

**Diversidad y frecuencia clonal del repertorio de linfocitos B periféricos en niños con obesidad**

Cesar López Rivas\*, Humberto Valdovinos Torres\*, Juan Téllez Sosa, Elizabeth Ernestina Godoy Lozano\*, Ana Isabel Burguete García\*, Jesús Martínez Barnetche\*

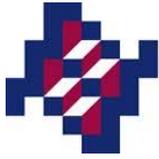
\*Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Cuernavaca, Morelos, México

Corresponding author:  
Jesús Martínez Barnetche  
+52 (777) 329 30 00 Ext. 2732  
E-mail: [jmbarnet@insp.mx](mailto:jmbarnet@insp.mx) (JMB)  
Instituto Nacional de Salud Pública  
Departamento de Inmunología  
Universidad No. 655 Colonia Santa María Ahuacatlán, Cerrada Los Pinos y Caminera  
C.P. 62100  
Cuernavaca, Mor. México

Firma del tutor:

---

Jesús Martínez Barnetche



Instituto Nacional de Salud Pública  
Escuela de Salud Pública de México

Presenta para obtener el título de Maestro en Ciencias de la Salud con Área de  
concentración en Nutrición

Generación 2013-2015

Modalidad de titulación: Artículo

DIVERSIDAD Y FRECUENCIA CLONAL DEL REPERTORIO DE LINFOCITOS B  
PERIFÉRICOS EN NIÑOS CON OBESIDAD

L.N. Cesar López Rivas

Comité de Tesis  
Director: Dr. Jesús Martínez Barnetche  
Asesor: Dra. Ana Isabel Burguete García

Cuernavaca Morelos, 4 de Agosto de 2015

## **Diversidad y frecuencia clonal del repertorio de linfocitos B periféricos en niños con obesidad**

López-Rivas C., Valdovinos-Torres H., Godoy-Lozano E.E., Téllez-Sosa J.,  
Burguete-García A. I., Martínez-Barnetche J.

---

### **Resumen**

#### **Introducción:**

La obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial. Adicionalmente al elevado consumo calórico y las alteraciones metabólicas, la obesidad se ha asociado con inflamación sistémica y otras alteraciones inmunológicas, incluyendo alteraciones en la producción de anticuerpos. Sin embargo, el impacto de la obesidad en el repertorio de linfocitos B se desconoce.

#### **Objetivo:**

Describir las diferencias de la diversidad y la frecuencia clonal del repertorio de linfocitos B en niños con obesidad en comparación con niños con peso normal.

#### **Métodos:**

Análisis transversal por secuenciación masiva de RNA de la región variable de la cadena pesada de linfocitos de B de sangre periférica de 8 niños de 6 a 10 años de edad.

#### **Resultados:**

En el análisis bivariado no existen diferencias significativas en la diversidad del repertorio de linfocitos evaluada como entropía de Shannon, pero si en la frecuencia clonal del uso del segmento V para IgG en las familias IGHV1 e IGHV3 ( $p < 0.05$ ), siendo mayor la frecuencia de la familia IGHV3 y menor de la IGHV1 en el grupo de obesos. En la regresión cuantil, estas asociaciones se observan particularmente para segmentos del grupo clonal de IGHV3 ( $p < 0.05$  y  $p < 0.10$ ) para IgG. Exceptuando a los segmentos IGHV1-2 y IGHV3-23 ( $p < 0.05$ ), las asociaciones se pierden con el ajuste por edad, sexo y energía.

#### **Conclusión:**

Existen diferencias en el uso del segmento V en el isotipo IgG entre el grupo de niños con normopeso y obesos, mas no en los índices de diversidad clonal..

**Palabras Clave:** Escolares, Linfocitos B, Obesidad, IGHV.

## **Introducción**

La obesidad es un problema de salud pública creciente en México y el mundo (1). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 reveló que la prevalencia de sobrepeso y obesidad combinada por sexo en niños de edad escolar (de 5 a 11 años) fue de 34.4%, del cual 14.6% corresponden a obesidad. Además se observó una tendencia positiva en estas prevalencias a través de los años (2). La obesidad es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas destacando diabetes, enfermedades cardiovasculares como cardiopatías, accidente cerebrovascular e hipertensión, ocasionando diversas alteraciones en el organismo. Adicionalmente, se ha demostrado que existen alteraciones sobre la respuesta inmune a diferentes niveles asociadas a la obesidad, entre ellas, un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas, influir en el desenlace de las mismas y modificar la respuesta ante la vacunación (3, 4). Diversos estudios han demostrado que la obesidad es capaz de inducir alteraciones que promuevan el cambio de isotipo en los linfocitos B (5-7), sugiriendo que este cambio está asociado con cambios en la selección y expansión clonal del repertorio de estos linfocitos, lo cual se relaciona directamente con la respuesta inmune ante un reto antigénico. La infancia es una etapa crítica para el desarrollo de inmunidad a retos infecciosos. Sin embargo, pesar de la evidencia que apoya la asociación entre obesidad y alteraciones inmunológicas, desconocemos sus efectos en niños. El presente estudio tiene por objetivo describir la diversidad y frecuencia clonal del repertorio de linfocitos B en niños de 6 a 10 años con obesidad y compararlo con el de niños con peso normal.

## **Material y Métodos**

Estudio transversal donde se emplearon las muestras de 8 sujetos (4 controles los cuales debieran cumplir con la característica de peso normal y 4 problema los cuales debieran cumplir con la característica de obesidad), los cuales fueron seleccionados por aleatorización simple de un total de 1119 muestras del banco de biológicos del proyecto original titulado “Evaluación de la interacción entre el consumo de macronutrientes y el perfil de la microbiota del colon distal y su asociación con obesidad infantil”. Los objetivos y diseño del estudio se han reportado previamente (8). Para ser elegibles, las muestras seleccionadas debieron tener entre 6 y 10 años de edad y contar con información completa dentro del estudio original. Las muestras entre ambos grupos fueron diferenciadas con un código que no fue revelado a las personas que realizaron el análisis.

La actividad física fue medida a través de un cuestionario de actividad física y sedentarismo de 40 preguntas el cual fue previamente validado. Este incluía preguntas sobre la frecuencia (días por semana) y duración (nunca, minutos por día u horas por día) de actividades deportivas o de tiempo de recreación (9).

La información sobre dieta se obtuvo a partir de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos semicuantitativo (CFCA) que incluía un total de 107 preguntas con 10 opciones de respuesta de frecuencia que van desde “nunca” a “6 o más veces al día”.

Las medidas antropométricas fueron evaluadas por personal estandarizado obteniendo peso (kg) (báscula con precisión de 0.1kg, marca SECA, Alemania)

talla (cm) medida con un estadímetro portátil SECA, índice de masa corporal (IMC, kg/m<sup>2</sup>) para cada participante. El estatus nutricional de cada participante fue determinado calculando el puntaje Z de IMC por edad y sexo a través de la herramienta informática WHO Anthro Plus (Versión 1.0.4, 2009). Los participantes con un puntaje Z de IMC por edad y sexo entre -0.99 y 0.99 fueron clasificados como normales y aquellos con un puntaje Z de IMC  $\geq 2$  fueron clasificados como obesos.(10)

Se obtuvieron cartas de consentimiento informado por parte de los padres y de asentimiento por parte de los infantes. El estudio fue aprobado por los comités de Investigación, de ética y de bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública.

### **Obtención de genotecas**

Se aislaron células mononucleadas de las muestras de sangre utilizando la técnica de “buffy coats”, los cuales fueron almacenados a -80°C. A partir de estas se purificó ARN total mediante la técnica estándar de extracción de ARN con TRIzol® Reagent (Cat.Num. 15596) utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. A partir del ARN, se generó ADN de cadena complementaria (cDNA) por medio de la técnica de Amplificación Rápida de Terminaciones de cDNA con dirección 5' (RACE 5'). A partir del cDNA se realizó la síntesis de 2 genotecas por individuo de la región variable de la cadena pesada de los linfocitos B (una para IgM y una para IgG) a través de amplificación mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con 8 oligonucleótidos sentido con adaptador A y código de barras en el extremo 5' y 1 oligonucleótido antisentido con adaptador B en el exón

1 de la región constante de IGHG e IGHM en el extremo 3'(Supl. Fig. 1). Una vez realizada la amplificación, se purificaron los amplicones y se realizó secuenciación masiva con el sistema 454 GS FLX + Roche®.

Los datos obtenidos de la secuenciación masiva del cDNA fueron analizados mediante la “tubería” de análisis basada en la herramienta bioinformática de programación y análisis estadístico R denominada “ImmuneDiversity” previamente descrita (11), la cual de manera semi-automatizada asigna el uso de segmentos V y J, grupos clonales, estima la frecuencia clonal, la tasa de hipermutación somática y realiza el análisis estadístico de la diversidad molecular de los linfocitos B.

Después de obtenida la información mediante la tubería se evaluó la frecuencia clonal por el uso de segmentos V y J y la diversidad clonal usando como *proxy* la entropía de Shannon. Esto se realizó para cada individuo a nivel de grupos clonales y de linajes. Para el análisis de uso de segmentos V se utilizaron las frecuencias relativas normalizadas por el total de lecturas obtenidas.

### **Análisis Estadístico**

Se realizaron estadísticas descriptivas de los sujetos de estudio. Como variable independiente se consideró la obesidad en forma dicotómica (si / no) y como variable dependiente la diversidad mediante el índice de Shannon y la frecuencia clonal utilizando la frecuencia relativa del el uso segmento V de la región variable agrupado por familias y segmentos en tres niveles de profundidad: general, grupo clonal y linajes. Ambas variables se manejaron como continuas.

Para evaluar las diferencias en la diversidad y frecuencia entre grupos (obesos vs peso normal), se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para cada isotipo (IgM e IgG). De forma paralela se realizó un análisis de diversidad mediante curvas de rarefacción para evaluar la cantidad de grupos clonales nuevos por cada cien secuencias obtenidas y se calculó la p de tendencia.

Finalmente se realizó un análisis de regresión cuantil de medianas para obesidad y su relación con la diversidad y frecuencia clonal incluyendo variables de ajuste la edad, sexo, consumo de energía.

## **Resultados**

La media de edad en los niños con normopeso fue de 7.5 años y de 8.5 años en los niños con obesidad. Las características generales de los sujetos por IMC se muestran en la tabla 1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para en las características demográficas y de salud entre ambos grupos exceptuando por IMC y energía ( $p < 0.05$ ). El grupo de obesos tiene mayor IMC y menor consumo de calorías. En la tabla 1 también se muestran las características más relevantes en cuanto a frecuencia y diversidad del repertorio de linfocitos B.

Para identificar uso preferencial de segmentos resultantes de selección clonal, se realizó el análisis comparativo del uso de uso de familias V a nivel general entre el grupo normal y con obesidad, el cual no reveló diferencias estadísticamente significativas a nivel de familias para el isotipo IgM, pero a nivel de segmento se observa un uso preferencial del segmento IGHV1-18 en el grupo de obesidad

( $p < 0.05$ ). Para el isotipo IgG se observa un uso preferencial de la familia IGHV1 a nivel general, por grupos clonales y por linajes en el grupo normal y de manera específica, un uso preferencial del segmento IGHV1-2 a nivel general, por grupos clonales y por linajes ( $p = 0.02$ ). Para el grupo de obesidad se observa un uso preferencial marginalmente significativo de la familia IGHV3 a nivel general y por linaje ( $p = 0.08$ ), y un uso preferencial significativo a nivel de grupo clonal ( $p = 0.02$ ). De esta misma familia se observa un uso preferencial para los segmentos IGHV3-23 y IGHV3-7 los cual son significativos a nivel general ( $p = 0.02$  y  $p = 0.04$ ), por grupos clonales ( $p = 0.02$  para ambos segmentos) y por linaje a excepción del segmento IGHV3-7 el cual es marginalmente significativo en este nivel ( $p = 0.02$  y  $p = 0.08$ ). (Tabla 1).

El análisis comparativo de los índices de Shannon en grupos clonales y de linajes entre el grupo normal y con obesidad del isotipo IgM e IgG no mostró diferencias ( $p > 0.05$ ) (Tabla 1) (Supl. Fig. 1).

Las características de los resultados de la secuenciación de cada una de las genotecas se muestran en la tabla 2. En el grupo con obesidad, se observa una mayor cantidad de secuencias tanto crudas como filtradas y tanto para grupos clonales como por linaje.

En el análisis comparativo de las curvas de rarefacción en grupos clonales y linajes entre el grupo con peso normal y con obesidad del isotipo IgM e IgG no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo es posible ver una tendencia al comparar ambos grupos (Sup. Fig. 2).

Para el análisis de regresión cuantil de medianas con las variables de ajuste (edad, sexo y energía), la mayoría de las diferencias de uso de V entre el grupo de normopeso y el grupo con obesidad observadas anteriormente se pierden, únicamente permaneciendo significativa las diferencias en el uso del segmento IGHV1-69 ( $p=0.05$ ) para el isotipo IgM ; y el uso de la familia IGHV1 a nivel de grupo clonal ( $p=0.07$ ) y en los segmentos IGHV1-2 ( $p=0.04$ ) e IGHV3-23 ( $p=0.04$ ) para el isotipo IgG (Tabla 3).

## **Discusión**

Debido a que el estudio de la obesidad y su impacto sobre la respuesta inmune es relativamente nuevo, particularmente en niños, existe poca evidencia sobre el efecto de esta en etapas tempranas sobre el repertorio de linfocitos B o incluso si este repertorio modifica en algún modo el riesgo de obesidad en los niños.

El efecto de la modificación de la frecuencia en el uso de segmentos B en niños ha sido poco estudiado, sin embargo, se sabe por modelos murinos así como en estudios en adultos que pueden afectar el riesgo de desarrollo y/o complicaciones de otras enfermedades(12-14).

En nuestro estudio encontramos que no existen diferencias en la diversidad del repertorio de linfocitos B de niños con obesidad en comparación con el de niños con normopeso la cual fue evaluada a través de la entropía de Shannon, sin embargo, se observan diferencias para la frecuencia clonal del uso de segmentos IGHV, tanto para las familias IGHV1 e IGHV3 como para segmentos específicos dentro de las mismas. La asociación entre obesidad y la frecuencia clonal se

diluye o pierde después del ajuste por energía, edad y sexo, este efecto de dilución podría deberse a que las diferencias observadas, más que estar dadas por la obesidad *per se*, pueden ser explicadas por otros factores asociados a la obesidad.(15-17).

El ajuste por lípidos no reveló modificaciones en los resultados (datos no mostrados) esto es inconsistente con estudios previos en los que se ha observado que en sujetos con obesidad hay un aumento de autoanticuerpos contra LDL oxidados respecto a sujetos con normopeso(18), esto podría deberse al tamaño de muestra reducido o la falta de profundidad en el número de secuencias obtenidas por cada genoteca, estudios futuros con un mayor tamaño muestral podrían acrecentar la evidencia respecto a esta asociación

Se ha descrito que un uso preferencial del segmento IGHV1-2 está asociado al linfoma de zona marginal esplénico(12). La zona marginal es una estructura presente en el bazo enriquecida en una subpoblación de linfocitos B implicados en el reconocimiento de bacterias que ingresan por vía hematológica (19). Nosotros identificamos una reducción significativa en la frecuencia de uso del segmento IGHV1-2 en el grupo con obesidad, aún después del ajuste, lo cual sugiere alteraciones en el compartimento de la zona marginal en obesidad.

Por otra parte se ha descrito una relación entre el uso del segmento IGHV3-7 y la aparición de factor reumatoide el cual se asocia con el desarrollo de artritis reumatoide.(14) Además se demostró una asociación entre el índice de masa corporal y la aparición de artritis reumatoide.(20) En nuestros resultados se

observa un aumento del uso del segmento IGHV3-7 en el grupo de obesos, aun ajustando por edad, sexo y consumo de energía lo cual coincide con lo descrito previamente.

La muestra estudiada es pequeña por lo que la ausencia de diferencias en la diversidad del repertorio pudo deberse a falta de poder para observarlo. El número de secuencias obtenidas en cada genoteca fue baja y esto podría haber limitado la capacidad de poder observar diferencias en los índices de diversidad, curvas de rarefacción y uso de segmentos V en los diferentes niveles de análisis. Al ser un análisis del tipo transversal es imposible determinar causalidad debido a la falta de temporalidad del estudio.

A pesar del reducido número de sujetos de estudio y de secuencias obtenidas, es posible observar diferencias estadísticamente significativas en el uso de segmentos así como una tendencia en la curvas de rarefacción al realizar la comparación entre ambos grupos. Este es uno de los primeros estudios que analiza las diferencias de repertorio de linfocitos B en niños con obesidad y niños con normopeso.

## **Conclusión**

No existen diferencias en la diversidad medido por la entropía del índice de Shannon del repertorio de linfocitos B de sangre periférica en niños con obesidad, en comparación con niños con peso normal, pero si se observan diferencias en la frecuencia del uso preferencial de segmentos V tanto por familia como por grupo clonal y linaje. Es necesario realizar más estudios que incluyan mayor tamaño de

muestra así como distintos grupos de edad para poder obtener mayor evidencia que respalde estos resultados y sus implicaciones a nivel de vacunación y de riesgo, desarrollo y tratamiento de enfermedades.

## Bibliografía

1. Barquera S., Campos Nonato I., Hernández Barrera L., J. RD. Encuesta Nacional de Nutrición 2012 - Evidencia para la política pública en salud - Obesidad en adultos: los retos de la encuesta abaj2012 7 de Abril de 2014. Available from: <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ObesidadAdultos.pdf>.
2. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A C, NLR-MMH-ÁME. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
3. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(6):485-93.
4. Kim Y-H, Kim J-K, Kim D-J, Nam J-H, Shim S-M, Choi Y-K, et al. Diet-induced obesity dramatically reduces the efficacy of a 2009 pandemic H1N1 vaccine in a mouse model. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(2):244-51.
5. Sheridan P, Paich H, Handy J, Karlsson E, Hudgens M, Sammon A, et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity*. 2012;36(8):1072-7.
6. Sämpi M, Veneskoski M, Ukkola O, Kesäniemi YA, Horkko S. High plasma immunoglobulin (Ig) A and low IgG antibody titers to oxidized low-density lipoprotein are associated with markers of glucose metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(5):2467-75.
7. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nature medicine*. 2011;17(5):610-7.
8. Cárdenas-Cárdenas LM, Burguete-García AI, Estrada-Velasco BI, López-Islas C, Peralta-Romero J, Cruz M, et al. Leisure-time physical activity and cardiometabolic risk among children and adolescents. *Jornal de pediatria*. 2015;91(2):136-42.
9. Hernandez B, Gortmaker SL, Laird NM, Colditz GA, Parra-Cabrera S, Peterson KE. [Validity and reproducibility of a questionnaire on physical activity and non-activity for school children in Mexico City]. *Salud Pública Méx*. 2000;42(4):315-23. Epub 2000/10/12. Validez y reproducibilidad de un cuestionario de actividad e inactividad física para escolares de la ciudad de México.
10. (WHO) WHO. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva 2009.
11. Cortina-Ceballos B, Godoy-Lozano EE, Samano-Sanchez H, Aguilar-Salgado A, Velasco-Herrera Mdel C, Vargas-Chavez C, et al. Reconstructing and mining the B cell repertoire with ImmuneDiversity. *mAbs*. 2015;7(3):516-24. Epub 2015/04/16.
12. Arcaini L, Zibellini S, Passamonti F, Rattotti S, Lucioni M, Invernizzi R, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009;42(3):286-91.

13. Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D, Capello D, Forconi F, Marconi D, et al. Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(2):620-8.
14. Hoogeboom R, Wormhoudt TA, Schipperus MR, Langerak AW, Dunn-Walters DK, Guikema J, et al. A novel chronic lymphocytic leukemia subset expressing mutated IGHV3-7-encoded rheumatoid factor B-cell receptors that are functionally proficient. *Leukemia*. 2013;27(3):738-40.
15. Wang Y. Is obesity associated with early sexual maturation? A comparison of the association in American boys versus girls. *Pediatrics*. 2002;110(5):903-10.
16. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *Journal of autoimmunity*. 2012;38(2):J282-J91.
17. Cuenca-García M, Ortega FB, Ruiz JR, Labayen I, Moreno LA, Patterson E, et al. More physically active and leaner adolescents have higher energy intake. *The Journal of pediatrics*. 2014;164(1):159-66. e2.
18. Sanches LB, da Silva IT, Paz AF, Fisberg M, Cintra IP, Villar BS, et al. Anti-oxLDL autoantibodies and their correlation with lipid profile and nutritional status in adolescents. *Jornal de pediatria*. 2008;84(3):258-63. Epub 2008/06/07.
19. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. *Inmunobiologia de Janeway*. 7 ed. México 2009.
20. Qin B, Yang M, Fu H, Ma N, Wei T, Tang Q, et al. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis research & therapy*. 2015;17(1):86.

Fig.1.Oligonucleótidos utilizados para la obtención de amplicones para la secuenciación masiva

Región	Nombre	Secuencia
IgG <i>Fw</i>	PAIgGHu1	5' <i>CGTGATACCGATGGGCCCTTGGTG</i> 3'
	PAIgGHu2	5' <i>ACGCGTACCGATGGGCCCTTGGTG</i> 3'
	PAIgGHu3	5' <i>ACTCATACCGATGGGCCCTTGGTG</i> 3'
	PAIgGHu4	5' <i>AGACTAACCGATGGGCCCTTGGTG</i> 3'
IgM <i>Fw</i>	PAIgMHu1	5' <i>CGTGATAAAGGGTTGGGGCGGATGCACT</i> 3'
	PAIgMHu2	5' <i>ACGCGTAAAGGGTTGGGGCGGATGCACT</i> 3'
	PAIgMHu3	5' <i>ACTCATAAAGGGTTGGGGCGGATGCACT</i> 3'
	PAIgMHu4	5' <i>AGACTAAAAGGGTTGGGGCGGATGCACT</i> 3'
Universal	FPAmPB	5' <i>CAGTGGTATCAACGCAGAGT</i> 3'

IgG: Inmunoglobulina del isotipo G, IgM: Inmunoglobulina del isotipo M, Fw: Oligonucleótido sentido. En fuente cursiva se muestra el código de barra, en fuente normal se muestra el oligonucleótido.

Tabla 1: Características generales de la población por IMC

Variables	Normal n=4	Obesidad n=4	p
<b>Generales</b>			
Sexo %M	50	25	1.00
%F	50	75	
Edad(a)	7 (6-9)	7,5 (6-9,5)	0.45
<b>Salud</b>			
IMC(kg/m2)	14.94 (13.74-15.86)	23.57(20.22-28.93)	<b>0.02</b>
Actividad física (Mets/hora/sem)	2267 (1680-3277)	1551 (375-2983)	0.48
Energía	3419 (2547-4547)	2067.255 (1853-2637)	0.08
<b>Diversidad IgM</b>			
I Shanon GC	5.66 (3.83-7.26)	6.27 (5.91-7.13)	0.56
I Shanon Linaje	6.60 (5.13-7.93)	7.36 (7.22-7.75)	0.56
<b>Diversidad IgG</b>			
I Shanon GC	4.72 (4.26-5.58)	5.08 (4.23-5.62)	1.00
I Shanon Linaje	5.70 (5.26-6.91)	6.37 (5.40-6.89)	0.77
<b>FRU de V IgM</b>			
IGHV1	0.35 (0.25-0.54)	0.39 (0.31-0.53)	1.00
1.18	0.01 (0.001-0.019)	0.04 (0.30-0.65)	<b>0.02</b>
1.2	0.26 (0.11-0.52)	0.22 (0.08-.35)	0.77
1.69	0.03 (0.01-0.05)	0.08 (0.05-0.12)	0.14
<b>FRU de V IgG</b>			
IGHV1	0.41 (0.40-0.55)	0.30 (0.27-0.36)	<b>0.04</b>
1.18	0.04 (0.02-0.05)	0.02(0.01-0.02)	0.24
1.2	0.26 (0.24-0.42)	0.13 (0.04-0.20)	<b>0.02</b>
1.69	0.05 (0.04-0.07)	0.06 (0.05-0.17)	0.38
IGHV3	0.36 (0.21-0.47)	0.50 (0.39-0.53)	<b>0.08</b>
3.21	0.06 (0.02-0.09)	0.08 (0.06-0.13)	0.38
3.23	0.02 (0.03-0.04)	0.09 (0.07-0.13)	<b>0.02</b>
3.7	0.05 (0.03-0.06)	0.09 (0.07-0.10)	<b>0.04</b>
<b>FRU de V GC IgG</b>			
IGHV1	0.36 (0.34-0.46)	0.25 (0.21-0.31)	<b>0.04</b>
1.2	0.19 (0.16-0.34)	0.11 (0.05-0.13)	<b>0.02</b>
1.69	0.05 (0.04-0.07)	0.06 (0.05-0.10)	0.38
IGHV3	0.33 (0.27-0.38)	0.46 (0.45-0.48)	<b>0.02</b>
3.23	0.03 (0.01-0.04)	0.08 (0.07-0.09)	<b>0.02</b>
3.53	0.01 (0.01-0.02)	0.03 (0.028-0.037)	<b>0.02</b>
3.7	0.06 (0.03-0.07)	0.08 (0.08-0.09)	<b>0.02</b>
<b>FRU de V L IgG</b>			
IGHV1	0.40 (0.36-0.55)	0.28 (0.25-0.32)	<b>0.02</b>
1.2	0.25 (0.23-0.41)	0.10 (0.03-0.18)	<b>0.02</b>
IGHV3	0.37 (0.21-0.51)	0.53 (0.44-0.58)	<b>0.08</b>
3.23	0.009 (0.004-0.03)	0.10 (0.09-0.14)	<b>0.02</b>
3.7	0.05 (0.03-0.05)	0.10 (0.07-0.12)	<b>0.02</b>
3.53	0.006 (0.004-0.01)	0.03 (0.01-0.05)	<b>0.08</b>

F: femenino, M: masculino, IMC: índice de masa corporal. (a): Edad en años. FRU: Frecuencia Relativa de Uso. GC: Grupo clonal. L: Linaje. I Shanon: Índice de Shanon. Los valores están expresados en % para las variables categóricas, en medianas y rango intercuartilico para las variables continuas. El valor de p se calculo con la prueba exacta de Fisher para variables categóricas y U de Mann Whitney para las variables continuas.

Tabla 1: Resumen de datos de secuenciación

	Isotipo				Media
	IgM		IgG		
	Peso normal	Obesidad	Peso normal	Obesidad	
Secuencias					
Crudas	40502	61606	70722	119855	18293 ± 12051
Secuencias					
Filtradas	23476	36316	22419	50516	8295 ± 5208
Grupos clonales					
(Únicos)	5657	7440	3999	4609	1357 ± 814
Linajes (Únicos)	11071	17421	10040	14699	3327 ± 1767

Los valores se presentan en el número total de secuencias obtenidas.

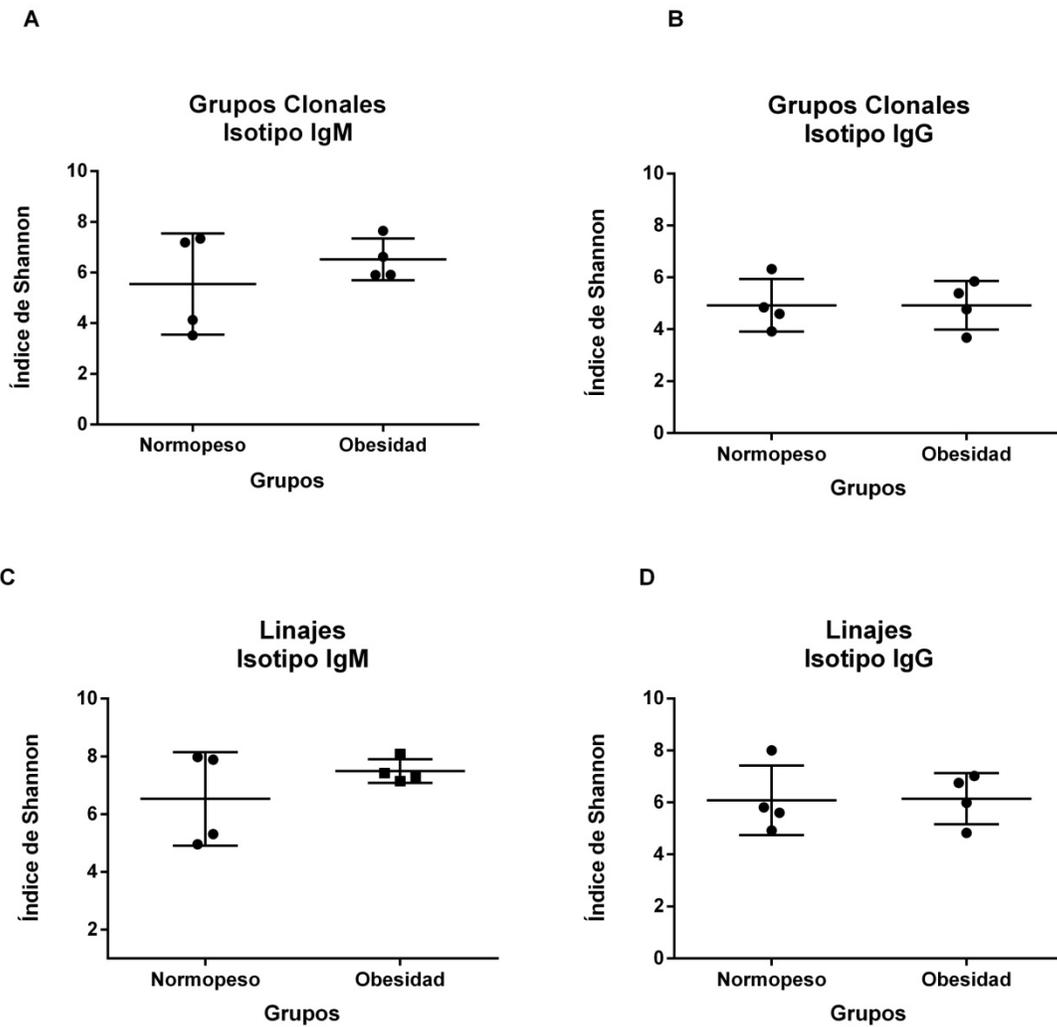
Tabla 3: Regresión cuantil de medianas con ajuste de variables

Variable	Coef	IC	Valor p	Coef**	IC	Valor p
<b>Diversidad IgG</b>						
I Shanon GC	-0.07	(-3.3-3.20)	0.96	0.007	(-0.05 -0.06)	0.69
I Shanon Linaje	0.18	(-2.97-3.33)	0.89	-0.39	(-7.44-6.66)	0.87
<b>Diversidad IgM</b>						
I Shanon GC	2.49	(-3.69- 8.67)	0.36	3.35	(-26.27-32.97)	0.74
I Shanon Linaje	2.11	(-2.56- 6.79)	0.31	2.49	(-5.06-10.04)	0.37
<b>FRU de V IgM</b>						
IGHV1	-0.04	(-0.67-0.59)	0.88	-0.31	(-2.76-2.14)	0.71
1.18	0.031	(-0.00005-0.06)	0.05	0.07	(-0.33-0.469)	0.62
1.2	-0.25	(-1.08-0.57)	0.48	-0.50	(-1.08-0.574)	0.43
1.69	0.05	(-.04-0.14)	0.20	0.04	(-0.00002-0.08)	<b>0.05</b>
<b>FRU de V IgG</b>						
IGHV1	-0.08	(-0.26-0.09)	0.29	-0.14	(-3.67-3.38)	0.91
1.18	-0.01	(-0.06-0.04)	0.58	-0.02	(-0.06-0.03)	0.30
1.2	-0.18	(-0.45-0.09)	0.15	-0.23	(-0.79-0.32)	0.27
1.69	0.02	(-0.06-0.11)	0.51	-0.003	(-0.81-0.80)	0.99
IGHV3	0.24	(-0.25-0.73)	0.28	0.02	(-0.07-0.12)	0.45
3.21	0.05	(-0.08-0.19)	0.37	0.02	(-0.12-0.16)	0.72
3.23	0.09	(-0.01-0.19)	<b>0.08</b>	0.03	(-0.19-0.24)	0.73
3.7	0.03	(-0.03-0.10)	0.26	0.05	(0.00007-0.099)	<b>0.05</b>
<b>FRU de V GC IgG</b>						
IGHV1	-0.10	(-0.29-0.09)	0.24	-0.19	(-.41-0.03)	<b>0.07</b>
1.2	-0.10	(-0.25-0.04)	0.14	-0.20	(-0.37- -0.01)	<b>0.041</b>
1.69	0.01	(-0.08-0.08)	0.95	-0.02	(-0.09-0.05)	0.385
IGHV3	0.18	(-0.01-0.38)	<b>0.06</b>	0.16	(-1.12-1.45)	0.71
3.23	0.06	(0.002-0.12)	<b>0.04</b>	0.06	(0.006-0.11)	<b>0.04</b>
3.53	0.022	(0.004-0.040)	<b>0.02</b>	0.01	(-0.02-0.04)	0.36
3.7	0.04	(-0.007-0.08)	<b>0.09</b>	0.04	(-0.25-0.34)	0.67
<b>FRU de V L IgG</b>						
IGHV1	-0.12	(-0.28-0.043)	0.12	-0.17	(-0.53-0.18)	0.23
1.2	-0.11	(-0.37-0.15)	0.33	-0.25	(-0.67-0.17)	0.16
IGHV3	0.30	(-0.22-0.83)	0.20	0.07	(-2.00-2.14)	0.92
3.23	0.10	(0.003-0.21)	<b>0.04</b>	0.05	(-0.16-0.26)	0.52
3.7	0.04	(-0.03-0.11)	0.24	0.06	(-0.03-0.15)	0.13
3.53	0.04	(-0.02-0.10)	0.18	0.04	(-0.31-0.39)	0.75

FRU: Frecuencia Relativa de Uso. GC: Grupo clonal. L: Linaje. I Shanon: Índice de Shanon. IC: Intervalo de confianza. Coef: Coeficiente. Los valores se encuentran expresados en medianas y rango intercuartilico. \*\*Modelo ajustado por edad, sexo y energía.

## Suplemento

Fig.1 Índice de Shannon por grupos clonales y por linajes de los isotipos IgM e IgG.



Se grafican medianas con rango intercuartílico. Diferencias no significativas de acuerdo a la prueba de U de Mann Whitney.

Fig. 2 Curvas de rarefaccion por grupo clonal y linajes del isotipo IgM e IgG

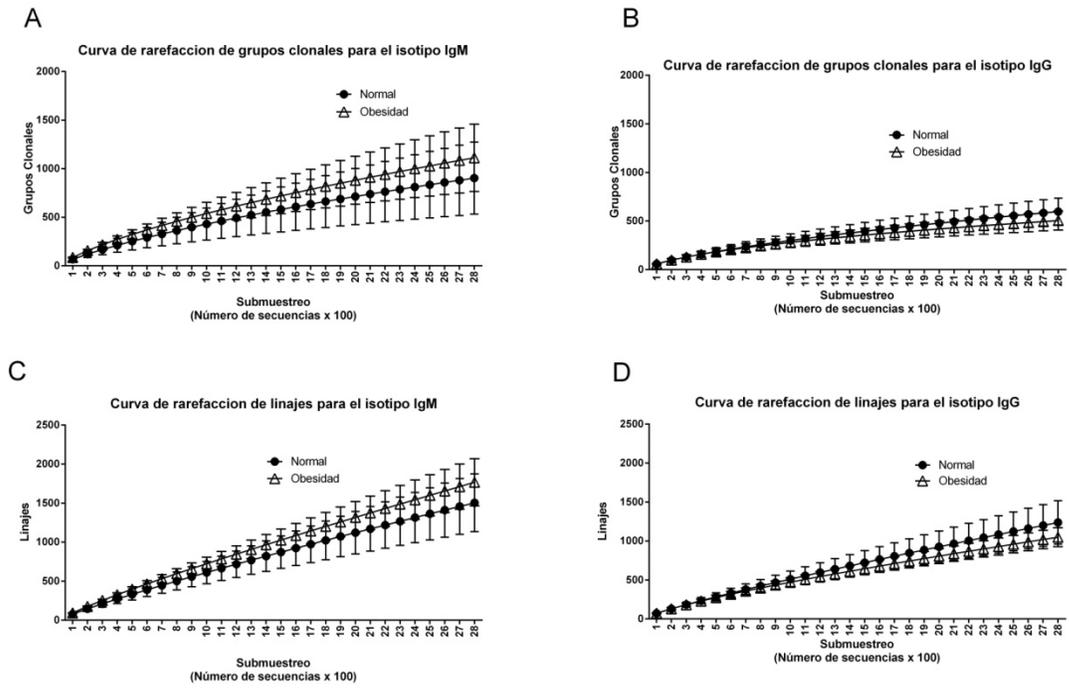


Fig. 3 Frecuencias relativas a nivel general de familias de V del isotipo IgM e IgG

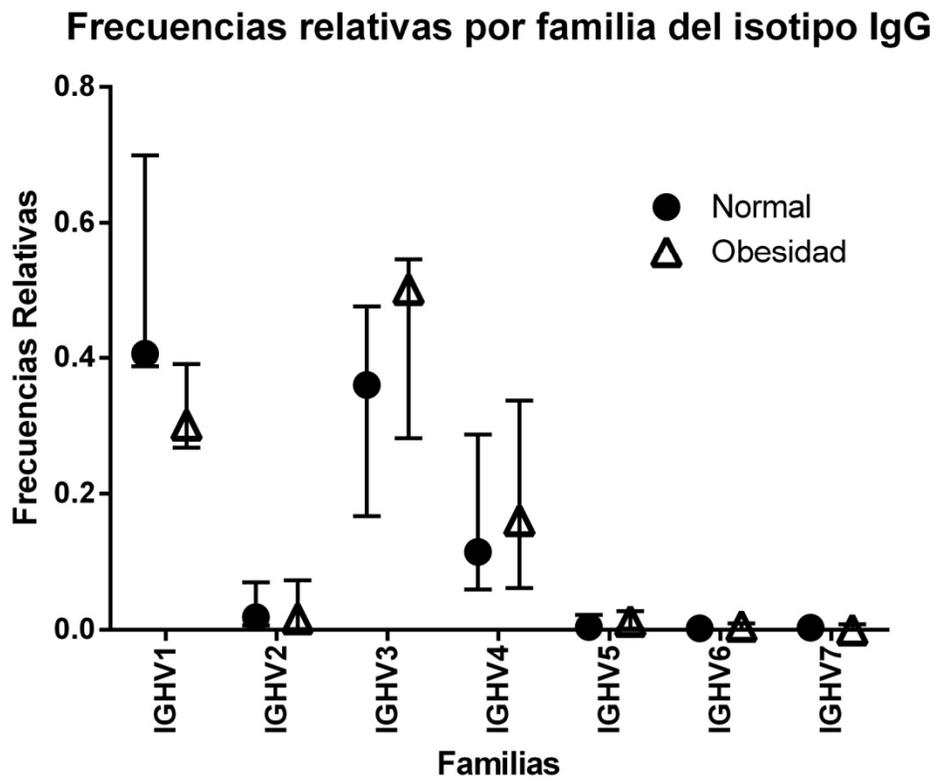
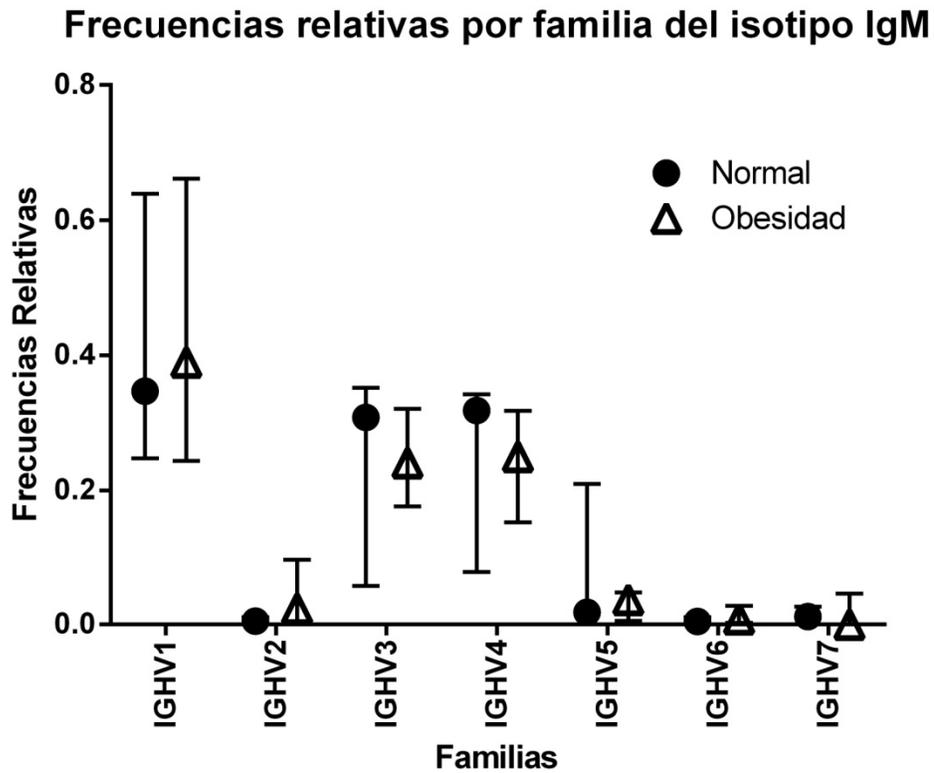


Fig 4. Frecuencias relativas a nivel general de segmentos de V por isotipo IgM e IgG

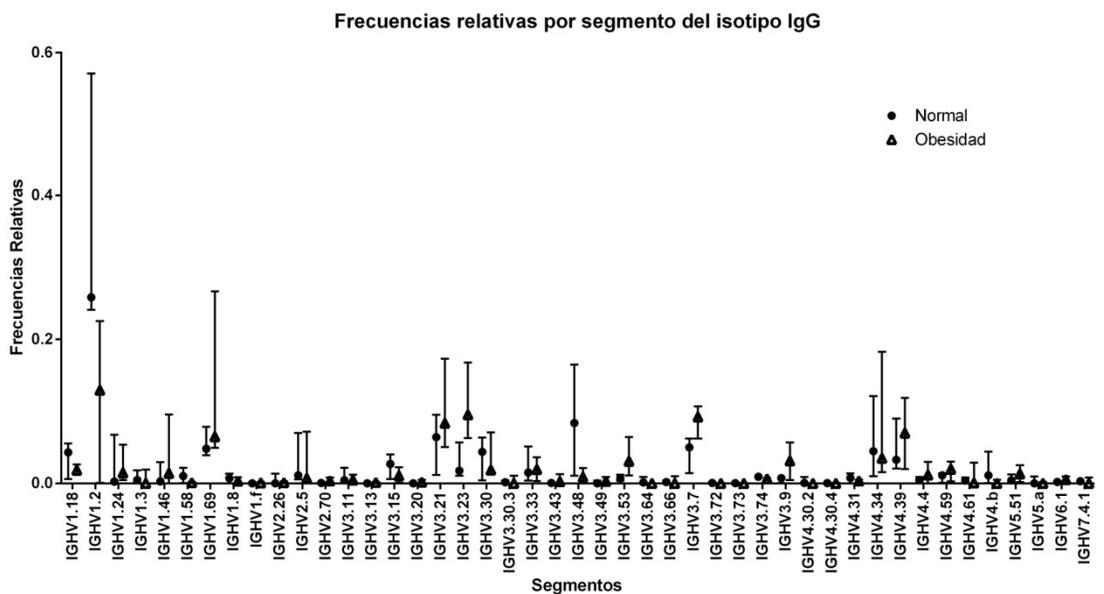
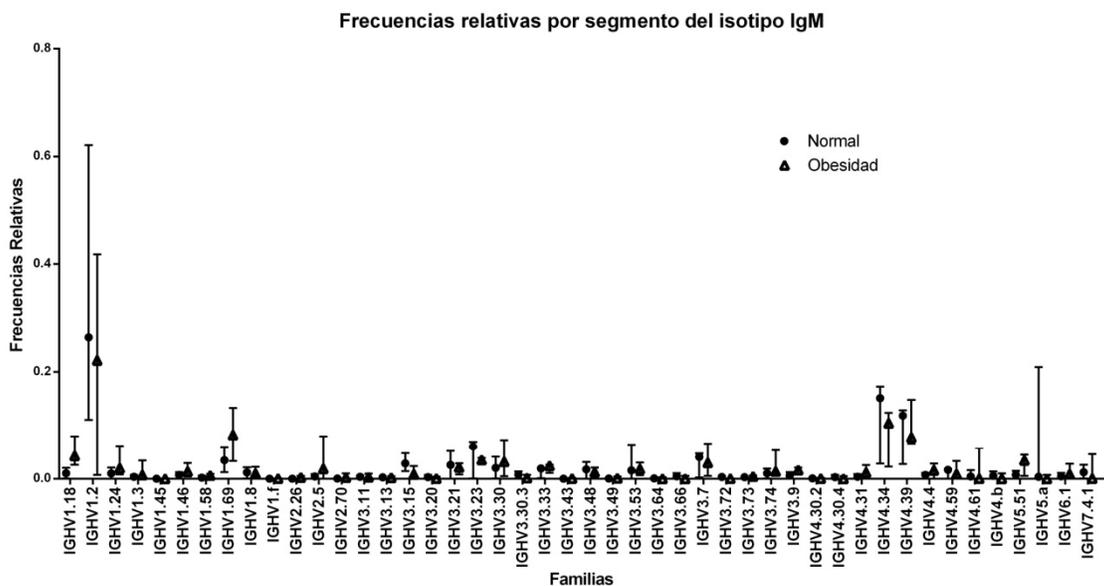
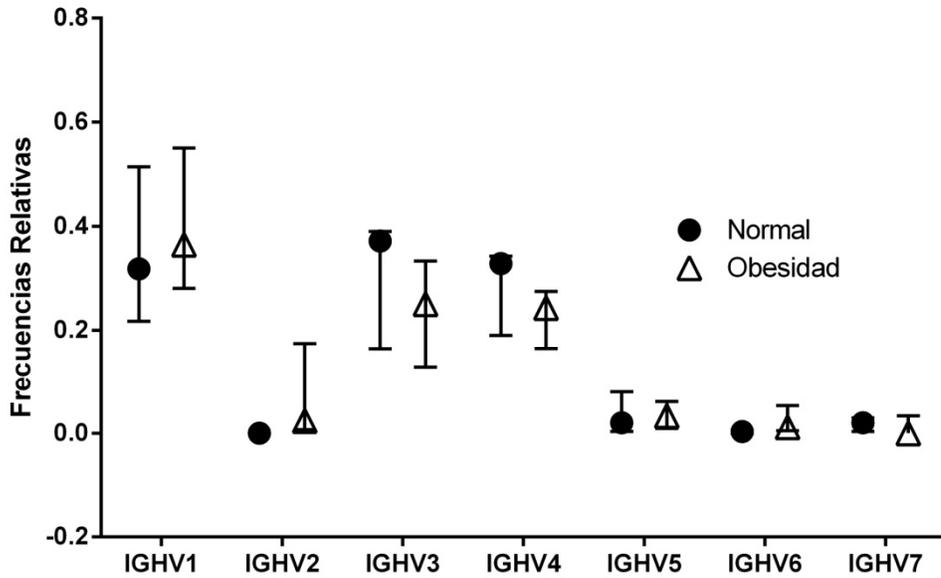


Fig. 5 Frecuencias relativas por grupo clonal de familias de V del isotipo IgM e IgG

**Frecuencias relativas por grupo clonal por familias de V del isotipo IgM**



**Frecuencias relativas por grupo clonal por familias de V del isotipo IgG**

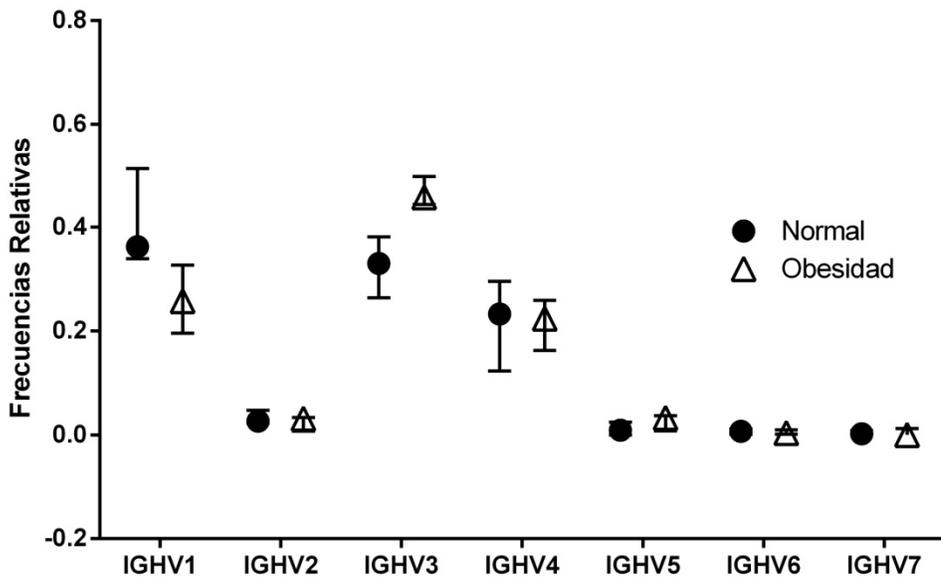


Fig 6. Frecuencias relativas por grupo clonal de segmentos de V por isotipo IgM e IgG

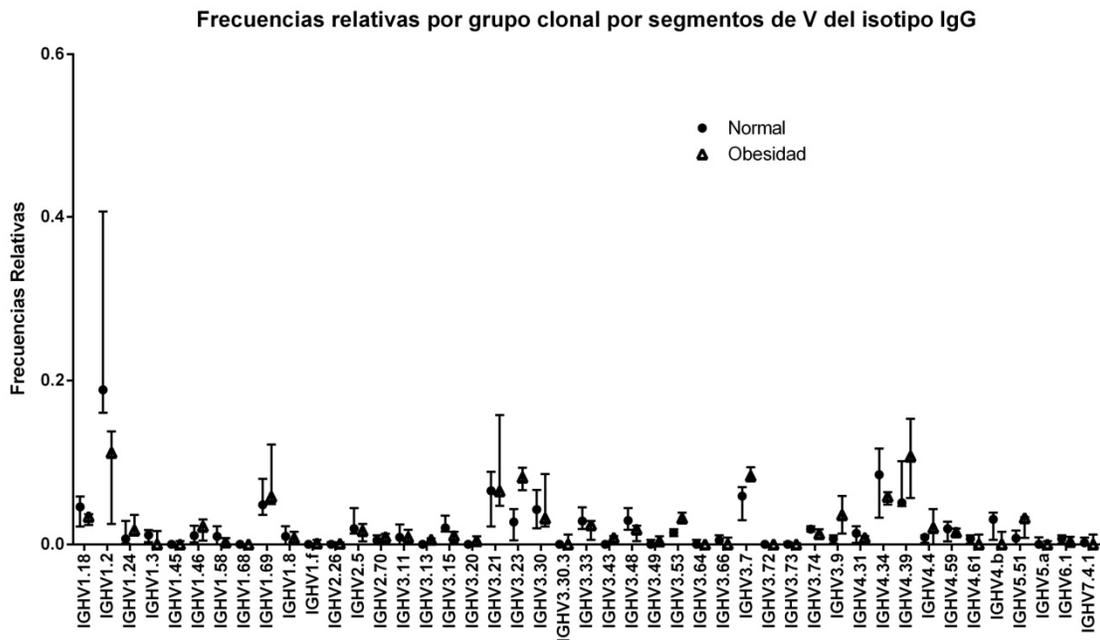
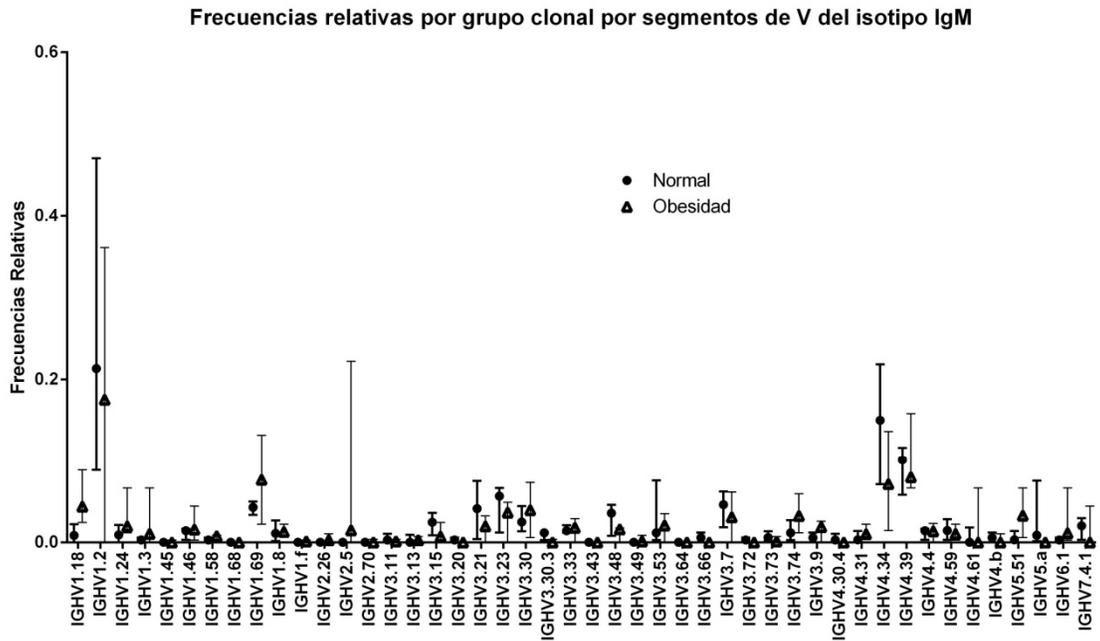


Fig. 7 Frecuencias relativas por linaje de familias de V por isotipo IgM e IgG

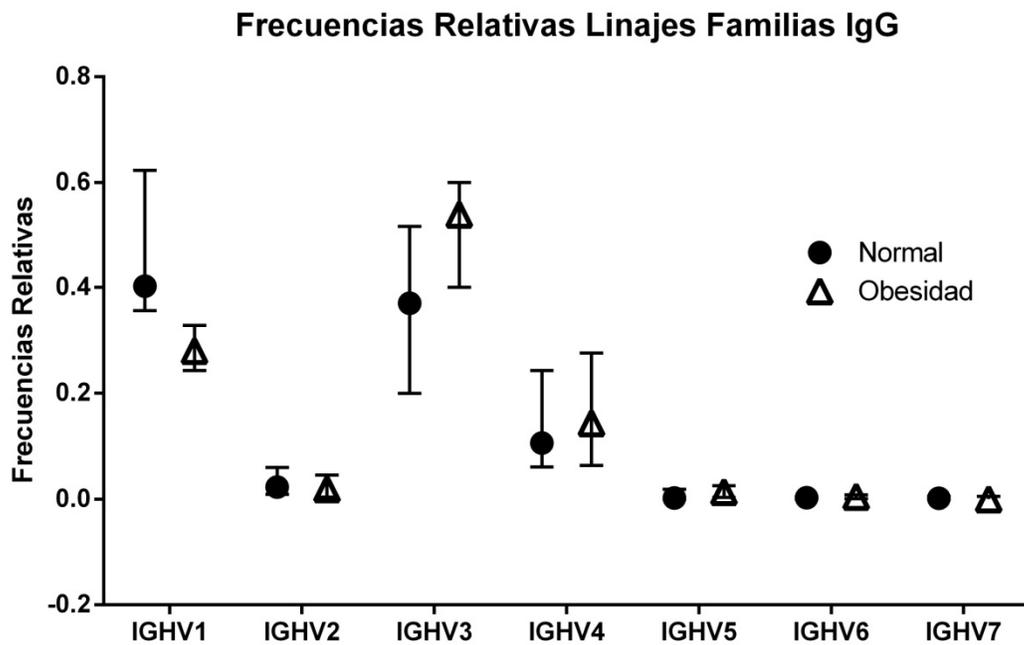
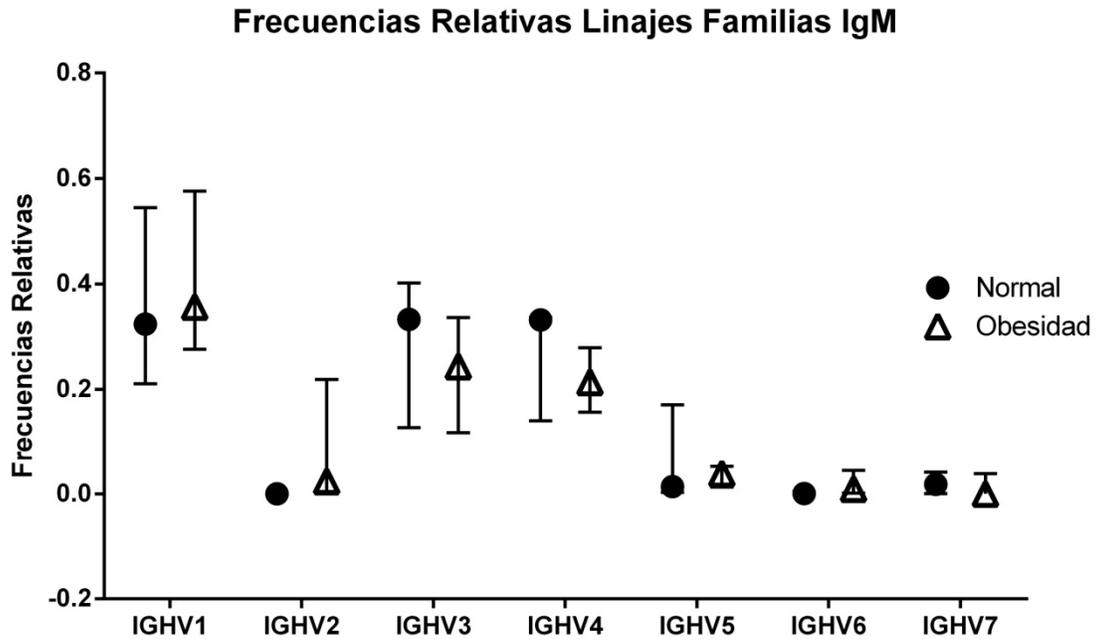


Fig 8. Frecuencias relativas por linaje de segmentos de V por isotipo IgM e IgG

