



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efecto de la obesidad materna sobre la expresión de
Lipocalina 2 en las gónadas de ratas Sprague Dawley”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

PRESENTA

CASTREJÓN HERNÁNDEZ EDGAR YAEL

ASESOR:

Dr. Elsa Verónica De la Chesnaye Caraveo

ASESOR INTERNO

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de la obesidad materna sobre la expresión de Lipocalina 2 en las gónadas de ratas Sprague Dawley.

Que presenta el pasante: Edgar Yael Castrejón Hernández

Con número de cuenta: 311074091 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Reconocimientos

El presente trabajo se realizó en la unidad de investigación médica en enfermedades metabólicas ubicada en el hospital de cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI durante el periodo de diciembre 2017-2018, bajo la tutoría de la Dra. Elsa Verónica De La Chesnaye Caraveo.

Agradecimientos

Dedico este trabajo a todas las personas que me apoyaron en este camino y que creyeron en mí.

A mis padres por su apoyo incondicional durante todos mis estudios, por ese gran esfuerzo que dieron para poder darme el sustento económico que requería, por nunca dejarme solo y siempre buscar mi bien ante todo.

A mis hermanos por apoyarme en mis días difíciles de estudiante, por estar ahí a mi lado cuando los necesitaba.

A mi segunda madre Guillermina López por haberme ofrecido su casa y todas las comodidades para que yo pudiera seguir con mis estudios.

A Hugo Castrejón por ser mi gran ejemplo a seguir, por los consejos, regaños y por ser mi guía en este largo camino emprendido.

A Rebeca López por ser la persona más importante que conocí en la universidad y que gracias a ella me encuentro en este gran termino, por saber levantarme cuando más lo necesitaba y por ser esa guía y ese motor para salir adelante.

A mis amigos por hacer menos tedioso este camino, por haber compartido experiencias conmigo y por el apoyo que siempre nos tuvimos ante los problemas.

Agradezco a la vida por darme la oportunidad de poder llevar esta etapa con salud y de la mejor manera y por haber conocido a grandes personas en el camino.

A mis maestros que me compartieron un gran conocimiento y que dejaron una gran huella en mí.

A mi asesora por ser la guía de este gran trabajo y por ayudarme a terminar este ciclo.

A mi alma mater, mi universidad, mi facultad ya que en ellas me desarrolle como estudiante y me dieron la oportunidad de ser quien soy ahora y que siempre agradeceré y honrare.

Por último dedico este trabajo a mí mismo, que este trabajo sea el incentivo que me ayude a seguir adelante como hasta ahora y que me recuerde que ningún camino es imposible si trabajas duro y en equipo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE IMAGENES	10
RESÚMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Alteraciones en el tejido adiposo	14
2.2 Citocinas	15
2.3 Dimorfismo sexual en la obesidad	15
2.4 Lipocalina 2 (Lcn 2)	15
2.5 Lcn 2 en el metabolismo	18
2.6 Expresión de la lipocalina 2 en las gónadas	18
2.7 Metaloproteasas	18
2.8 Gónadas	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. HIPÓTESIS	20
5. METODOLOGÍA	20
5.1 Desarrollo de un modelo de obesidad mediante la administración de sacarosa a ratas hembras de la cepa Sprague Dawley	20
5.2 Sacrificio de ratas y extracción de gónadas de las crías	21
5.3 Obtención y purificación de RNA	21
5.4 Obtención de cDNA por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	22
5.5 PCR semicuantitativa	24
5.6 Inmunohistoquímica	28
5.7 Densidades opticas	30

6. RESULTADOS	31
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1. Complicaciones en la descendencia por obesidad materna	39
7.2. Expresión del transcrito de la Lipocalina-2 (<i>Lcn-2</i>) y su receptor (<i>24p3R</i>) en gónadas de crías de ratas control y obesas	39
7.3. Localización de la lipocalina 2 y su receptor en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas 30 dpn.	39
8. CONCLUSIONES	44
9. PERSPECTIVAS	44
10. REFERENCIAS	45
ANEXOS	50
1. Reactivos y soluciones	50
2. Oligonucleótidos y anticuerpos	51
3. Fundamento de técnicas	52

ABREVIATURAS

C/EBP	CCAAT / proteína beta de unión al potenciador (del inglés "CCAAT/Enhancer-Binding Protein)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés, "Deoxyribonucleic Acid")
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario al RNA mensajero (del inglés, "Complementary Deoxyribonucleic Acid")
dpc	Días post coito
dpn	Días post nacimiento
FSH	Hormona folículo estimulante (del inglés, "Follicle-Stimulating Hormone")
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés, "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase")
HPG	Hipotalamo-Hipofisis-Gonada (del inglés, "hypothalamic-pituitary-gonadal")
IFNγ	Interferón gamma
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
KDa	Kilodaltons
Lcn-2	Lipocalina 2 (del inglés, "Lipocalin-2")
Mmp-9	Metaloproteínasa de matriz 9 (del inglés, "Matrix Metalloproteinase-9")
NK-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, "Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells")

ng	Nanogramos
NGAL	Gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocalina (del inglés, “Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin”)
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés, “Phosphate Buffered Saline”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del en inglés, “Polymerase Chain Reaction”)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés, “Ribonucleic Acid”)
mRNA	RNA mensajero (del inglés, “ Messenger Ribonucleic Acid”)
RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, “Reverse transcription polymerase chain reaction”)
SD	Sprague Dawley
TBE	Buffer Tris, borato y EDTA
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, “tumor necrosis factor alpha”)
24p3	Lipocalina 2
24p3R	Receptor de Lipocalina 2 (del inglés, “24p3 Receptor”)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado pro inflamatorio.	14
Figura 2.	Estructura de la proteína Lipocalina 2	16
Figura 3.	Biomarcadores	17
Figura 4.	Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	53
Figura 5.	Pasos de la transcripción reversa	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Preparación de muestras para RT-PCR	23
Tabla 2.	PCR para la amplificación de un fragmento de la <i>Lcn-2</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa colectadas a los 21 dpc	24
Tabla 3.	PCR para la amplificación de un fragmento del receptor <i>24p3R</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 21 dpc	24
Tabla 4.	PCR para la amplificación de un fragmento de <i>GAPDH</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 21 dpc	25
Tabla 5.	PCR para la amplificación de un fragmento de la <i>Lcn-2</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa colectadas a los 30 dpc	25
Tabla 6.	PCR para la amplificación de un fragmento del receptor <i>24p3R</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 30 dpc	26
Tabla 7.	PCR para la amplificación de un fragmento de <i>GAPDH</i> utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 30 dpc	26

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.	Patrones de electroforesis de productos de PCR para la <i>Lcn-2</i> en geles de agarosa al 1.5%	30
Imagen 2.	Intensidades relativas del gen para la <i>Lcn-2</i> en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas con 21 dpc y 30 dpn	31
Imagen 3.	Patrones de electroforesis de productos de PCR para el receptor <i>24p3R</i> en geles de agarosa al 1.5%	32
Imagen 4.	Intensidades relativas del gen para el receptor <i>24p3R</i> en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas con 21 dpc y 30 dpn	33
Imagen 5.	Inmunohistoquímica para la lipocalina 2 (<i>Lcn-2</i>) en tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x	34
Imagen 6.	Cuantificación de las unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para la <i>Lcn-2</i> en el tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn	34
Imagen 7.	Inmunohistoquímica para el receptor <i>24p3R</i> en tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x	35
Imagen 8.	Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para el receptor <i>24p3R</i> en el tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa	35
Imagen 9.	Inmunohistoquímica para la lipocalina 2 (<i>Lcn-2</i>) en tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x	36
Imagen 10.	Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para la <i>Lcn-2</i> en el tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa	36
Imagen 11.	Inmunohistoquímica para el receptor <i>24p3R</i> en tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x	37
Imagen 12.	Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para el receptor <i>24p3R</i> en el tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa	37

RESÚMEN

La obesidad es una enfermedad que desencadena diversas alteraciones a nivel metabólico generando patologías asociadas como lo son la Diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemias, cáncer, etc. Existen estudios que demuestran que la obesidad materna es un factor importante que contribuye al desarrollo de obesidad y problemas metabólicos en la descendencia. La obesidad es caracterizada por un cúmulo de tejido adiposo y la desregulación de dicho tejido conduce a un estado pro-inflamatorio, el tejido adiposo es el encargado de generar unas moléculas llamadas adipocinas las cuales juegan un papel importante dentro de los estados inflamatorios, dentro de estas adipocinas se encuentra la lipocalina 2 la cual es una adipocina de 178 aminoácidos que existe en tres formas moleculares, la lipocalina 2 tiene propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y la secreción de dicha adipocina está regulada por la actividad de la inflamación.

Se demostró que la condición de obesidad materna genera un ambiente que conduce a un proceso metabólico alterado sobre la descendencia teniendo como consecuencia modificaciones como la disminución en la expresión génica y proteica de la lipocalina 2 y su receptor 24p3R en las gónadas de las crías de ratas obesas a los 21 días post coito y a los 30 días post nacimiento por medio de las técnicas de PCR semicuantitativa e Inmunohistoquímica, lo cual genera alteraciones a nivel estructural de las gónadas (ovario y testículo) probablemente por las funciones de regulación del proceso apoptótico que tiene la lipocalina 2 o por su función en el remodelado de las estructuras en dichas gónadas.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica; que al igual que la hipertensión; o la diabetes desencadena alteraciones a nivel metabólico. El síndrome metabólico está asociado con la desregulación en la síntesis de adipocinas y quimiocinas en el tejido adiposo (Gustafson, Hammarstedt, Andersson, Smith; 2007). Se ha demostrado que la obesidad materna es un factor importante que contribuye al desarrollo de obesidad y alteraciones metabólicas en la descendencia (Ornellas, Souza, Lacerda, Aguila. 2013). Existen estudios en animales que indican que la nutrición prenatal puede inducir cambios epigenéticos en el genoma de los fetos, lo que resulta en la alteración de la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y por consiguiente en el desarrollo de obesidad a largo plazo (Seki, Williams, Vuguin, Charron. 2012).

La lipocalina-2 (*Lcn-2*), o 24p3 en murinos es un factor relacionado estrechamente con la obesidad y las complicaciones metabólicas. (Wang, Lam, Kraegen, Sweeney, Zhang, Tso, Chow, Wat, Yu Xu, Hoo, AiminXu. 2007). Burns, Owens, Ogbonna, Nilson, Matzuk. en 2003 realizaron un estudio donde identificaron cambios en la expresión del gen que codifica para la *Lcn-2* en gónadas de ratones nulos para la porción β de la hormona folículo estimulante ($FSH\beta$) observando una disminución en la expresión del gen *Lcn-2* y en ratones nulos para $FSH\beta$ que al ser suplementados con gonadotropina se observó un aumento en la expresión del gen de la *Lcn-2*; lo cual sugiere que la hormona folículo estimulante tiene un papel importante en la expresión de esta adipocina. La obesidad puede afectar las gónadas indirectamente a través de los efectos que las adipocinas ejercen sobre el eje hipotálamo-hipofisis-gónada. (Tsatsanis, Dermitzaki, Avgoustinaki, Malliaraki, Mytaras, Margioris. 2015); es decir la alteración en la concentración de adipocinas sobre las hormonas gonadotrópicas secretadas desde la hipófisis como la FSH, a su vez afectan la maduración gonadal y la esteroidogénesis. (Prieto, Velázquez. 2002). En este trabajo se propone estudiar el efecto que tiene la condición de obesidad materna sobre la expresión de la lipocalina-2 en las gónadas de las crías con 21 días post coito (21 dpc) y 30 días post natales (30

dpn) de edad. Como ya se menciono estudios preliminares muestran que a los 21 dpc existe una disminución en la expresión de la lipocalina en los ovarios de las crías de ratas obesas en comparación con la expresión de esta adipocina en los ovarios de las crías de ratas control. (De la Chesnaye. 2018). En la cepa Sprague Dawley la maduración sexual ocurre a los 30 días postnatales (Gullace F, s/f). Por otro lado, un estudio demostró que la concentración de los niveles plasmáticos de lipocalina 2 presentan un perfil diferencial entre mujeres y hombres sanos (De la Chesnaye. 2016), por lo cual se ha decidido evaluar si en gónadas de ratas existe una diferencia en la expresión de la lipocalina-2 por genero.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Alteraciones en el tejido adiposo

La obesidad es un problema de salud pública que se asocia con una elevada morbimortalidad por patologías asociadas como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemias, esteatohepatitis, cáncer, etc. (Gómez, Rodríguez. 2008). La obesidad se define como la acumulación de tejido adiposo por encima de un límite tal que determina un incremento en el riesgo de padecer dichas patologías asociadas. (Argente J. 2006). El tejido adiposo es un órgano secretor activo que sintetiza una gran cantidad de moléculas, conocidas como adipocinas, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), leptina, adiponectina, lipocalina y resistina que pueden mediar muchos cambios del síndrome metabólico (Recasens, Cart , Fernandez. 2004).

La des-regulación del tejido adiposo conduce a un estado pro-inflamatorio que conlleva una disminución en la síntesis de adiponectina y un incremento de la síntesis de IL-6 y TNF- α , estas citocinas conducen a una alteración en la diferenciación preadipocítica y a la promoción del almacenamiento de lípidos ectópicos (Gustafson, Hammarstedt , Andersson , Smith. 2007).

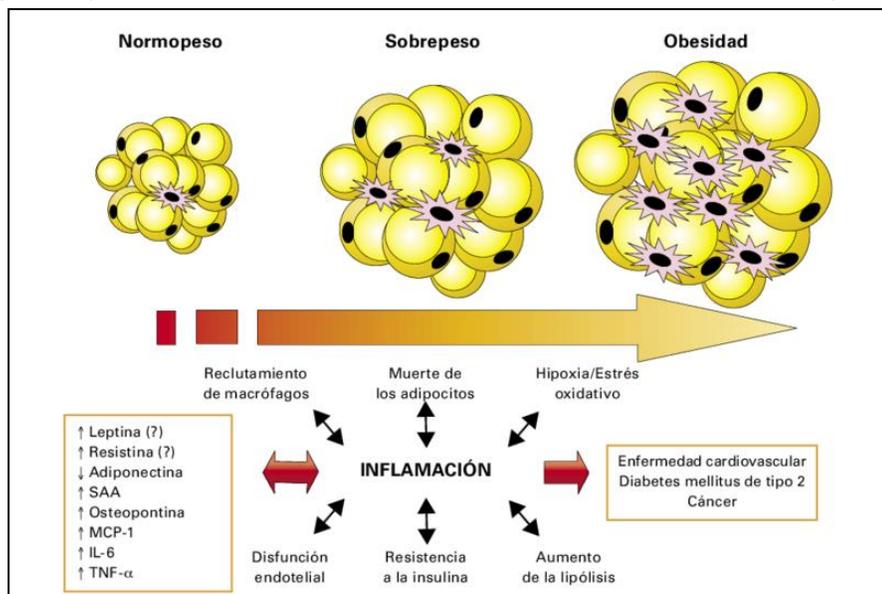


Figura 1. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado pro inflamatorio (Gómez, et. al; 2008).

2.2 Citocinas

Las citocinas se pueden dividir en diferentes clases funcionales. Por ejemplo aquellas que son factores de crecimiento de linfocitos, otras funcionan como moléculas que modulan la inflamación actuando como pro-inflamatorias o anti-inflamatorias, mientras que otras citocinas actúan en la respuesta inmune ante antígenos. Dentro de esta clasificación se encuentran las adipocinas, que su principal característica es que se producen en el tejido adiposo. Las adipocinas tienen un papel en las enfermedades relacionadas con la obesidad. En la diabetes tipo 2, las citocinas derivadas del tejido graso ocasionan la pérdida progresiva de las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos (Argente, J. 2006).

2.3 Dimorfismo en obesidad

En humanos la grasa corporal se distribuye durante la pubertad y en este proceso existe una diferencia entre géneros debido a la acción hormonal. A nivel mundial existe una mayor prevalencia del desarrollo de enfermedades asociadas a la obesidad en los hombres que en las mujeres debido a la regulación que tienen los estrógenos en el metabolismo femenino. De esta forma, los estrógenos promueven la lipólisis en el cuerpo. Sin embargo esta diferencia entre sexos de las concentraciones plasmáticas de las hormonas sexuales, también se presentan en los niveles plasmáticos de diversas adipocinas como: leptina, adiponectina, colescistoquinina y lipocalina 2 (De la Chesnaye, *et. al.*; 2016)

2.4 Lipocalina 2

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), también conocida como lipocalina-2 (Lcn-2) en humanos o *Lcn-2* o 24p3 en murinos es una proteína de 178 aminoácidos que existe en tres formas moleculares, incluyendo un monómero de 25 kDa, un homodímero de 45 kDa y un heterodímero de 135 kDa acoplado con la metaloproteínasa de matriz 9 (Mmp-9). (Lippi, Meschi, Nouvenne, Mattiuzzi, Borghi. 2014), el gen *Lcn-2* se localiza en el locus cromosómico

9q34.11.(Abella, Scotece , Conde , Gómez , Lois , Pino , Reino , Lago , Mobasheri , y OresteGualillo.. 2015).

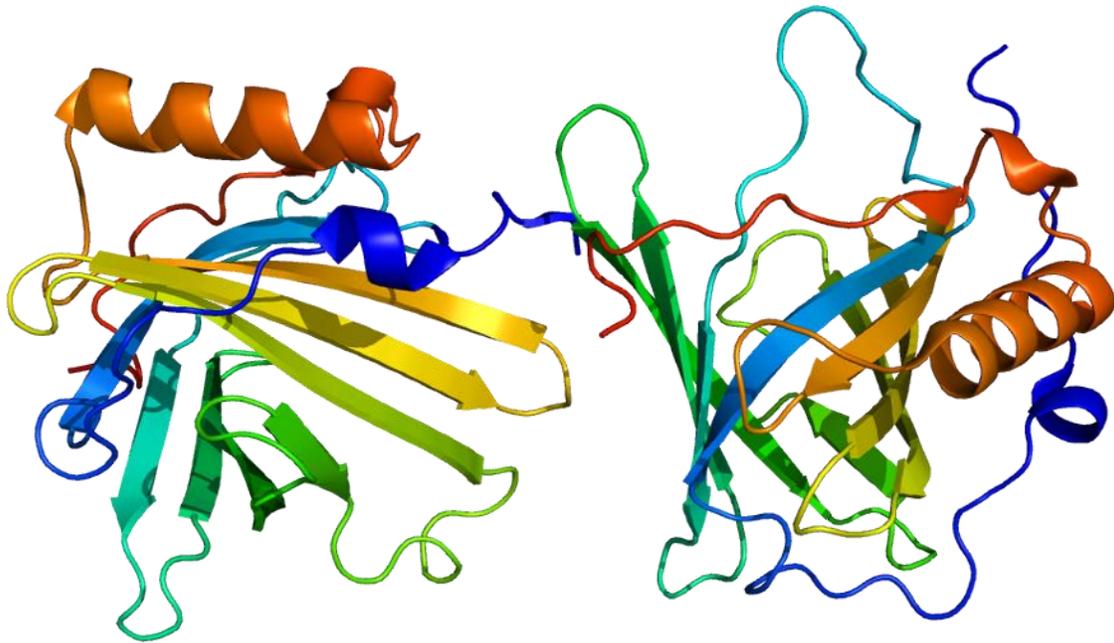


Figura 2. Estructura de la proteína Lipocalina 2. (https://en.wikipedia.org/wiki/Lipocalin2#/media/File:Protein_LCN2_PDB_1dfv.png)

La Lcn-2 se localiza en diferentes tejidos como las células inmunitarias el hígado, el bazo y los riñones de ratón, en la medula ósea y los tejidos expuestos a microorganismos así como en el útero y en las gónadas de diferentes especies. Y participa de forma importante en diferentes procesos como la apoptosis de células hematopoyéticas, el transporte de ácidos grasos y de hierro y la modulación de la inflamación y la homeostasis metabólica.

La actividad inflamatoria regula la síntesis y la secreción de la Lcn-2, por lo que se le han adjudicado tanto propiedades pro-inflamatorias como anti-inflamatorias

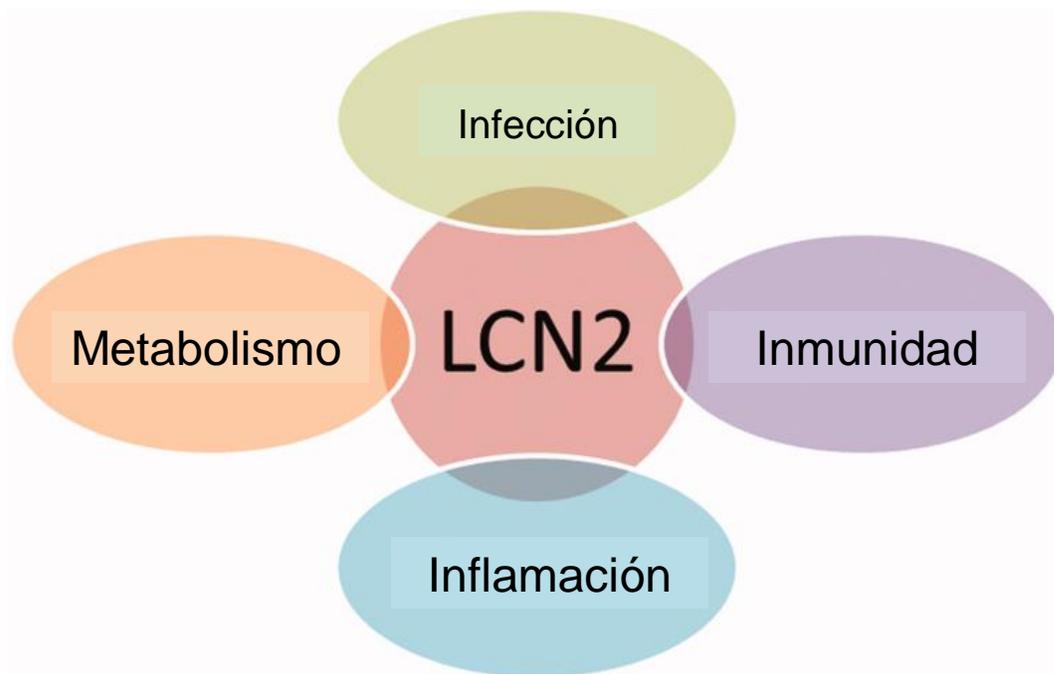


Figura 3. Biomarcadores. 20(8): 565–571.

La lipocalina participa de forma crucial en la remodelación vascular e influye en la actividad de la metaloproteinasa de matriz 9 (Mmp-9) a través de una unión disulfuro que forma un complejo heterodimerico; la presencia de este complejo se asocia con estadios clínicos de cáncer avanzado y se considera que desempeña un papel clave como predictor de la invasión tumoral y la metástasis independiente del pronóstico carcinogenico (Mohammed, Seleim, Abdalla, Sharada, Abdel Wahab, 2013).

De igual forma, la lipocalina 2 está implicada en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la apoptosis por privación de IL-3 y el transporte de hierro. Varios estudios encontraron que 24p3 puede unirse al hierro e internalizarlo en las células (Goetz *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2003). La 24p3 no tiene una capacidad intrínseca para interactuar con el hierro, lo hace a través de un sideróforo de pequeño peso molecular que se asocia con esta adipocina 24p3 (Goetz *et al.*, 2002Yang *et al.*, 2002). Tras la captación celular de 24p3 por endocitosis, el hierro unido se libera, lo que resulta en un aumento de la

concentración de hierro intracelular y en la subsecuente regulación génica (Yang et al., 2002).

2.5 Lcn 2 en metabolismo

El promotor del gen para a lipocalina-2 posee los sitios de unión para dos factores de transcripción, NF- κ B y la proteína de unión CCAAT/enhancer (C/EBP) (Shen, 2012). Lo que sugiere que regulan la actividad transcripcional de este gen en el tejido adiposo puede estar asociada con la inflamación y la obesidad y puede tener una función de remodelación del tejido adiposo. Se ha demostrado que la expresión y secreción de Lcn 2 está inducida por dos citocinas proinflamatorias, IFN γ y TNF α , en adipocitos murinos y humanos cultivados. Zhao en 2014 demostró que IFN γ y TNF α indujeron la expresión y secreción de *Lcn-2 in vivo*.

2.6 Lipocalina en gónadas

De la Chesnaye en 2008 identificaron por medio de microarreglos de DNA en el ovario de ratones la expresión del gen de la lipocalina-2 con 4 días postnatales. Más aun, la lipocalina-2 y su receptor también están presentes en las gónadas de ratas de la cepa SD. Dicha expresión es sexualmente dimorfica en las etapas perinatal y puberal (De la chesnaye. 2018).

2.7 Metaloproteasas

Las metaloproteasas de matriz (Mmp) comprenden una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que pueden estar unidas a la membrana y extracelulares implicadas en la degradación de la matriz y la remodelación tisular. (T, Wei. 2016)

2.8 Gónadas

El aparato reproductor masculino de los vertebrados está formado por los testículos, los conductos deferentes y glándulas anexas de tipo exocrino. Los testículos son órganos pares, generalmente ovalados. Los testículos están situados en la parte abdominal y en el caso de los mamíferos en las bolsas escrotales.

Los testículos están formados por una capa de tejido conjuntivo fibroso (túnica albugínea) de la cual parten trabéculas. Entre las trabéculas se encuentran los túbulos seminíferos, vasos sanguíneos y linfáticos, células de Leydig y fibras nerviosas.

Las células de Leydig secretan testosterona, se encuentran aisladas o formando cúmulos en el tejido intersticial, son ovoides o irregulares con núcleo denso esférico y un citoplasma finamente granular y vacuolado.

En el interior de los túbulos seminíferos, las células germinales se encuentran subyacentes a las células de Sertoli que son de gran importancia para el desarrollo de las células germinales. Las células de Sertoli tienen actividad hormonal y determinan las condiciones internas de los túbulos seminíferos, nutren a las células germinales, sostienen y fagocitan los cuerpos residuales.

El aparato reproductor femenino de los vertebrados está formado por los ovarios, los oviductos y la vagina. Los ovarios son órganos pares y pueden mostrar diversas formas ovalada, alargada o irregular. Los ovarios están situados en la cavidad abdominal, en posición dorsal al tubo digestivo, suspendidos en la pared del cuerpo por el mesovario.

El ovario contiene las células sexuales femeninas, las ovogonias las cuales, a través de la meiosis, constituirán los ovocitos. Las ovogonias se rodean de células somáticas, llamadas foliculares, formando el folículo primario.

El ovocito primario, integrado en un folículo primario, muestra una capa de células foliculares que constituyen un epitelio plano o cubico. Este epitelio mantiene, desde estas etapas tempranas, una barrera de permeabilidad entre el estroma y el ovocito.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar mediante PCR e Inmunohistoquímica la expresión de la lipocalina-2 y de su receptor 24p3R en las gónadas de crías de ratas obesas para determinar si la condición de obesidad materna conlleva a la alteración de la expresión tanto de esta adipocina como su receptor.

3.2 Objetivos particulares.

- Identificar por medio de una PCR semicuantitativa alteraciones en la expresión del transcrito para la lipocalina y su receptor en las gónadas de crías de ratas obesas
- Evaluar mediante Inmunohistoquímica alteraciones en la síntesis y localización de la lipocalina 2 y 24p3R en las gónadas de crías de ratas obesas

4. HIPOTESIS

La expresión relativa tanto de la lipocalina 2 como del receptor 24p3R será diferente en las gónadas de crías de rata con obesidad a la que se observara para esta adipocina y su receptor en las gónadas de crías de ratas silvestres debido a la reprogramación genética por las condiciones de inflamación y alteraciones metabólicas maternas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Generación de un modelo de obesidad mediante la administración de sacarosa al 30% a ratas hembra de la cepa Sprague Dawley

Se obtuvieron cuatro ratas de la cepa Sprague Dawley con 21 días de edad provenientes del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Y el cuidado de las mismas se realizó en el bioterio de la Unidad de Investigación Biomolecular en Cardiología (UIBCAR) del Hospital de Cardiología de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del

Seguro Social donde se resguardaron en cajas para ratas y se les dio de comer alimento para rata y agua purificada

- A 2 ratas hembras se les administraba en su agua de beber 30% de azúcar todos los días para obtener el grupo experimental durante 3 meses para alcanzar un peso de aproximadamente 500 gramos
- A 2 ratas hembras se les administraba agua normal para obtener el grupo control durante los mismos 3 meses

5.2 Sacrificio de ratas y extracción de gónadas de las crías

- A 4 hembras se les realizó un frotis vaginal para identificar la fase del ciclo estral en la que se encontraban para identificar qué días eran los adecuados para llevar a cabo el apareamiento.
- Durante toda una noche dos hembras se aparearon con 1 macho
- Al día siguiente a las hembras se les realizó un frotis vaginal en busca de tapón vaginal, espermatozoides o restos flagelares para poder cerciorarnos de que había posibilidad de que quedaran gestantes.
- A los 21 días post coito a 2 ratas 1 control y 1 experimental se les sacrificó por medio de decapitación bajo la norma de cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 y se les realizó una incisión abdominal para poder extraer a las crías, posteriormente a las crías se les realizó una incisión y se les extrajeron las gónadas, las cuales algunas se guardaron en solución TRI Reagent® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), el mismo procedimiento se realizó en las ratas de 30 dpn 1 control y 1 experimental y las muestras se guardaron en solución TRI Reagent y en formaldehído.

5.3 Obtención y purificación de RNA

Extracción de RNA siguiendo el protocolo para el TRI Reagent® Protocol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

- Se extrajeron los ovarios y los testículos de las crías con 21 dpc y 30 dpn de ratas obesas y ratas control, las gónadas se colocaron en tubos

ependorf y se adicionó 1 mL de solución TRI Reagent® y se guardaron a -70°C para su posterior homogenización.

- Con un mortero previamente congelado a -70°C se disgregó el tejido y de nuevo se colocó en otro tubo Eppendorf y se le volvió a adicionar 1 mL de la solución TRI Reagent® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó 0.1 mL de 1-bromo-3-cloropropano por cada mL de TRI Reagent (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm x 15 minutos a 4°C, resultando 3 fases: la fase orgánica, la interfase y la fase acuosa.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le agregó 0.5 mL de 2-propanol por cada mL de TRI Reagent, se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm x 10 minutos a 4°C, observándose un precipitado color blanco.
- Se removió el sobrenadante y al precipitado se le agregó 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRI Reagent, se agitó por vortex hasta disolver el RNA aislado y se centrifugó a 7,500 rpm x 5 minutos a 4°C.

Cuantificación de RNA

- El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda
- Para ello 5 µL de RNA aislado disuelto en 955 µL de agua bidestilada estéril, se colocaron en celdas plásticas y el grado de absorbancia y pureza se cuantificó utilizando el equipo SmartSpec Plus Spectrophotometer (BIO RAD, EUA).

5.4 Obtención de cDNA por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

- A partir de los datos obtenidos en la cuantificación, se realizaron los cálculos necesarios para determinar la cantidad de µL que se necesitaban

de cada muestra para tener una concentración de 300 ng que se utilizo en las reacciones de transcripción reversa (RT)

- Se prepararon las muestras como se muestra en el siguiente cuadro

Tabla 1. Preparación de muestras para RT-PCR

Muestra	µL de muestra	Oligo (dt) (µL)	Agua (µL)	Total (µL)
Ovario 21 dpc control	4.1	1	6.9	12
Testículo 21 dpc control	2.6	1	8.4	12
Ovario 30 dpn control	0.4	1	10.6	12
Testículo 30 dpn control	0.6	1	10.4	12
Ovario 21dpc problema	11	1	-	12
Testículo 21 dpc problema	8	1	3	12
Ovario 30 dpn problema	4	1	7	12
Testículo 30 dpn problema	2.6	1	8.4	12

Las reacciones de RT se llevaron a cabo empleando el kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA EUA)

5.5 PCR semicuantitativa

Las PCRs se realizaron de la siguiente manera:

Tabla 2. PCR para la amplificación de un fragmento de la *Lcn-2* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa colectadas a los 21 dpc

Componente	1x	7x
Master Mix	10 μ L	70 μ L
Reverse LCN-2	0.12 μ L	0.84 μ L
Forward LCN-2	0.12 μ L	0.84 μ L
cDNA	1 μ L	-
Agua	7.76 μ L	54.32 μ L

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio.

Tabla 3. PCR para la amplificación de un fragmento del receptor *24p3R* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 21 dpc

Componente	1x	7x
Master Mix	10 μ L	70 μ L
Reverse 24p3R	1 μ L	7 μ L
Forward 24p3R	1 μ L	7 μ L
cDNA	1 μ L	-
Agua	7 μ L	49 μ L

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio.

Tabla 4. PCR para la amplificación de un fragmento de *GAPDH* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 21 dpc

Componente	1x	7x
Master Mix	4.5 µL	31.5 µL
Reverse GAPDH	0.6 µL	4.2 µL
Forward GAPDH	0.6 µL	4.2 µL
cDNA	1 µL	-
Agua	13.3 µL	93.1 µL

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio

Tabla 5. PCR para la amplificación de un fragmento de la *Lcn-2* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa colectadas a los 30 dpn

Componente	1x	7x
Master Mix	10 µL	70 µL
Reverse LCN-2	0.12 µL	0.84 µL
Forward LCN-2	0.12 µL	0.84 µL
cDNA	1 µL	-
Agua	7.76 µL	54.32 µL

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio.

Tabla 6. PCR para la amplificación de un fragmento del receptor *24p3R* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 30 dpn

Componente	1x	7x
Master Mix	10 µL	70 µL
Reverse 24p3R	1 µL	7 µL
Forward 24p3R	1 µL	7 µL
cDNA	1 µL	-
Agua	7 µL	49 µL

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio

Tabla 7. PCR para la amplificación de un fragmento de *GAPDH* utilizando como templado el cDNA de gónadas de crías de rata control y crías de rata obesa a los 30 dpn

Componente	1x	7x
Master Mix	4.5 µL	31.5 µL
Reverse GAPDH	0.6 µL	4.2 µL
Forward GAPDH	0.6 µL	4.2 µL
cDNA	1 µL	-
Agua	13.3 µL	93.1 µL

De los 7 tubos uno fue el control negativo, tres para cDNA de ovario y los últimos tres para cDNA de testículo para ambos grupos de estudio.

A continuación se muestran los parámetros que se utilizaron para el corrimiento de las PCRs

Lipocalina-2

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
1	94	3
35	94	0:30
	58	0:30
	72	0:45
1	4	∞

24p3R

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
1	95	3:00
35	95	0:30
	60	0:30
	75	0:45
1	4	∞

GAPDH

Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (minutos)
1	94	3
35	94	0:30
	58	0:30
	72	0:45
1	4	∞

Se realizó la electroforesis en una cámara electroforética de las muestras amplificadas por PCR en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio el cual se colocó en una cámara electroforética con amortiguador TBE 1X a 50V durante 2 horas. Los geles se observaron en un transiluminador con luz UV BioDoc-IT Imaging System. (Analytik Jena. EUA)

5.6 Inmunohistoquímica

- Inclusión de tejidos.
 - Colocar los tejidos fijados previamente en formaldehído sacarosa al 10% en agua corriente durante 2 horas
 - Deshidratar los tejidos en concentraciones decrecientes de alcohol (50% - 100%) durante una hora en cada concentración de alcohol.
 - Clarificar los tejidos en xilol durante una hora
 - Sumergir los tejidos en una mezcla xilol-parafina 1:1 por 1 hora
 - Sumergir en parafina de primer cambio durante 1 hora
 - Pasar a parafina de segundo cambio durante 1 hora
 - Incluir el tejido en parafina y dejar solidificar
- Hacer cortes de 5 micras y colocarlos en portaobjetos tratados con poli-L-lisina
- Colocar los portaobjetos con los tejidos en una base metálica e incubarlos 30 minutos a 60°C
- Colocar la base con los portaobjetos en xilol durante 15 minutos
- Pasar los portaobjetos a un vaso coplin y añadir etanol al 100% durante 15 minutos
- Reciclar el etanol previo y colocar etanol al 96% y dejar durante 5 minutos
- Reciclar el etanol al 96% y colocar etanol al 70% y dejar durante 5 minutos
- Reciclar el etanol al 70% y colocar etanol al 50% y dejar durante 5 minutos
- Reciclar el etanol al 50% y colocar agua destilada y dejar durante 15 minutos
- Recuperación antigénica
 - Precalear amortiguador de citratos pH 6, en baño maría

- Colocar los portaobjetos en un vaso coplin con el amortiguador de citratos y colocarlo en la olla exprés
 - Incubar durante 10 minutos a presión máxima
- Colocar los portaobjetos en agua destilada durante 10 minutos
- Lavar con PBS –Tween durante 5 minutos
- Colocar el tejido en una superficie plana y añadir Metanol-Peroxido 3:1 hasta cubrir el tejido totalmente e incubar por 20 minutos
- Lavar con PBS y circundar los cortes de tejido con plumón hidrofóbico
- Colocar bloqueador de proteínas durante 25 minutos
- Colocar el anticuerpo primario Anti-Lipocalin-2 [1:100] por 12 horas
- Lavar con PBS durante 20 minutos
- Añadir a los portaobjetos el anticuerpo secundario biotinilado durante 25 minutos
- Añadir a los portaobjetos estreptavidina con peroxidasa durante 25 minutos
- Lavar con PBS 10 minutos
- Preparar la solución de revelado: 20 µL de cromógeno diaminobenzidina y 200 µL del amortiguador Betazoid DAB Buffer
- Colocar la solución de revelado hasta que se observe un precipitado
- Parar la reacción con agua destilada
- Pasar a un vaso coplin al cual se le añadió previamente hematoxilina, durante 5 minutos
- Lavar los portaobjetos con agua corriente
- Colocar los portaobjetos durante 5 minutos en agua destilada
- Hidratar el tejido en concentraciones crecientes de alcohol durante 3 minutos cada uno
- Colocar los portaobjetos en xilol durante 20 minutos
- Montar y dejar secar durante 24 horas

5.7. Densidades ópticas.

Las laminillas se observaron en un microscopio óptico, el cual tiene adaptada una cámara fotográfica que se utilizó para tomar fotos de las estructuras foliculares y testiculares donde se observó señal y se procedió a trabajar las imágenes para obtener las densidades ópticas de la señal con el programa IMAGE-PRO® PLUS (Media Cybernetics, Inc. Washington Street, USA)

6. RESULTADOS

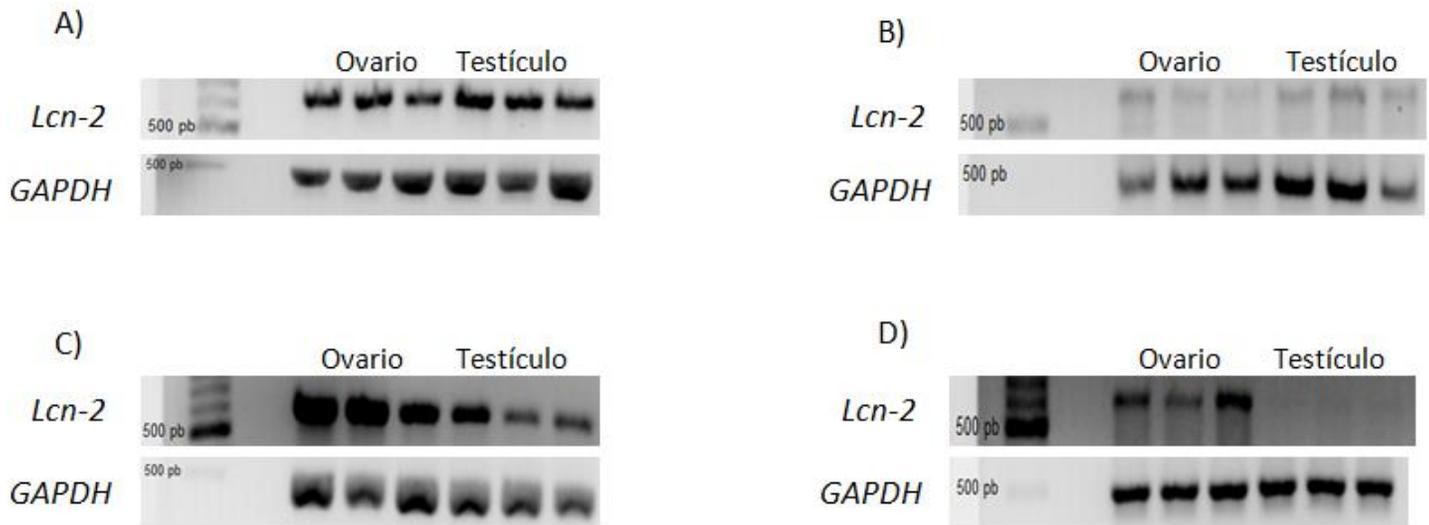


Imagen 1. Patrones de electroforesis de productos de PCR para la *Lcn-2* en geles de agarosa al 1.5%. A) Expresión de *LCN-2* en gónadas de cría de rata control 21 dpc. B) expresión de *LCN-2* en gónadas de cría de rata obesa 21 dpc. C) expresión de *LCN-2* en gónadas de cría de rata control 30 dpc y D) expresión de *LCN-2* en gónadas de cría de rata obesa 30 dpc. GAPDH se utilizó como control positivo en todas las muestras

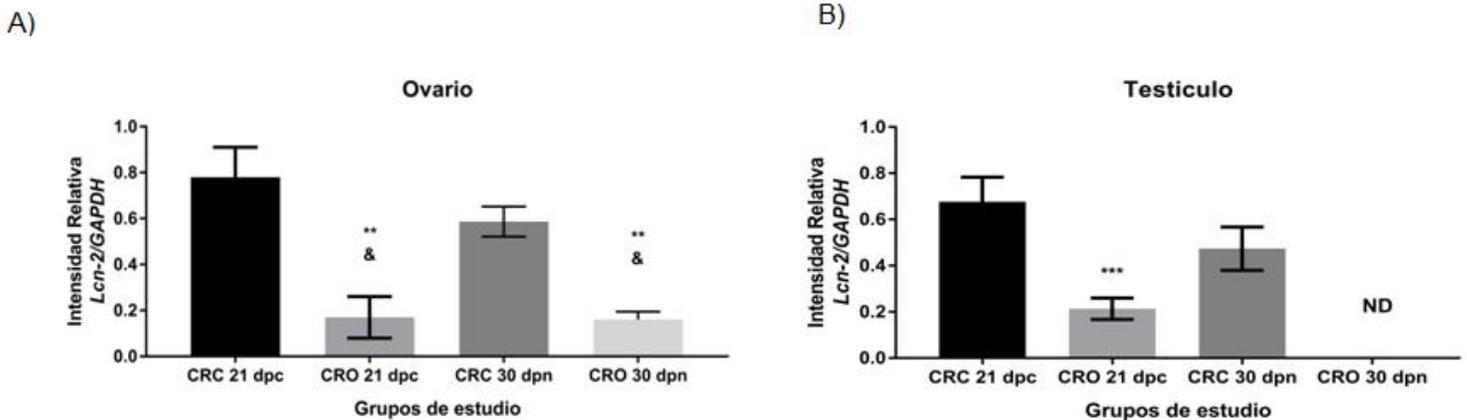


Imagen 2. Intensidades relativas del gen para la *Lcn-2* en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas con 21 dpc y 30 dpc A) intensidad relativa de ovario de cría de rata control y obesa 21 dpc y 30 dpc donde se observa una diferencia significativa de $**P < 0.01$ en la disminución de la intensidad relativa entre cría de rata control (CRC) 21 dpc y cría de rata obesa (CRO) 21 dpc y de la misma manera CRC 30 dpc y CRO 30 dpc. B) Intensidad relativa de testículo de rata control y obesa 21 dpc y 30 dpc donde existe una diferencia significativa de $***P < 0.001$ en la disminución de la intensidad relativa entre cría de rata control (CRC) 21 dpc y cría de rata obesa (CRO) 21 dpc y una expresión nula en la intensidad relativa de cría de rata obesa 30 dpc

Como se observa en la imagen 1 existe un cambio en la expresión del gen de la lipocalina 2 en los modelos experimentales incisos A y C con respecto a los modelos problemas incisos B y D en los diferentes tiempos de estudio. A los 21 dpc se observa una disminución en la expresión del gen *Lcn-2* en ambos tejidos (ovario y testículo) entre la imagen del inciso A correspondiente a las muestras de las gónadas de crías de rata control frente al inciso B correspondientes a las muestras de las gónadas de crías de rata obesa, mientras que a los 30 dpn el cambio en la expresión del gen de la *Lcn-2* se observa mayormente en el tejido de testículo en el cual existe una nula expresión en la muestra de testículo de cría de rata obesa inciso D. y en la imagen 2 se muestra de forma grafica la disminución de la expresión del gen de lipocalina 2 en las muestras de crías de rata obesa frente a las crías de rata control en ambos tejidos (ovario y testículo) y a tiempos experimentales (21 dpc y 30 dpn).

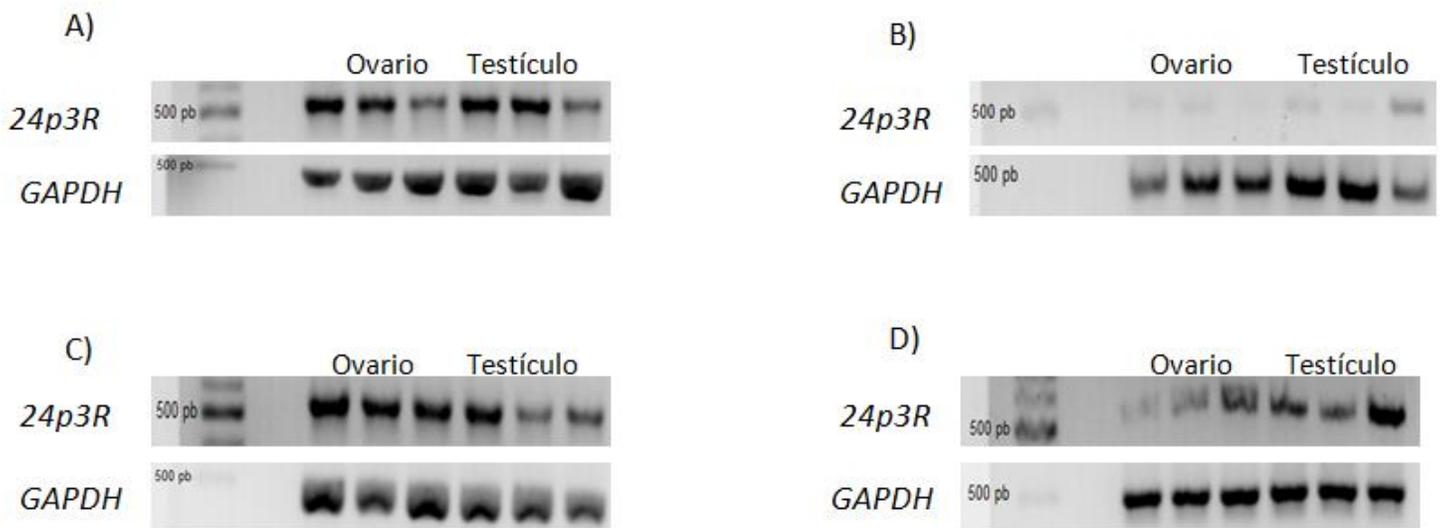


Imagen 3. Patrones de electroforesis de productos de PCR para el receptor *24p3R* en geles de agarosa al 1.5%. A) Expresión de *24p3R* en gónadas de cría de rata control 21 dpc. B) expresión de *24p3R* en gónadas de cría de rata obesa 21 dpc. C) expresión de *24p3R* en gónadas de cría de rata control 30 dpn y D) expresión de *24p3R* en gónadas de cría de rata obesa. GAPDH se utilizo como control positivo en todas las muestras

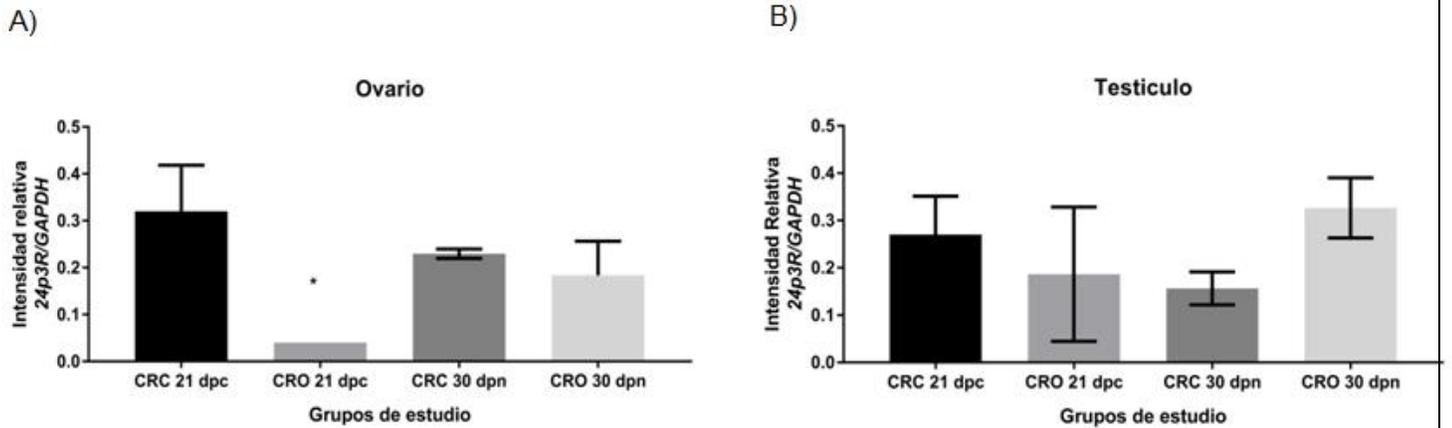


Imagen 4. Intensidades relativas del gen para el receptor *24p3R* en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas con 21 dpc y 30 dpc. A) Intensidad relativa de ovario de cría de rata control y obesa 21 dpc y 30 dpc donde se observa una disminución estadísticamente significativa de $*P < 0.1$ entre las muestras de crías de rata control (CRC) 21 dpc y crías de rata obesa (CRO) 21 dpc y un comportamiento similar en la intensidad relativa entre CRC 30 dpc y CRO 30 dpc. B) intensidad relativa de testículo de rata control y obesa 21 dpc y 30 dpc donde no hay diferencias significativas en la intensidad relativa de CRC 21 dpc, CRO 21 dpc, CRC 30 dpc y CRO 30 dpc.

En el receptor *24p3R* existe una diferencia significativa en la disminución de su expresión en tejido de ovario de cría de rata obesa con respecto a la cría de rata control solamente en el día 21 post coito como se observa y la imagen 3 mientras que en los demás tejidos no existe una diferencia significativa en el cambio de expresión del gen de *24p3R*, en la imagen 4 se observa gráficamente que no existe gran diferencia en la expresión tanto en ovario y testículo a los 21 dpc y 30 dpc.

6.1. Densidades ópticas

Inmunohistoquímica

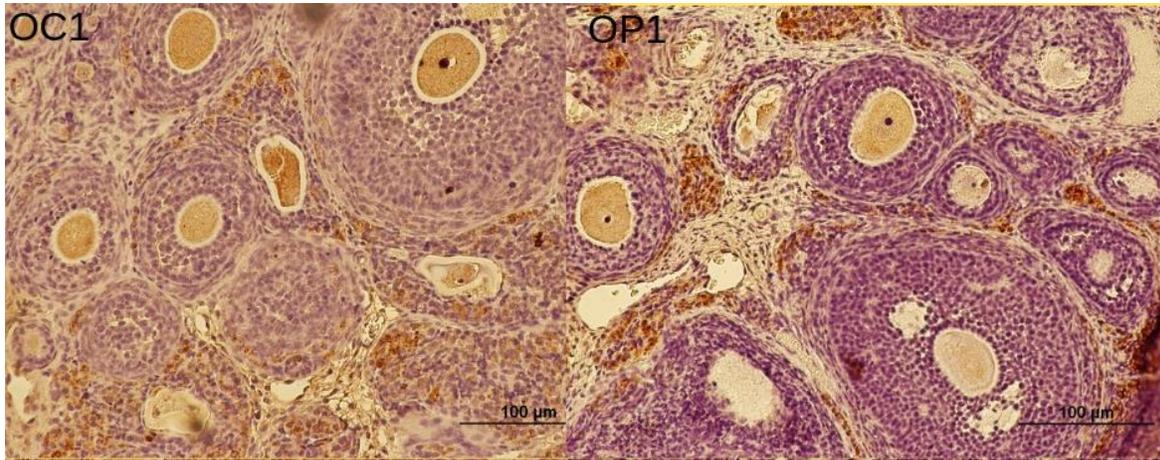


Imagen 5. Inmunohistoquímica para la lipocalina 2 (Lcn-2) en tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x. OC1 corresponde al tejido de ovario de cría de rata control y OP1 corresponde al tejido de ovario de cría de rata obesa

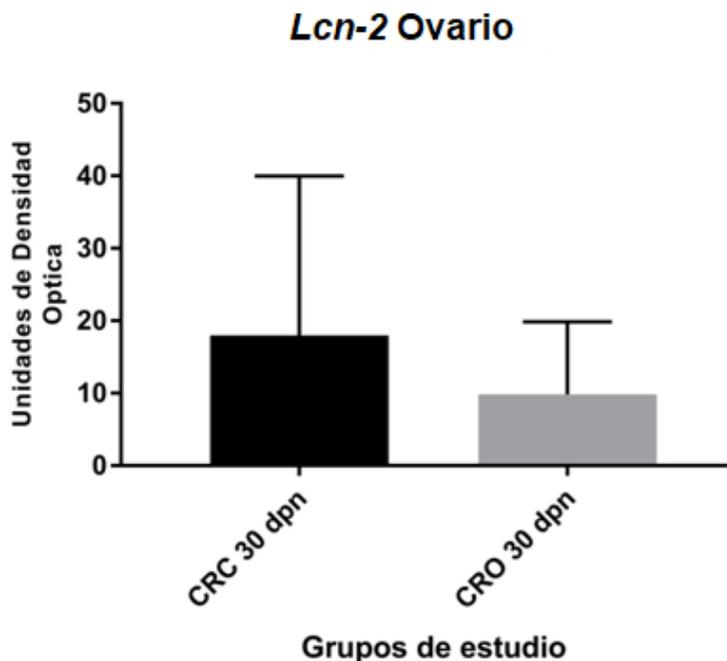


Imagen 6. Cuantificación de las unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para la Lcn-2 en el tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn. Donde se observa una disminución en densidad óptica de muestras de cría de rata obesa 30 dpn (CRO 30 dpn) con respecto a las muestras de cría de rata control 30 dpn (CRC 30 dpn).

La imagen 5 muestra la presencia de señal intensa en ovocitos, estroma y ligera señal en células de la granulosa y células de la teca en OC1 correspondiente al

tejido de ovario de cría de rata control y en OP1 correspondiente a tejido de ovario de cría de rata obesa se nota una disminución de señal en ovocitos, poca señal en células de la teca y casi nula señal en células de la granulosa.

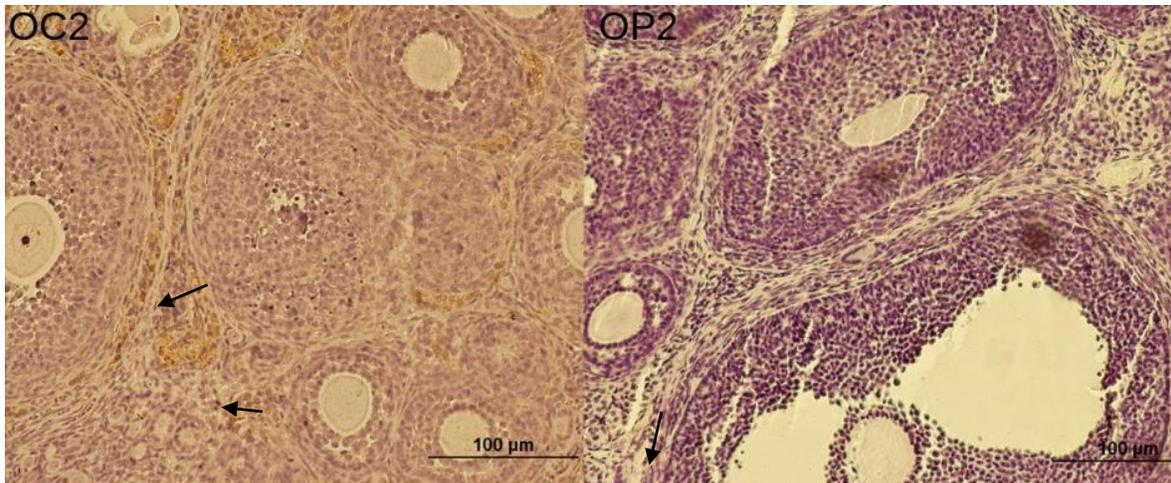


Imagen 7. Inmunohistoquímica para el receptor $24p3R$ en tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x. OC2 corresponde al tejido de ovario de rata control y OP2 corresponde al tejido de cría de rata obesa.

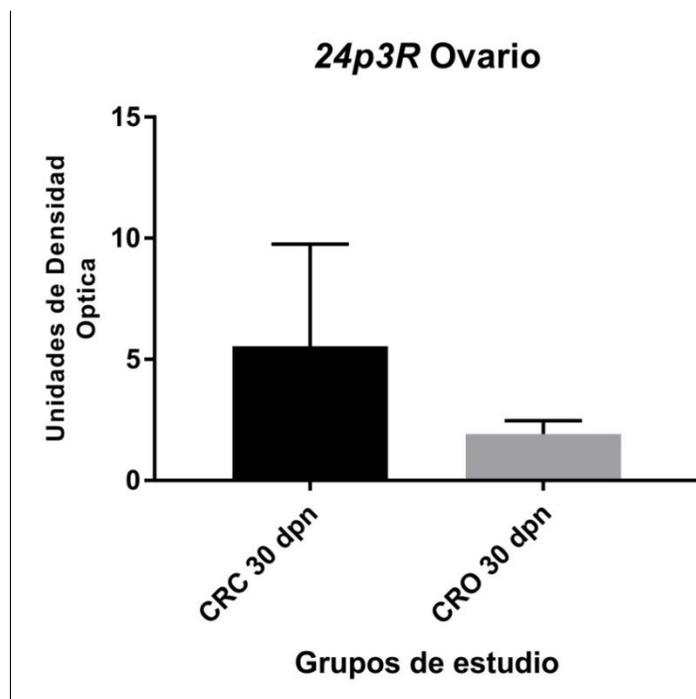


Imagen 8. Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para el receptor $24p3R$ en el tejido de ovario de cría de rata control y cría de rata obesa. Donde se observa una disminución en densidad óptica en muestras de crías de rata obesa 30 dpn (CRO 30 dpn) con respecto a crías de rata control 30 dpn (CRC 30 dpn).

En la imagen 7 se observa solamente señal en las células de la teca y en la parte del estroma en el tejido de ovario de cría de rata control mientras que en el tejido

de ovario de cría de rata obesa solo existe una ligera señal en las células de la teca, cabe mencionar que existe una diferencia en la morfología de los ovocitos entre OC2 los cuales tienen una forma más circular y uniforme y en OP2 la morfología se ve alterada ya que los ovocitos se ven de una forma ovalada. Y en la imagen 8 se observa gráficamente la disminución de la señal del receptor 24p3R mediante unidades de densidad óptica

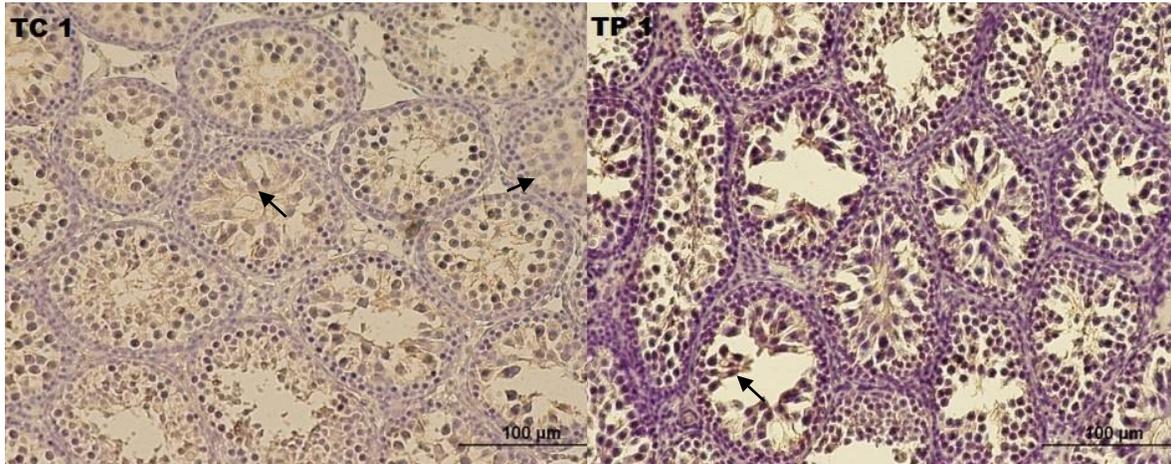


Imagen 9 Inmunohistoquímica para la lipocalina 2 (*Lcn-2*) en tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 µm con tinción de hematoxilina 20x. TC 1 corresponde a tejido de testículo de cría de rata control y TP1 corresponde a tejido de testículo de cría de rata obesa.

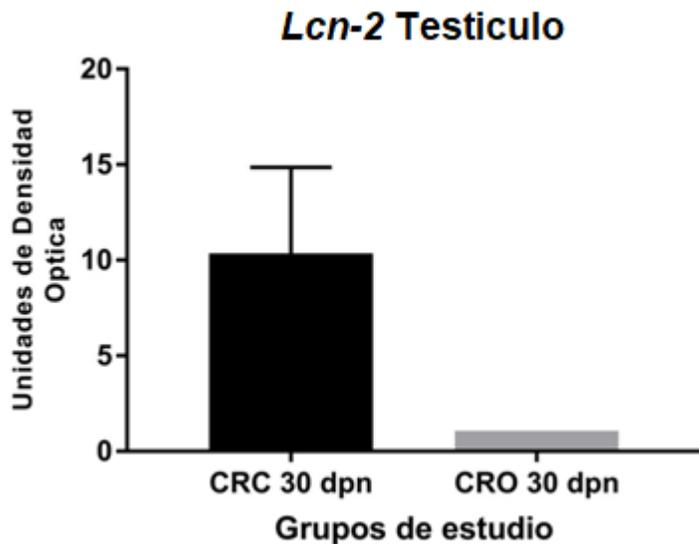


Imagen 10. Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para la *Lcn-2* en el tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa. Donde se observa una disminución en de densidad óptica en muestras de testículo de crías de rata obesa 30 dpn (CRO 30 dpn) con respecto a la crías de rata control 30 dpn (CRC 30 dpn).

En la imagen 9 se observa una intensidad de señal en las espermatogonias y en células de Sertoli en TC1 que corresponde al tejido de testículo de cría de rata control en el cual también se observa una morfología ordenada de las

espermatogonias y las células de Sertoli las cuales sirven de sustento y funcionan como comunicadoras de señales para la remodelación del tejido y la formación del lumen, mientras que en TC1 se observa una ligera señal solo en células de Sertoli y la morfología del tejido se ve un poco alterada en el acomodo de las espermatogonias y las células de Sertoli las cuales no se observan las prolongaciones alrededor de las espermatogonias igualmente se observa una estrechamiento de los túbulos seminíferos y la imagen 10 muestra graficamente la disminución de la intensidad de la señal de Lcn-2 en unidades de densidad óptica

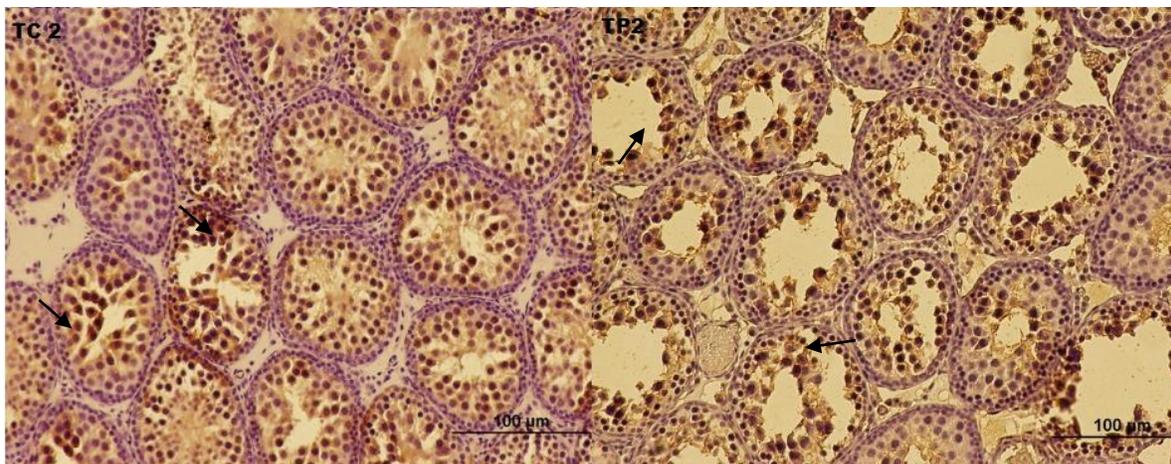


Imagen 11. Inmunohistoquímica para el receptor *24p3R* en tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa con 30 dpn, corte de 5 μm con tinción de hematoxilina 20x. TC 2 corresponde al tejido de testículo de cría de rata control y TP 2 corresponde al tejido de testículo de cría de rata obesa

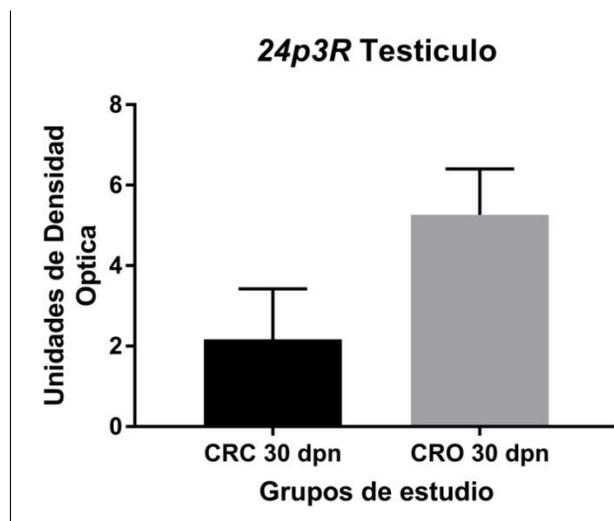


Imagen 12. Cuantificación de la unidades de densidad óptica generadas por la señal detectada en la Inmunohistoquímica para el receptor *24p3R* en el tejido de testículo de cría de rata control y cría de rata obesa. Donde se observa un aumento de densidad óptica en muestras de crías de rata obesa 30 dpn (CRO 30 dpn) con respecto a crías de rata control 30 dpn (CRC 30 dpn).

La imagen 11 muestra la presencia de señal en las espermatogonias y en las células de Sertoli en el tejido de testículo de cría de rata control y de la misma manera en el tejido de testículo de cría de rata obesa se observa señal en las espermatogonias y en las células de Sertoli, la imagen 12 muestra gráficamente que la diferencia de señales entre ambos tejidos no presenta una diferencia significativa. Por otro lado cabe mencionar que en este caso la morfología entre los dos tejidos TC 2 y TP 2 es muy diferente ya que en TP 2 se observa un tejido menos organizado en estructura con un daño tisular importante.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. Complicaciones en la descendencia por obesidad materna

A nivel nacional la obesidad constituye un severo problema de salud pública que tiene como consecuencia el desarrollo de alteraciones metabólicas, inflamación crónica, resistencia a insulina entre otros padecimientos. La obesidad materna es un problema que trae consecuencias tanto en la madre como es su descendencia, además de las complicaciones perinatales asociadas a la obesidad en el embarazo, existe evidencia sobre los efectos perjudiciales sobre el metabolismo de la descendencia (Farías, M. 2013). Estudios en animales mostraron que la obesidad materna inducida por la dieta afecta a la descendencia en el periodo post natal, especialmente en los varones lo que sugiere que la programación fetal puede afectar a las personas según el sexo (Ornellas, et al. 2013).

En el presente estudio se observaron complicaciones durante el período gestacional de las ratas obesas, como el aumento de dicho periodo gestacional y una disminución en el número de crías obtenidas en comparación con la duración de la gestación en las ratas control y el número de crías resultantes.

Hay estudios que indican que existe una hipertrofia en los adipocitos de las crías de madres obesas independientemente del género, lo cual indica que hay una remodelación del tejido adiposo en estas crías (Rotter et al., 2003). También existen evidencias de una correlación positiva entre el tamaño de los adipocitos y la cantidad de adipocinas generadas. De esta forma se sabe que el tejido adiposo es considerado un tejido sumamente endocrino que genera citocinas pro-inflamatorias entre ellas las adipocinas como adiponectina, lipocalina-2 entre otras.

7.2. Expresión del transcritto de la Lipocalina-2 (*Lcn-2*) y su receptor (*24p3R*) en gónadas de crías de ratas control y obesas.

Se evaluó semi cuantitativamente la expresión del transcritto de la lipocalina y 24p3R en las gónadas de las crías de ratas control y obesas para determinar si había un cambio en la expresión en diferentes tiempos: 21 días post coito (21 dpc)

y 30 días post nacimiento (30 dpn). Se encontró que existe una disminución en la expresión del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* en ovario y testículo de cría de rata obesa 21 dpc con respecto a la cría de rata control 21 dpc como se muestra en la imagen 1 y 3 incisos A y B y al evaluarlo mediante un análisis densitométrico se ve que existe una diferencia a la baja significativa entre muestras de crías de rata obesa 21 dpc y cría de rata control 21 dpc como se indica en la imagen 2 y 4 inciso A y B.

El ovario es un sitio permanentemente de remodelación de tejido el cual comprende los procesos de crecimiento folicular, atresia, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo. (Peña, Miguel. 2007). Los ovarios fetales contienen células germinales que sufrirán masivos procesos de apoptosis ya que la mayoría degeneraran antes de la formación de los folículos primordiales, de modo que en el momento del nacimiento solo quedaran un 20% de la cantidad original. (Uranga, J. 2013). Como se ha mencionado anteriormente la lipocalina interviene en diferentes procesos y uno de ellos es la participación en el proceso apoptótico. Un estudio indica que la expresión ectópica de *24p3R* confiere a las células la capacidad de sufrir captación de hierro o apoptosis, dependiendo del contenido de hierro del ligando: *24p3* cargado de hierro aumenta la concentración de hierro intracelular sin promover la apoptosis; el *24p3* que carece de hierro disminuye los niveles de hierro intracelular, lo que induce la expresión de la proteína proapoptótica Bim, lo que resulta en la apoptosis (Devireddy, 2005).

Recordemos que Zhao y colaboradores demostraron que la expresión de *Lcn-2* es inducida por IFN γ y TNF α . Dicho esto podemos decir que en las muestras de ovario de crías de ratas control existe una expresión del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* de forma normal por el proceso fisiológico que se está llevando a cabo en dicha gonada y que probablemente la disminución en la expresión del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* se deba a una regulación a la baja de dichos transcriptos por la acción de inducción de la expresión de *Lcn-2* llevada a cabo por IFN γ y TNF α que son factores inflamatorios que se encuentran expresados por la alteración epigenética de la madre obesa hacia las crías.

En el testículo la diferenciación gonadal ocurre de forma temprana, marcado por la formación de cordones testiculares, siendo el día 13 post fecundación en ratas (Rojas, Mariana. 2017). La actividad enzimática esteroidogénica se activa tras la diferenciación gonadal, ocasionando la producción de testosterona al día 15 post fecundación. En este periodo de diferenciación ocurren diversos procesos de reacomodo de estructuras y células en los cuales puede estar implicada la participación de las metaloproteinasas de matriz como la MMP9 la cual está muy involucrada en la remodelación de tejidos a través de la degradación de sustratos de matriz extracelular como el colágeno tipo IV y la elastina (Collier, I 1998). La Mmp9 genera un complejo proteico con lipocalina-2 para disminuir la degradación de la metaloproteinasa. Este proceso explica la presencia y la posible función de la lipocalina en el testículo de cría de rata control 21 dpc junto con su receptor 24p3R el cual sería requerido para poder entrar a las células. Sin embargo en la imagen 2 y 4 incisos B se observa una disminución estadísticamente significativa en la expresión del transcripto de la *Lcn-2* y *24p3R* en testículo de cría de rata obesa 21 dpc con respecto a las crías de rata control. Las alteraciones metabólicas por reprogramación fetal de la madre pueden estar jugando un papel importante en la baja del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* en el testículo de crías de ratas obesas 21 dpc ya que la regulación de la expresión de *Lcn-2* está altamente regulada por la inflamación.

En la cepa Sprague Dawley la maduración sexual ocurre a los 30 días después del nacimiento, entre los días 26 y 30 debe de existir picos en las concentraciones de LH y FSH para terminar el proceso de maduración gonadal (GullaceF, s/f). Indicando una activación del eje Hipotalamo-Hipofisis-Gonadal (HPG), Burns, K et. al. En su trabajo sugiere que la FSH tiene un papel importante en la expresión de la lipocalina. En las imágenes 1 y 3 incisos C y D se muestra la expresión del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* respectivamente en gónadas de crías de rata control y obesas 30 dpc. Por otro lado el análisis densitométrico en las imágenes 2 y 4 incisos A y B indican una baja estadísticamente significativa en la expresión del transcripto de *Lcn-2* y *24p3R* en ovarios y testículos de crías de obesa con respecto a las crías de rata control e incluso en las muestras de testículo de cría

de rata obesa la expresión del transcripto de la *Lcn-2* es nula. La expresión del mRNA de *Lcn-2* puede estar alterada por las complicaciones metabólicas reprogramadas vía materna en las crías de rata obesa pues se ha descrito que el tejido adiposo produce factores, incluyendo adipocinas, citoquinas y quimiocinas que, cuando se liberan, ejercen sistémicamente efectos endocrinos en múltiples tejidos. Las adipocinas también afectan el eje HPG tanto a nivel central, a nivel hipotalámico-pituitario, y que actúan periféricamente sobre las gónadas en sí mismas (Tsatsanis, et al.; 2015), teniendo como consecuencia una baja en el transcripto de la lipocalina y su receptor.

7.3. Localización de la lipocalina 2 y su receptor en las gónadas de crías de ratas control y crías de ratas obesas 30 dpn.

Existe una localización de la proteína lipocalina 2 y 24p3R en células germinales y somáticas tal como lo indica el trabajo de la Dr Elsa de la Chesnaye en 2017, en ovario de cría de rata control y cría de rata obesa indicado en la imagen 5, dicha señal se encuentra de manera intensa en ovocitos y estroma y ligera señal en células de la granulosa de crías de rata control mientras se observa una disminución drástica en la señal del ovocito y células de la granulosa en el tejido de cría de rata obesa, Gullace F indica que a los 30 dpn hay una maduración sexual lo cual repercute en un cambio hormonal que ejerce una función directa sobre las gónadas y que en el caso del tejido de cría de obesa el eje HPG se puede encontrar alterado por acción de la reprogramación epigenética por efecto de la obesidad materna teniendo una disminución en la expresión de la lipocalina en dicho tejido, cabe mencionar que en ovario de cría de obesa se observaron mayor número de folículos atresicos en comparación con el tejido de cría de rata control, lo cual puede indicar la alteración provocada por la madre. Igualmente en dicho tejido se observa una señal de 24p3R pero solamente en células de la teca y estroma en el tejido de ovario de crías de rata control de 30 dpn y una disminución en la señal en el tejido de cría de rata control.

En el tejido testicular de crías de rata control y crías de rata obesa 30 dpn existe una señal de lipocalina 2 en espermatogonias y células de Sertoli. En la imagen 9

se puede notar que hay un reacomodo celular para ir formando el lumen lo cual explica la presencia de lipocalina, la cual puede estar acomplejada con Mmp9 para realizar el remodelado. Se sabe que las células de Sertoli son capaces de regular, a través de interacciones paracrinas y yuxtacrinas, la producción espermática, diferenciación y función de las células mioides e intersticiales y que son importantes en la diferenciación testicular (Rojas, Mariana. 2017). La presencia de señal en células de Sertoli indica que la lipocalina interactúa en alguno de los procesos llevados a cabo para la supervivencia y diferenciación de las espermatogonias. Mientras que en el tejido de cría de rata obesa existe una ligera señal y esta solo se presenta en las espermatogonias. Mientras que en la expresión de 24p3R de igual manera solo existe señal en células de Sertoli y en espermatogonias y como se observa en la imagen 10 y 11 existe un aumento en la señal del tejido de cría de rata obesa con respecto al de cría de rata control, Esto se correlaciona con una regulación al alza del gen *Lcn-2* y una disminución del número de células germinales asociadas con el papel de *Lcn-2* en la regulación de la apoptosis (Zhenlong,K 2017) y en consecuencia una alza en la expresión del receptor 24p3R.

8. CONCLUSIONES

La obesidad es un problema de salud pública actual y mundial muy grave que desencadena diversas alteraciones a la homeostasis principalmente generando un ambiente inflamatorio, la reprogramación genética de las crías por parte de la madre al tener obesidad durante el periodo de gestación si altera metabólicamente a la descendencia provocándoles diversos padecimientos y cambios en expresión de citocinas.

La lipocalina y su receptor están implicados en diversos procesos tales como la inflamación, la apoptosis, el transporte de hierro hacia el interior de las células y la lipocalina también puede estar acomplejada a la *Mmp9* en procesos de remodelado de estructuras celulares.

La expresión de los transcritos de *Lcn-2* y *24p3R* si generan una alteración en los tejidos de crías de rata obesa con respecto a las controles en ambos tiempos estudiados 21 dpc y 30 dpn, los cuales pueden ser explicados por el aumento de algunas citocinas, por la alteración del eje hipotálamo-hipofisis-gonada y la función hormonal.

También existe una alteración en la expresión de la proteína lipocalina 2 y su receptor en tejidos gonadales de crías de ratas obesas

9. PERSPECTIVAS

A lo largo de este trabajo se presentaron diversas incógnitas que se pueden revelar con otros trabajos, se abre la puerta para evaluar la presencia del transcritos de las *Mmp9* y la expresión de la proteína mediante pruebas de inmunohistoquímicas, igualmente se podrían hacer estudios para evaluar la presencia del complejo *Lcn-2/Mmp9* o realizar el mismo trabajo pero con crías de ratas diabéticas para evaluar la respuesta de la lipocalina y su receptor ante este padecimiento.

10. REFERENCIAS

- Abella V, Morena Scotece , Javier Conde , Rodolfo Gómez , Ana Lois , Jesús Pino , Juan J. Gómez-Reino , Francisca Lago , Ali Mobasher , y Oreste Gualillo. (2015) El potencial de lipocalin-2/NGAL como biomarcador para enfermedades inflamatorias y metabólicas. Biomarcadores . 20 (8): 565-57. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gualillo%20O%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26671823
- Argente J.;Martos, M. ; Manuel, H. ;(2006) Mesa Redonda: El tejido adiposo como glándula endocrina. Obesidad y syndrome metabólico. BOL PEDIATR; 46: 269-274. Disponible en: <http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/39>
- Burns, K., Gabe E. Owens, Samuel C. Ogbonna, John H. Nilson, and Martin M. Matzuk, (2003), Expression Profiling Analyses of Gonadotropin Responses and Tumor Development in the Absence of Inhibins. Endocrinology, 144(10):4492–4507. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959983>
- Collier, I, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI, (1998), H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J Biol Chem. 263, 6579–6587. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2834383>
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. (2005), A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. Howard Hughes Medical Institute, Programs in Gene Function and Expression and Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA. Dec 29;123(7):1293-305. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Devireddy%20LR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16377569
- De la Chesnaye, E. , Leticia Manuel-Apolinar, Norma Oviedo-de Anda, María Cristina Revilla-Monsalve and Sergio Islas-Andrade. (2016), Gender differences in lipocalin

2 plasmatic levels are correlated with age and the triglyceride/high-density lipoprotein ratio in healthy individuals. Gac Med Mex.;152:612-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27792695>

De la Chesnaye, E. Leticia Manuel-Apolinar, Leticia Damasio, Aleida Olivares, Miguel Angel Palomino, Isis Santos, Juan Pablo. (2018), Expression profiling of Lipocalin-2 and 24p3 receptor in murine gonads at different developmental stages. Exp Ther Med;16(1):213-221.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896242>

Eduardo Esteve, MD, PHD, Wifredo Ricart, MD, and José Manuel Fernández-Real, MD, PHD. (2009), Adipocytokines and Insulin Resistance The possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin.Diabetes Care. Nov; 32(Suppl 2): S362–S367. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875582>

Goetz D.H, Holmes M.A, Borregaard N, Bluhm M.E, Raymond K.N, Strong R.K. (2007), The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition.Mol. Cell; 10: 1033-1043. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453412>

Farías Marcelo. (2013), Obesidad materna: severo problema de salud pública en Chile. Rev. chil. obstet. ginecol. vol.78 no.6 Santiago. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262013000600001

Fierro, F. ;(2017) *Electroforesis de DNA*. Consultado en 29 de diciembre de 2018. Disponible en: <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/electroforesis.pdf>

Goetz D.H, Holmes M.A, Borregaard N, Bluhm M.E, Raymond K.N, Strong R.K. (2002), The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol. Cell.; 10: 1033-1043. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453412>

Gullace Federico A, MéndezGalassiGerézPaola F. (s/f) Reproducción en animales de laboratorio. Facultad de cienciasveterinarias, Universidad de Buenos Aires. Disponible en: <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00010199.pdf>

Gómez-AmbrosiJavier, Amaia Rodríguez, Victoria Catalán, GemaFrühbeck. (2008), Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. Revista Española de Obesidad; 6:264-279. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237830808_Papel_del_tejido_adiposo_en_la_inflamacion_asociada_a_la_obesidad_Revision

Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. (2007), Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. ArteriosclerThrombVascBiol; 27:2276-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823366>

Lippi G, Meschi T, Nouvenne A, Mattiuzzi C, Borghi L. (2014), Neutrophilgelatinase-associated lipocalin in cáncer. AdvClin Chem; 64:179-219. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938019>

Mohammed, M. A., Seleim, M. F., Abdalla, M. S., Sharada, H. M. & Abdel Wahab, A. H. (2013). Urinary high molecular weight matrix metalloproteinases as non-invasive biomarker for detection of bladder cancer. BMC Urol. 13, 25–31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672427>

Ornellas Fernanda, Vanessa Souza Mello, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda, Marcia B Aguilá. (2013), Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. Life Sciences, S0024-3205(13)00460-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973955>

Peña Miguel, MVZ, Agustín Góngora, Ph.D, José Estrada, Ph.D. (2007), Growth factors in the follicular development,embryonic early and implantation.implications in the production of bovine embryos. Rev.MVZ Córdoba 12(1): 942-954. Disponible en:https://www.researchgate.net/publication/262459912_GROWTH_FACTORS_IN_THE_FOLLICULAR_DEVELOPMENT_EMBRYONIC_EARLY_AND_IMPLANTATION_IMPLICATIONS_IN_THE_PRODUCTION_OF_BOVINE_EMBRYOS

- Prieto-Gómez Bertha, Mireya Velázquez-Paniagua. (2002), Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. RevFacMed UNAM, 45 (6): 252-257. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no45-6/RFM45605.pdf>
- Recasens. M, W. Ricart, JM. Fernández-Real. (2004), Obesidad e inflamación. REV MED UNIV NAVARRA/VOL 48, Nº 2, 49-54
- Rojas Mariana; Conei Daniel; Bustos-Obregon Eduardo. (2017), Interacciones Epitelio-mesenquimáticas en el desarrollo testicular. 35(4):1444-1450. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000401444
- Rotter V, Nagaev I, Smith U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J Biol Chem; 278:45777-84. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952969>
- Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. (2012). Minireview: Epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. Endocrinology;153:1031-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253432>
- Tamay de Dios L,* Ibarra C,** Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Vol. 2, Núm. 2, pp 70-78. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Ting Wei, Haihong Zhang, Neslihan Cetin, Emily Miller, Teri Moak, James Y. Suen & Gresham T. Richter. (2016). Elevated Expression of Matrix Metalloproteinase-9 not Matrix Metalloproteinase-2 Contributes to Progression of Extracranial Arteriovenous Malformation. Scientific Reports volume 6, Article number: 24378. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep24378>
- Tsatsanis Christos, EiriniDermizaki, PavlinaAvgoustinaki, NikiMalliaraki, VasilisMytaras, Andrew N. Margioris. (2015). The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. HORMONES, 14(4):549-562. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26859602>

Uranga Ocio José Antonio. (2013). Apoptosis embrionaria y factores de supervivencia. Universidad Rey Juan Carlos. Disponible en: <http://www.equipoivi.es/cursos/masterurjc2013/formacion/docdow.php?id=66&ver=1>

Yu Wang, Karen S. L. Lam, Edward W. Kraegen, Gary Sweeney, Jialiang Zhang, Annette W.K. Tso, Wing-Sun Chow, Nelson M.S. Wat, Jian Yu Xu, Ruby L.C. Hoo, Aimin Xu. (2007). Lipocalin-2 Is an Inflammatory Marker Closely Associated with Obesity, Insulin Resistance, and Hyperglycemia in Humans. ClinChem, 53: 34-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040956>

Zhao P, Elks CM, Stephens JM. (2014). The induction of lipocalin-2 protein expression in vivo and in vitro. JBiolChem.; 289(9):5960-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391115>

Zhenlong Kang, Na Qiao, Zhigang Tan, Zhaoxin Tang & Ying Li. (2017). Expression patterns and changes of the LCN2 gene in the testes of induced cryptorchidism and busulfan-treated mice. systems biology in reproductive medicine, vol. 63, no. 6, 364–369. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28771045>

ANEXOS

Reactivos y soluciones

TBE 5X

Reactivo	Cantidad	
Tris base	54 g	Esterilizar en autoclave y guardar a 4°C
Ácido bórico	27.5 g	
EDTA (0.5M) pH 8	20 mL	
Agua bidestilada	cbp 1 litro	

TBE 1X

Reactivo	Cantidad	
TBE 5X	200 mL	Esterilizar en autoclave y guardar a 4°C
Agua bidestilada	cbp 1 litro	

BUFFER DE CITRATOS

Reactivo	Cantidad	
Solución 0.1 M de ácido cítrico	47. mL	Esterilizar en autoclave y guardar a 4°C
Solución 0.1 M de citrato sódico	200.5 mL	
Agua bidestilada	cbp 500 mL	

PBS 1X

Reactivo	Cantidad
NaCl	13.3 g
KCl	0.3 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g

Agua bidestilada cbp 1 litro

Ajustar pH a 7.4

<i>Lcn2</i>	Primer set A	Forward primer	5'tctcgattccgctcgggtggtgg3'	592 bp
		Reverse primer	5'cctgggtgtcctgtgtctg3'	
<i>24p3R</i>	Primer set B	Forward primer	5'aggactgggactacaacgga3'	507 bp
		Reverse primer	5'gtgcggactccagaaacaga3'	
<i>GAPDH</i>	Primer set C	Forward primer	5'-caaggtcatccatgacaactttg-3'	496 pb
		Reverse primer	5'-gtccaccaccctgttgctgtag-3'	

Oligonucleótidos y anticuerpos

Para las reacciones de PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- Anticuerpo primario de abcam Anti-Lipocalin-2 / NGAL antibody (ab41105), es un anticuerpo policlonal de conejo no conjugado

Anti-Lipocalin-2 / NGAL antibody (ab41105)
★★★★★ Reviews (7) Specific References (9)

Description: Rabbit polyclonal to Lipocalin-2 / NGAL
Application: ICC/IF, IHC-P, WB
Reactivity: Human
Conjugate: Unconjugated



Compare (max 4)

- Anticuerpo primario de abcam Anti-24p3R antibody (ab124506), es un anticuerpo policlonal de conejo no conjugado

Anti-24p3R antibody (ab124506)

Specific References (2)

Description: Rabbit polyclonal to 24p3R

Application: IHC-P, WB

Reactivity: Rat, Human

Conjugate: Unconjugated



Compare (max 4)

Fundamento de técnicas

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de DNA en varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. La reacción se lleva a cabo por la acción de la enzima polimerasa que sintetiza naturalmente el DNA de la células.

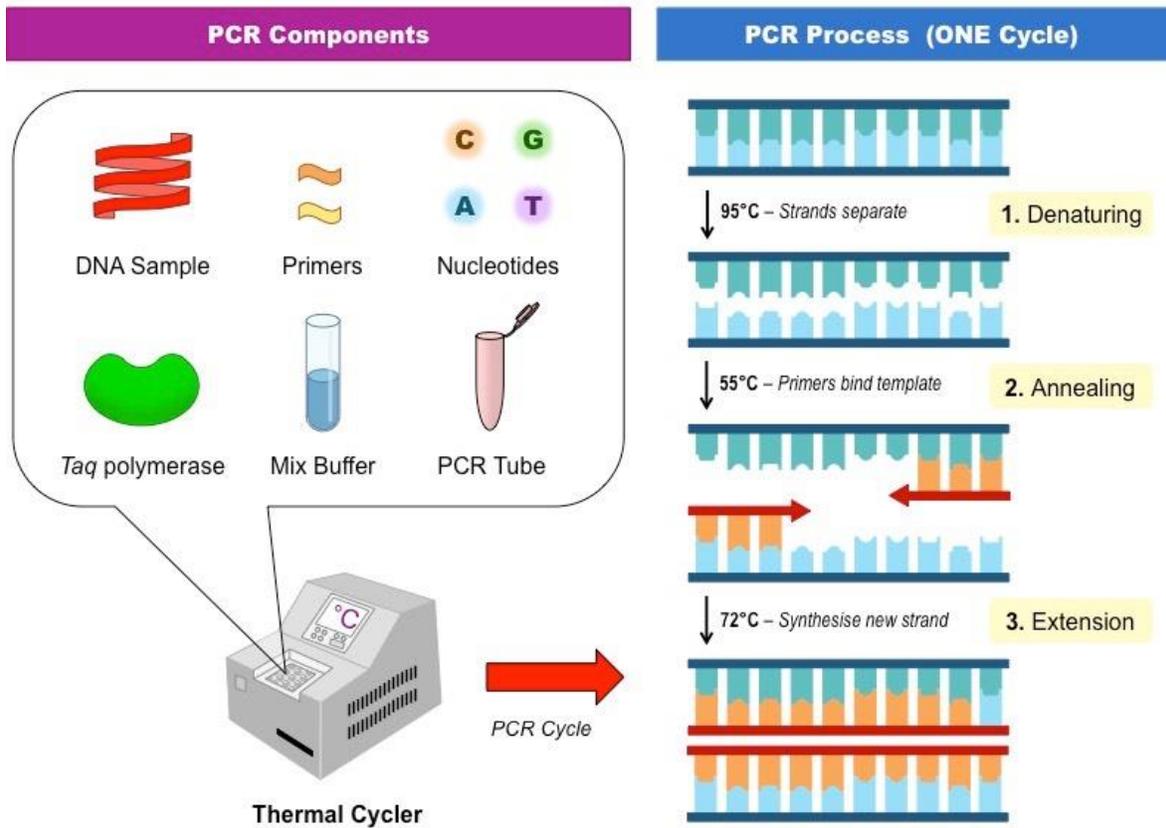


Figura 4. Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

RT- PCR

La transcripción reversa es una reacción que se lleva a cabo por medio de una enzima llamada transcriptasa reversa que es capaz de convertir el RNAm en una molécula de DNAc. Este método es copiado de los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para generar su genoma de RNA a DNA y duplicarse en millones de partículas virales.

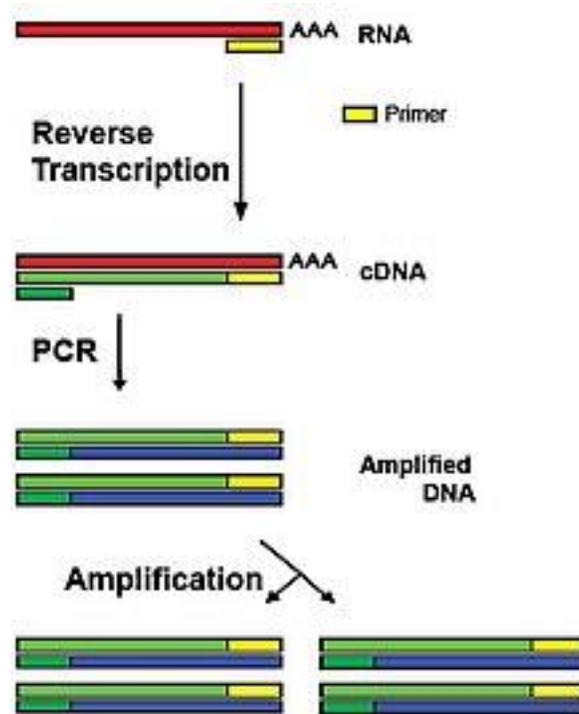


Figura 5. Pasos de la transcripción reversa

El DNAc se utiliza cuando se analiza la expresión del RNAm de algún gen en interés.

Inmunohistoquímica

Es una técnica que permite localizar moléculas en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos, esta técnica permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido gracias a la gran especificidad y alta afinidad de los anticuerpos.

Se utiliza un anticuerpo primario monoclonal específico para las moléculas que se quiera detectar, en las técnicas indirectas se utiliza un anticuerpo secundario unido a una enzima, generalmente peroxidasa para generar una reacción enzima-sustrato y así generar una señal por medio de un producto insoluble de color.

Existen técnicas indirectas que tienen mayor afinidad gracias al empleo de moléculas como la avidina y la biotina que ayudan a generar una mayor sensibilidad en la técnica.

La avidina es una glicoproteína que posee cuatro regiones hidrofóbicas de unión con la biotina.

Por otro lado la biotina es una vitamina que se conjuga fácilmente con anticuerpos y enzimas marcadoras de forma covalente y pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina por una sola molécula de anticuerpo

El Sistema de detección HRP universal Starr Trek utiliza un anticuerpo secundario biotinilado que se une al anticuerpo primario, posteriormente se usa a la estreptavidina marcada con peroxidasa de rabano picante (HRP) para unirse al anticuerpo secundario biotinilado para luego aplicar un cromógeno/sustrato que reacciona con la enzima y generar una señal de color intensa.

Electroforesis

Mediante la electroforesis se pueden separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, se puede visualizar mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Además se pueden extraer del gel los fragmentos de DNA que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del DNA y el RNA hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.