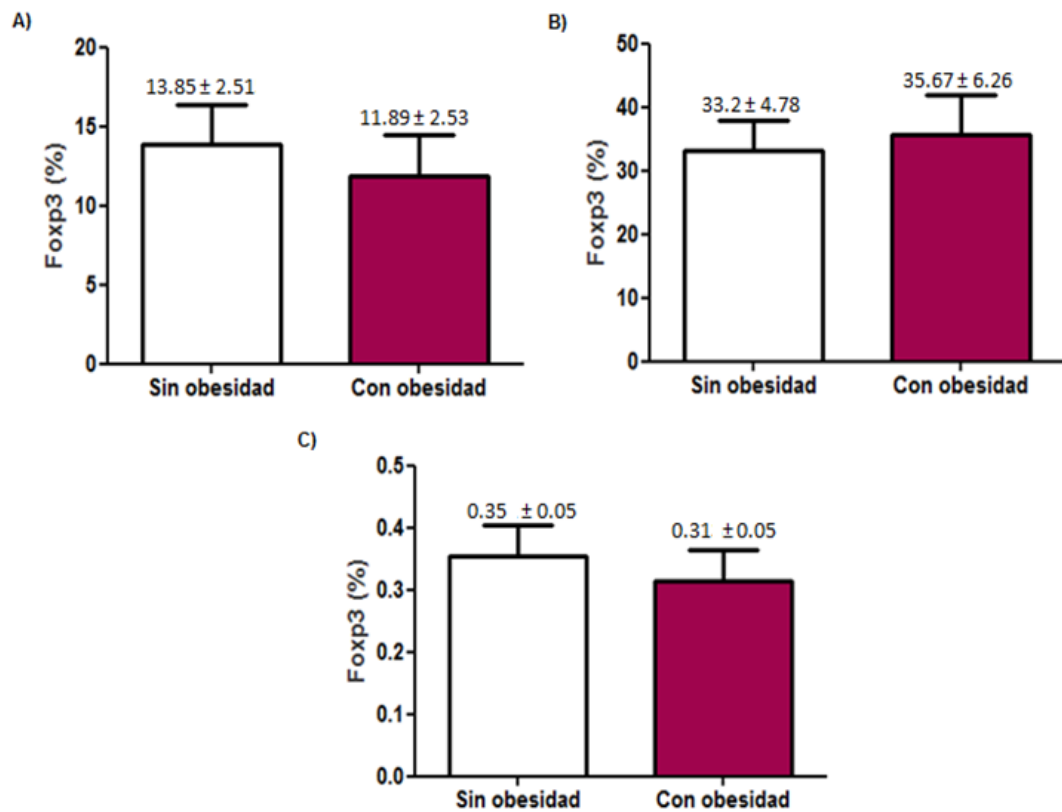


Figura 4. Porcentajes de células Tregs en sujetos sin y con obesidad. Las barras blancas representan a los sujetos sin obesidad y las rosas a los sujetos con obesidad. A) Células Tregs fenotipo CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺. B) Células Tregs fenotipo CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺. C) Tregs fenotipo CD8⁺Foxp3⁺ en obesos y no obesos. El número de la muestra fueron 44 sujetos, 22 sujetos del grupo sin obesidad y 22 sujetos en el grupo con obesidad. Las barras representan el porcentaje de Foxp3 en las células CD8⁺Foxp3⁺. Las líneas representan el error estándar SEM. Las diferencias entre grupos se analizaron por la prueba de U Mann-Whitney a un nivel de significancia de 0.05.

Determinación de IL-10

Los resultados mostraron que en el caso de los sujetos que presentaron obesidad, no fue posible detectar la producción de citocina en 18 sujetos, 2 sujetos se eliminaron debido a que tuvieron valores fuera del límite de detección que fue de 31.2 pg/mL. Sin embargo se encontraron valores de 101 y 285 pg/mL en 2 sujetos de éste grupo. En cuanto a los sujetos sin obesidad, no fue posible la detección en 17 y solo 5 sujetos se detectaron con valores que van entre 88-412 pg/mL. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de los grupos con y sin obesidad ($p > 0.05$) (Figura.5).

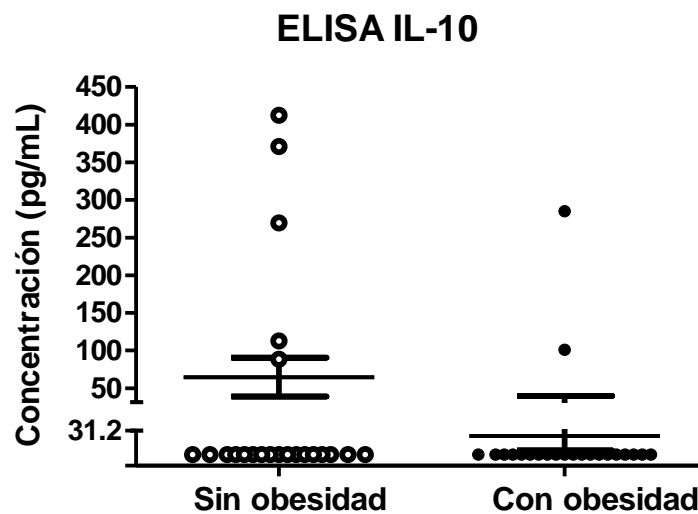


Fig. 5. Determinación de IL-10 por ELISA en suero de sujetos sin y con obesidad. Los datos son representativos de 44 sujetos; 22 sujetos sin obesidad y 20 sujetos con obesidad. La línea sólida representa la media. La comparación entre grupos se realizó por prueba de U Mann-Whitney a un nivel de significancia de 0.05.

Asociación entre células T reguladoras y consumo de vitaminas A, D y ácidos grasos

Utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) se obtuvo el consumo habitual de la vitamina A, D y de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) en los sujetos de estudio (Tabla 2). Se observó que el consumo de vitamina A sobrepasa el requerimiento diario recomendado de 2081.25 UI tanto en los sujetos sin obesidad como en los sujetos con obesidad. Para la vitamina D se encontraron valores por debajo del requerimiento diario recomendado que son 1000 UI en ambos grupos. No se obtuvieron diferencias significativas ($p>0.05$) en cuanto el consumo de grasas (monoinsaturadas y poliinsaturadas), ni vitamina D entre ambos grupos. Sin embargo, si hubo diferencias ($p<0.05$) en el consumo de vitamina A en donde el grupo con obesidad presentó un mayor consumo de este nutrimento. La muestra para el CFCA fue de 22 sujetos sin obesidad y 19 sujetos con obesidad (3 sujetos no contestaron el CFCA debido a que no se pudieron localizar) (Tabla 3).

Se realizó también un análisis de regresión lineal múltiple para ver posibles asociaciones entre linfocitos T CD4+, CD8+ y Tregs (CD4+CD25^{Total}Foxp3+ y CD4+CD25^{Alta}Foxp3+ y CD8+Foxp3+) con los nutrimentos antes mencionados. Para este análisis se tomó la población de sujetos sin distinción entre sujetos sin y con obesidad para ver la asociación de las

Tabla 3. Consumo de alimentos de vitaminas A, D y ácidos grasos en sujetos con y sin obesidad.

	Condición	Media geométrica	Intervalo de confianza al 95%	valor de p
Energía (Kcal)	SO	2101	1731-2549	0.2690
	CO	2298	2020-2613	
Vitamina A (UI)	SO	10510	6750 - 16364	0.0145*
	CO	26081	14817 - 45908	
Vitamina D (UI)	SO	153.9	115 - 205.9	0.8038
	CO	150.3	121.1 - 186.5	
Grasa (g)	SO	73.51	56.63 - 95.44	0.8038
	CO	68.37	55.84 - 83.72	
Grasa saturada (g)	SO	22.64	17.68 - 29	0.9896
	CO	21.82	17.73 - 26.85	
Grasa monoinsaturada (g)	SO	24.94	19.32 - 32.2	0.4721
	CO	21.48	17.85 - 25.83	
Grasa poliinsaturada (g)	SO	15.19	11.46 - 20.14	0.7143
	CO	14.13	10.81 - 18.45	

SO= Sin obesidad; CO=Con obesidad.

* Prueba de U Mann-Whitney ($p < 0.05$).

vitaminas A, D y ácidos grasos en el aumento de células Tregs.

Para el fenotipo $CD4+CD25^{Total}F_{oxp3+}$ se encontró una asociación con la vitamina D, ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados. Por cada unidad de cambio en la vitamina D, ácidos grasos saturados y

monoinsaturados hay un aumento de 0.069, 1.184 y 0.549 % en las Tregs respectivamente ($p < 0.05$). En las células $CD4+CD25^{Alta}Foxp3+$ hubo una asociación con la vitamina D ($\beta=0.173$, $p < 0.01$) y grasas saturadas ($\beta=1.184$, $p=0.051$). Por último, para los linfocitos $CD8+Foxp3$, la vitamina D tuvo efecto, ya que por cada unidad de cambio de la vitamina D aumenta 0.001% estas Tregs ($p < 0.05$) y también los ácidos grasos monoinsaturados ya que cada unidad cambio provoca un aumento de 0.010% de los Tregs ($p < 0.05$). Para las poblaciones de $CD4+$ y $CD8$ no se encontró ninguna asociación con estos nutrimentos ($p > 0.05$). Estos datos son representativos de toda la población en estudio (41 sujetos) (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación de CD4⁺, CD8⁺ y Tregs con Vitaminas A, D y grasas.

Células	Nutrimento	β	Valor de p
CD4⁺	vitamina A	4x10 ⁻⁰⁵	0.972
	vitamina D	0.018	0.298
	grasa saturada	0.279	0.122
	grasa moninsaturada	0.111	0.520
	grasa poliinsaturada	0.024	0.881
CD8⁺	vitamina A	7.69x10 ⁻⁰⁶	0.834
	vitamina D	-0.027	0.134
	grasa saturada	-0.253	0.175
	grasa moninsaturada	-0.030	0.864
	grasa poliinsaturada	0.098	0.548
CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺	vitamina A	-0.0002	0.141
	vitamina D	0.069	0.011*
	grasa saturada	1.184	0.041*
	grasa moninsaturada	0.549	0.038*
	grasa poliinsaturada	-0.407	0.450
CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺	vitamina A	-0.0002	0.141
	vitamina D	0.173	0.003*
	grasa saturada	1.184	0.051*
	grasa moninsaturada	0.892	0.123
	grasa poliinsaturada	-0.406	0.450
CD8⁺Foxp3⁺	vitamina A	1.68 X 10 ⁻⁰⁶	0.123
	vitamina D	0.001	0.037*
	grasa saturada	0.001	0.087
	grasa moninsaturada	0.010	0.045*
	grasa poliinsaturada	-0.001	0.860

Variables de ajuste: IMC, sexo, edad y energía consumida.

* Prueba de U Mann-Whitney (p<0.05).

DISCUSIÓN

La obesidad es un problema grave de salud pública ya que con ello aumentan las enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedades coronarias, entre otras. En Estados Unidos el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) encontró que en el 2009 se gastaron 147 billones de dólares al año en atención médica en sujetos con obesidad. Además de su relación con el síndrome metabólico, se ha notado que la obesidad presenta respuestas inmunes deterioradas frente a las infecciones. Todo este conjunto de efectos de la obesidad en la salud, hace que ésta tenga un fuerte impacto económico.

En este estudio se analizaron las CMN de sujetos sin y con obesidad y se determinaron los porcentajes de CD4⁺, CD8⁺ y células Tregs. Los linfocitos Tregs son muy importantes para mantener la homeostasis, ya que cuentan con propiedades inmunosupresoras y constituyen del 5-10% de las células CD4⁺ de la periferia (Cools y cols., 2007). En este trabajo se determinaron los Tregs con fenotipo CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺. Además, se midieron los niveles séricos de IL-10. Es conocido que la IL-10 es una citocina anti-inflamatoria producida por diferentes tipos de células, entre ellas las células Tregs Tr1 son una importante fuente (McKinstry y cols., 2009). Se realizaron asociaciones entre células CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺ con la vitamina A, D y ácidos grasos para ver si su consumo tenían algún efecto en el aumento de éstas células en circulación.

Al realizar la comparación entre los dos grupos sin y con obesidad, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de CD4⁺ y CD8⁺. Se ha encontrado altas cantidades de CD4⁺ en sujetos con sobrepeso u obesidad y cuentas altas de células CD8⁺ en sujetos con obesidad mórbida (IMC>40 Kg/m²) en un estudio realizado en Estados Unidos (Womack y

cols., 2007). Sin embargo, de nuestros 22 sujetos, solamente 7 presentaron obesidad mórbida, por lo que puede ser la razón de que no se encontraran diferencias entre ambos grupos. Otros estudios han encontrado altos porcentajes de linfocitos T CD4⁺ en tejido adiposo, por lo que es probable que en sangre periférica no se puedan notar esas diferencias entre los porcentajes de estas células (Kintscher y cols., 2008). Mientras que un estudio realizado por Rocha y cols., encontraron un aumento de células CD4⁺ y CD8⁺ en ratones obesos que ingirieron una dieta alta en grasas, apoyando la teoría de la obesidad como un estado de inflamación persistente. Las razones por las que no encontramos diferencias podría ser que en nuestros sujetos de estudio el consumo de grasa no fue diferente entre los grupos sin y con obesidad, además de que no todos nuestros sujetos presentaron obesidad mórbida.

Las Tregs CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺ suprimen la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Ribeiro Rodrigues y cols., 2006). Su función se lleva a cabo a través de interacciones de larga duración con DCs poco después de entrar a ganglios linfáticos, provocando que se deteriore la habilidad de las DCs para activar a células T efectoras. Otro mecanismo es la inhibición por contacto célula-célula o por producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β (Belkaid y cols., 2009). Se ha reportado que en sujetos con obesidad, los valores de Tregs se encuentran disminuidos en comparación con sujetos delgados de raza caucásica (De Rosa y cols., 2007; Yun y cols., 2010).

En el tejido adiposo también hay una alta secreción de adipocitocinas y leptina. Se ha encontrado que las Tregs tienen un tropismo preferencial hacia el tejido adiposo y que presentan los receptores largos de leptina lo que puede explicar la atracción hacia el tejido adiposo (Matarese y cols., 2010). En la obesidad, altos niveles de leptina pueden influenciar negativamente la expansión y proliferación de células Tregs, lo que podría

explicar porqué se encuentran reducidas en número y con función deteriorada (De Rosa y cols., 2007).

En nuestra investigación no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en los niveles de $CD4^+CD25^{Alta}Foxp3^+$ entre los grupos sin y con obesidad. Existen datos controversiales en cuanto a los niveles de células Tregs en sujetos con obesidad. Se ha encontrado que en sujetos con obesidad las células Tregs se encuentran disminuidas en comparación con un grupo sin obesidad (Matarese y cols., 2010; Yun y cols., 2010). Sin embargo, en un estudio realizado en niños con y sin obesidad no se encontraron diferencias en los porcentajes de Tregs al compararlos con el grupo sin obesidad (Švec y cols., 2007). Además, datos no publicados por Gómez y cols., observaron que los porcentajes de Tregs en sujetos con obesidad mórbida no presentaron diferencias con los sujetos sin obesidad (Gómez y cols., 2010). Probablemente, la generación de Tregs no se encuentre afectada en sangre periférica en los sujetos con obesidad debido a la ingesta de vitaminas como la A, D y ácidos grasos, que se han asociado con el incremento de Tregs.

Las células Tregs $CD8^+Foxp3^+$ son un grupo que ha sido muy poco estudiado. Se ha encontrado una alta producción de IL-10 y TGF- β en sujetos infectados con virus de inmunodeficiencia humana y virus de la hepatitis C, lo que ha llevado a pensar que este grupo de células tenga capacidad de suprimir la producción de citocinas y proliferación de células T, probablemente para limitar el daño al tejido (Billerbeck y cols., 2009). No se conoce el efecto que tienen estas Tregs en la obesidad. Los resultados que obtuvimos sugieren que no hay un efecto de la obesidad, ya que no obtuvimos diferencias significativas ($p > 0.05$), contra el grupo sin obesidad. En condiciones sin estimulación, el porcentaje de células Tregs es muy pequeño, por lo que es necesario estimular las células para incrementar ese porcentaje. En nuestro estudio los sujetos fueron sanos, ya que se pretendía

conocer los valores circulantes debido a la obesidad y no por un agente externo como sería la estimulación de las células

En nuestros datos no encontramos diferencias significativas entre sujetos sin y con obesidad, en las concentraciones de IL-10 ($p>0.05$) ya que los resultados obtenidos estuvieron abajo del límite de detección. Sin embargo, en los casos donde se pudo detectar, se observó que los sujetos con obesidad presentaron menor cantidad de IL-10 respecto al grupo sin obesidad. Al revisar el cuestionario de salud, los sujetos informaron que no cursaban con ninguna enfermedad al momento de la toma de muestra; sin embargo dado los resultados obtenidos es posible que los sujetos hayan cursado con un proceso infeccioso asintomático.

La adiponectina es una hormona sintetizada por el tejido adiposo que además tiene función de citocina. En la obesidad, esta citocina se encuentra disminuida ya que se ha observado una relación inversa entre adiponectina e IMC (Buechler y cols., 2011). La adiponectina tiene un efecto sobre la IL-10 ya que activa vías de señalización en macrófagos como la de NF- κ B y proteína cinasa A. La activación de estas vías culmina en la expresión de mediadores anti-inflamatorios como IL-10. Por tal razón, los sujetos con obesidad tienden a sintetizar menos IL-10 que los sujetos sin obesidad.

En la obesidad, se encuentra un desbalance entre ingesta y gasto de energía. Esto se asocia con efectos adversos como son la diabetes mellitus tipo 2, resistencia a insulina, inflamación, enfermedades cardiovasculares, tumores, así como respuestas inmunes deterioradas frente a diversos patógenos (Balistreri y cols., 2010). Por tal razón, en este estudio se vió la asociación de vitamina A, D y ácidos grasos en la promoción de células Tregs en los sujetos de estudio.

La vitamina A tiene varios efectos benéficos en la respuesta inmune. Se ha visto que el ácido retinoico contribuye a la tolerancia inmunológica ya que mejora la estabilidad y expresión de Foxp3 en el ratón (Lu y cols., 2010). En células CD4⁺ humanas, se ha reportado que promueve la acetilación del promotor del gen Foxp3 (Kang y cols., 2007). A pesar de haber tenido un alto consumo de vitamina en nuestros sujetos de estudio, este consumo no se asoció con la frecuencia de las poblaciones de Tregs (CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺ y CD8⁺Foxp3⁺). Esto se puede explicar ya que se ha observado que para que haya un efecto de la vitamina A en la diferenciación de células Tregs, se necesita TGF-β e IL-2.

Otra vitamina que es importante para el sistema inmune es la vitamina D, la cual es capaz de inhibir respuestas de tipo Th1, Th17 y promover Th2 y células Tregs (Smolders y cols., 2009).

El receptor de la vitamina D, está presente en células T y B activadas, así como en monocitos y células dendríticas. En las células dendríticas, se ha encontrado que otro metabolito de la vitamina D (calcitriol) disminuye moléculas de presentación de antígeno y moléculas coestimuladoras, además de disminuir la producción de IL-12 y favorecer la producción de IL-10. Como consecuencia, se suprime la síntesis de la respuesta Th1. Por otra parte, 1,25(OH)₂VD₃ tiene la capacidad de inhibir la producción de IL-6 e IL-2 por lo que induce la diferenciación y/o expansión de células Tregs (Chambers y cols., 2011; Dimeloe y cols., 2010; Mora y cols., 2008) La vitamina D ha sido un nutrimento muy documentado en la promoción de células Tregs. Un estudio realizado por Prietl y cols., encontraron que la suplementación con vitamina D en un grupo de sujetos sanos, aumentó significativamente el porcentaje de Tregs (Prietl y cols., 2010). Otro estudio realizado por Goreishi y cols., observaron un aumento de los Tregs en nódulos linfáticos de ratón cuando fueron tratados con aplicación tópica de un análogo de la vitamina D (calcipotriol) tras la exposición a rayos

ultravioleta (Ghoreishi y cols., 2009). También se ha demostrado que esta vitamina tiene un impacto en el desarrollo de células dendríticas tolerogénicas que tienen la capacidad de inducir células Tregs (Adorini y cols., 2009).

En los resultados se obtuvo un consumo menor al requerimiento diario de vitamina D que es de 1000 UI por día (153.9 y 150.3 UI en sujetos sin y con obesidad respectivamente). Sin embargo, el 90% de la síntesis de vitamina D es por exposición al sol y en Sonora (que es donde se llevó a cabo este estudio), la mayoría de los días son soleados. Aunque el consumo de vitamina D no haya sido el recomendado, la síntesis de esta vitamina es compensada por la exposición al sol, por lo que no podemos hablar de deficiencia tomando en cuenta solo su consumo. Las asociaciones de vitamina D se realizaron en base a su consumo en todos los sujetos de estudio (sin y con obesidad) y se encontró que para los tres fenotipos de Tregs había asociación significativa ($p < 0.05$), en donde entre mayor fue el consumo de vitamina D hubo un incremento en las Tregs. Esto nos confirma la importante función que tiene esta vitamina en la respuesta inmune y nos puede explicar por qué los porcentajes en los sujetos con obesidad no se ven afectados.

Los ácidos grasos saturados suprimen la proliferación en linfocitos humanos y aumenta la producción de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-6) (Han y cols., 2002). Sin embargo, nuestros datos indican que existe una asociación significativa ($p < 0.05$), entre ácidos grasos y Tregs. Esto nos indica que un consumo de ácidos grasos saturados y monoinsaturados tienen una aportación en la generación de Tregs. Se esperaba que los PUFAS tuvieran una mayor asociación, ya que se ha reportado que el EPA tiene efectos inmunosupresores al activar receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR- γ) que funge como antagonista del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Ye y cols., 2010). También se ha encontrado que la ingesta de

EPA ayuda en la reducción de la obesidad disminuyendo el riesgo a enfermedades (Makhoul y cols., 2011). En un estudio realizado en población sonorense por González y cols., encontraron que el consumo de grasa total y saturada fue mayor que el consumo de grasa monoinsaturada y poliinsaturada. Esto se debió a que hubo una disminución en el consumo de pescado que es el principal aportador de los PUFAS (González, 2008). Es probable que debido al bajo consumo de pescado, no haya sido posible detectar la asociación que tienen los ácidos grasos poliinsaturados en el aumento de los Tregs.

CONCLUSIÓN

No se encontraron diferencias entre los sujetos sin y con obesidad en las poblaciones celulares de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y Tregs fenotipo CD4⁺CD25^{Total}Foxp3⁺, CD4⁺CD25^{Alta}Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺ y la citocina IL-10. Se encontró que el consumo de vitamina A no tuvo efecto en la generación de Tregs, sin embargo, en la vitamina D y ácidos grasos sí se encontró una asociación con el aumento en los tres fenotipos de Tregs. Por lo tanto, estos nutrimentos podrían estar promoviendo la generación de las células Tregs en ambos grupos de manera que no se vean afectados los niveles circulantes de estas células.

REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. 2002. Inmunología celular y molecular (Mc-Graw Hill), pp. 315-317,363.
- Al-Sultan, A., Amin, T., Abou-Seif, M., Al Naboli, M., 2011, Vitamin D, parathyroid hormone levels and insulin sensitivity among obese young adult Saudis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15, 135-147.
- Arroyo, P., Loria, A., Fernández, V., Flegal, K.M., Kuri-Morales, P., Olaiz, G., Tapia-Conyer, R. 2000. Prevalence of pre-obesity and obesity in urban adult Mexicans in comparison with other large surveys (Nature Publishing Group), pp. 179-185.
- Balistreri, C.R., Caruso, C., Candore, G., 2010, The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010, 802078.
- Belkaid, Y., Tarbell, K., 2009, Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions*. *Annual review of immunology* 27, 551-589.
- Berganza, H.P.R., 2003. Consumo de alimentos fuente de algunos fitoquímicos en tres áreas de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Billerbeck, E., Nakamoto, N., Seigel, B., Blum, H.E., Chang, K.M., Thimme, R., 2009, Determinants of in vitro expansion of different human virus-specific FoxP3+ regulatory CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of General Virology* 90, 1692.
- Bourges, H., 2005, Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, Primera edición Edition. Editorial Médica Panamericana, Mexico, Pág 36 p.
- Buechler, C., Wanninger, J., Neumeier, M., 2011, Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 17, 2801-2811.
- Chambers, E.S., Hawrylowicz, C.M., 2011, The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 11, 29-36.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., 2007, Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195.

- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A., 2004, Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34, 2480-2488.
- De Rosa, V., Procaccini, C., Cal, G., Pirozzi, G., Fontana, S., Zappacosta, S., La Cava, A., Matarese, G. 2007. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation (Elsevier), pp. 241-255.
- Dimeloe, S., Nanzer, A., Ryanna, K., Hawrylowicz, C., 2010, Regulatory T cells, inflammation and the allergic response--The role of glucocorticoids and Vitamin D. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 120, 86-95.
- Ford, E.S., Mokdad, A.H. 2008. Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere (Endocrine Soc), p. s1.
- Frebel, H., Richter, K., Oxenius, A. 2010. How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses (John Wiley & Sons).
- Fukaura, H., Kent, S.C., Pietruszewicz, M.J., Houry, S.J., Weiner, H.L., Hafler, D.A. 1996. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients (American Society for Clinical Investigation), p. 70.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. 2004. *Kuby immunology*, McGraw-Hill, ed., pp. 10-11.
- Gómez, E., Kaufer-Horwitz, M. 2010. Molecular and cellular markers of inflammation in morbid obesity (México, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)).
- González, L.E., 2008. Cambios en el patrón de consumo de alimentos y su relación con riesgo de enfermedades crónicas en la población sonorenses. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Mexico.
- Grant, W.B., Holick, M.F., 2005, Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 10, 94-111.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis (Nature Publishing Group), pp. 737-742.
- Han, S.N., Leka, L.S., Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Schaefer, E.J., Meydani, S.N., 2002, Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune

- and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *Journal of lipid research* 43, 445.
- Iwami, D., Nonomura, K., Shirasugi, N., Niimi, M., 2010, Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *International immunopharmacology*.
- Janeway, A., Charles, J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, pp. 72-75.
- Jonuleit, H., Schmitt, E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations (*Am Assoc Immunol*), p. 6323.
- Kang, S.G., Lim, H.W., Andrisani, O.M., Broxmeyer, H.E., Kim, C.H., 2007, Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 179, 3724.
- Kim, W., Khan, N.A., McMurray, D.N., Prior, I.A., Wang, N., Chapkin, R.S., 2010, Regulatory activity of polyunsaturated fatty acids in T-cell signaling. *Prog Lipid Res* 49, 250-261.
- Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., 2008, T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue. A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, ATVB* 108.165100 v165101.
- Lamas, O., Marti, A., Martinez, J., 2002, ORIGINAL COMMUNICATION Obesity and immunocompetence. *European journal of clinical nutrition* 56, S42-S45.
- Liu, W., Putnam, A., Xu-yu, Z., Szot, G., Lee, M., Zhu, S., Gottlieb, P., Kapranov, P., Gingeras, T., de St Groth, B., 2006, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1701.
- Lu, L., Zhou, X., Wang, J., Zheng, S.G., Horwitz, D.A., 2010, Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-beta and retinoic acid. *PLoS One* 5, e15150.
- Makhoul, Z., Kristal, A.R., Gulati, R., Luick, B., Bersamin, A., O'Brien, D., Hopkins, S.E., Stephensen, C.B., Stanhope, K.L., Havel, P.J., Boyer, B., 2011, Associations of obesity with triglycerides and C-reactive protein are attenuated in adults with high red blood cell eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Eur J Clin Nutr* 65, 808-817.

- Marcos, A., Nova, E., Montero, A. 2003. Changes in the immune system are conditioned by nutrition (Nature Publishing Group), pp. S66-S69.
- Matarese, G., Procaccini, C., De Rosa, V., Horvath, T.L., La Cava, A., 2010, Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. *Trends in Molecular Medicine* 16, 247-256.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., Buck, A., Curtis, J.D., Dibble, J.P., Huston, G., Tighe, M., Hamada, H., Sell, S., Dutton, R.W., 2009, IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge. *The Journal of Immunology* 182, 7353.
- Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H., 2008, Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 8, 685-698.
- O'Garra, A., Vieira, P.L., Vieira, P., Goldfeld, A.E., 2004, IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 114, 1372-1378.
- OMS, 1998, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, In: Bangkok, Thailand.
- OMS 2011. *Obesidad y sobrepeso*.
- Parikh, S.J., Edelman, M., Uwaifo, G.I., Freedman, R.J., Semega-Janneh, M., Reynolds, J., Yanovski, J.A., 2004, The relationship between obesity and serum 1, 25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 1196.
- Priehl, B., Pilz, S., Wolf, M., Tomaschitz, A., Obermayer-Pietsch, B., Graninger, W., Pieber, T.R., 2010, Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases? *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 12, 136.
- Ribeiro Rodrigues, R., Resende Co, T., Rojas, R., Toossi, Z., Dietze, R., Boom, W., Maciel, E., Hirsch, C., 2006, A role for CD4+ CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology* 144, 25-34.
- Rodríguez Trinidad I., F.B.J., Cucó Pastor G., Biarnés Jordà E. y Arija Val V., 2008, Validación de un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario corto: reproducibilidad y validez. *Nutricion Hospitalaria* 23, 23:242-252.
- Roitt, I.M., Delves, P.J., 2001, *Roitt's essential immunology*. Wiley-Blackwell, 234-235 pp.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* 155, 1151.
- Scheffold, A., Hühn, J., Höfer, T., 2005, Regulation of CD4+ CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL) two to tango. *European journal of immunology* 35, 1336-1341.
- Shekelle, R.B., Lepper, M., Liu, S., Maliza, C., Raynor, W.J., Jr., Rossof, A.H., Paul, O., Shryock, A.M., Stamler, J., 1981, Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric study. *Lancet* 2, 1185-1190.
- Shi, H., Norman, A.W., Okamura, W.H., Sen, A., Zemel, M.B., 2001, 1 , 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *The FASEB Journal* 15, 2751.
- Smith, A.G., Sheridan, P.A., Tseng, R.J., Sheridan, J.F., Beck, M.A. 2009. Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus (Blackwell Publishing), p. 268.
- Smith, T.R.F., Kumar, V. 2008. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression (Elsevier), pp. 337-342.
- Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J.W.C., Damoiseaux, J., Hupperts, R., 2009, Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 4, e6635.
- Švec, P., Vászrhelyi, B., Pászthy, B., Körner, A., Kovács, L., Tulassay, T., Treszl, A., 2007, Do regulatory T cells contribute to Th1 skewness in obesity? *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 115, 439–443.
- Toubi, E., Shoenfeld, Y., 2010, The role of vitamin D in regulating immune responses. *The Israel Medical Association journal: IMAJ* 12, 174.
- Wahl, S.M., Swisher, J., McCartney-Francis, N., Chen, W., 2004, TGF-β: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *Journal of leukocyte biology* 76, 15.
- Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- - secreting Th3 regulatory cells (John Wiley & Sons), pp. 207-214.
- Williams, M.A., Bevan, M.J. 2007. Effector and memory CTL differentiation (Annual Reviews).

- Womack, J., Tien, P.C., Feldman, J., Shin, J.H., Fennie, K., Anastos, K., Cohen, M.H., Bacon, M.C., Minkoff, H., 2007, Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* 56, 998-1004.
- Ye, P., Li, J., Wang, S., Xie, A., Sun, W., Xia, J., 2010, Eicosapentaenoic Acid Disrupts the Balance Between Tregs and IL-17+ T Cells Through PPAR [gamma] Nuclear Receptor Activation and Protects Cardiac Allografts. *Journal of Surgical Research*.
- Yun, J., Jialal, I., Devaraj, S., 2010, Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *British Journal of Nutrition*, 1-7.
- Zheng, Y., Rudensky, A., 2007, Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature immunology* 8, 457-462.
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E. 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (*Annual Reviews*), pp. 445-489.