



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Estudio del efecto de la obesidad materna, sobre la muerte celular programada y regulación epigenética, del timo de la progenie.

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA
JESSICA DENIS ARCOS VEGA**

**ASESORA: Dra. Claudine Liliane Irlles Machuca
COASESORA: Dra. María Eugenia Aranda Barradas**

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



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

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.**

Estudio del efecto de la obesidad materna, sobre la muerte celular programada y regulación epigenética, del timo de la progenie.

Que presenta la pasante: **Jessica Denis Arcos Vega**

Con número de cuenta: **310102454** 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 03 de Abril de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Ángel Germán Martínez Sosa</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Ángeles</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Maritere Domínguez Rojas</u>	

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

Reconocimiento

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Claudine Liliane Irlles Machuca, Jefa del Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular del INPer-IER, y forma parte del proyecto: “Efecto de la obesidad materna en el sistema neuroinmune de la progenie evaluado en la etapa neonatal, infancia, adultez y senescencia” con número de registro 2018-1-141, en colaboración con la Dra. Zambrano y el Dr. Reyes del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

Dedicatoria

Este trabajo, es dedicado principalmente a mi familia (mamá, papá, hermano), así como a mi pareja y a mi hija, ya que sin su apoyo y confianza, no estaría aquí.

Pero también se lo dedico, a una persona que estuvo a mi lado por muchos años, a una persona que me apoyó, que me acompañó en tantos momentos de la vida, a esa persona que creyó en mí desde pequeña y que en este momento ya no pudo acompañarme. Dedicado con todo cariño y agradecimiento a mi abue Toño.

Agradecimientos

Agradezco a Dios y a la vida, por darme la oportunidad de llegar a este momento tan esperado.

Agradezco también a mis padres por apoyarme toda la vida, no perder la confianza en mí y siempre darme palabras de aliento cuando más las he necesitado; a mi hermano, por llegar a mi vida, apoyarme y ser mi mejor amigo; a Gustavo por aguantar tantas noches de desvelo y siempre ayudarme en mis momentos de estrés; gracias Luna por llegar a mi vida, por siempre alegrarme la vida con tu voz y tus abrazos, por ser el motor por el cual he llegado a este punto en la vida; a mis suegros (Chio y Luis), por cuidar de Luna en este camino.

A la Dra. Claudine, por sus enseñanzas, creer en mí, darme la oportunidad de trabajar con usted y por ayudarme a tener confianza en mi trabajo, a la Dra. Gaby por su apoyo en el laboratorio, así como al laboratorio de la Dra. Verónica Zaga y su equipo, por prestarnos sus instalaciones en varias ocasiones.

Agradezco a todos los amigos y compañeros que han estado conmigo a lo largo del tiempo; a Ruth, por ser una gran amiga, por hacer de la carrera algo divertido y por su apoyo incondicional (en muchos aspectos) por tanto tiempo; a Anahid, por su amistad y grandes pláticas; Al equipo “Ratatouille” (Talia, Valeria, etc.), por hacer de ese laboratorio un lugar divertido. A mi amigo Diego, por ser una persona especial desde el CCH.

También agradezco a la Dra. Maru Aranda, por su apoyo y por acompañarme en la realización de este trabajo, así como a mis sinodales, Martha Patricia, Ángel, Maritere y Nydia, por sus aportaciones.

Por último, agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que tuve de permanecer en ella a lo largo de casi 10 años, y por dejarme crecer en ella tanto académica, social y profesionalmente.

Índice

Abreviaturas	8
Índice de figuras.....	10
Índice de tablas	10
1. Resumen.....	12
2. Antecedentes	13
2.1 Obesidad.....	13
2.1.1 Etiopatogenia de la obesidad.....	14
2.1.2 Fisiopatogenia de la obesidad	16
2.2 Obesidad materna	18
2.2.1 Hipótesis de reprogramación fetal	19
2.2.2 Efecto de MO sobre la progenie de la rata	22
2.3 Sistema inmune y MO.....	24
2.3.1 Efecto de MO sobre el sistema inmune	26
2.3.2 Linfocitos T	26
Diferenciación y maduración de linfocitos T	28
Selección positiva	30
Selección negativa.....	30
2.3.3 Apoptosis.....	31
Características morfológicas	32
Cambios bioquímicos en la apoptosis	32
2.3.4 Mecanismo de apoptosis	33
Vía intrínseca.....	33
Vía extrínseca.....	33
Vía común	34
Vía intrínseca del retículo endoplásmico (RE)	34
2.3.5 Caspasas (C).....	35
Procaspasas (Pro-C)	36
Tipos y Regulación de C.....	36
2.3.6 Caspasa 3.....	37
2.3.7 Efecto de MO en sistema inmune de roedor.....	37
2.4 Regulación epigenética y su efecto sobre la MO en la progenie de la rata. ...	37
2.4.1 Modificación de histonas.....	38

2.4.2 Histona 3 (H3).....	40
2.4.3 Trimetilación de lisina 4 de la Histona 3	40
3. Justificación.....	41
4. Hipótesis	42
5. Objetivos	42
Objetivo general.....	42
Objetivos particulares	42
6. Material y métodos	42
Diseño experimental	42
Obtención de tejido para extraer proteínas totales mediante lisis celular	43
Cuantificación de proteínas LT por el método de Bradford.....	43
Preparación de muestras LT.....	44
Estandarización para la obtención de proteínas nucleares.....	44
Buffer de CHAPS.....	44
Buffer de RIPA.....	44
Buffer Laemmli 2X	45
Obtención de proteínas nucleares.	45
Separación de proteínas mediante gel de electroforesis desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).	45
Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.	46
Tinción de membrana con Rojo Ponceau	47
Bloqueo de membrana.....	47
Inmunoblot.	47
Revelado.....	48
Análisis estadístico	49
7. Resultados	49
8. Discusión.....	53
9. Conclusiones.....	57
10. Perspectivas.....	57
11. Referencias	58
ANEXOS	67
Anexo 1. Preparación de soluciones, Buffers de extracción de proteínas.....	67
PBS 10X (1 L).....	67
PBS 1X (500 mL).....	67

Buffer de lisis celular (Solución de lisis A)	67
Buffer de CHAPS (Solución de lisis A.1).....	68
Buffer de RIPA (Solución de lisis A.2).....	68
Laemmli 2X con indicador de pH (Solución de lisis nuclear A.3)	69
Laemmli 2X sin indicador de pH (Solución de lisis nuclear B)	69
Solución de lisis C (eritrocitos).....	69
Anexo 2. Preparación de soluciones para preparación de muestras	70
DTT 1M (5 mL).....	70
Laemmli 5X (10 mL).....	70
Anexo 3. Preparación de soluciones para electroforesis y transferencia	70
Buffer de electroforesis 10X (1L)	70
Buffer de electroforesis 1X (1L)	70
Buffer de transferencia 10X (1L)	71
Buffer de transferencia 1X (1L).....	71
TBS 10X pH 7,6 (1 L).....	72
TBS-Tween (TBS-T) 500 mL	72
Anexo 4. Preparación de soluciones, para Ab primarios.....	72
Azida de sodio 10% (100 mL).....	72

Abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
Adenosín de trifosfato	ATP
Anticuerpo	Ab
Antígeno	Ag
Arginina	R
Buffer de fosfatos	PBS
Buffer de tris con detergente	TBS-T
Carbohidratos	CHOs
Caspasa	C
Célula madre hematopoyética	CMH
Célula madre linfoide	CML
Célula presentadora de antígeno	APC
Célula troncal hematopoyética	CTH
Citocromo C	Cit-c
Cluster of differentiation	CD
Complejo de señalización de muerte	DISC
Control	Ctrl
Días postnatales	PND
Dieta alta en grasa	HFD
Ditiotreitol	DTT
Doble negativo	DN
Doble positivo	DP
Dominio de muerte asociado a Fas	FADD
Dominio de muerte asociado a TNFR	TRADD
Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida	SDS-PAGE
Factor activador de proteasa apoptótica 1	Apaf-1
Factor de crecimiento transformante	TGF
Factor de necrosis tumoral	TNF
Factor de transcripción Forkhead box P3	FoxP3
Fase de crecimiento	G1
Fase de crecimiento 2	G2
Fosfatidilserina	PS
Glucocorticoide	GC
Grupo metilo	-CH₃
Histona lisinametiltransferasa	HLT
Histona	H
Histona 3 total	H3T
Histona demetilasa	HDM
Índice de masa corporal	IMC
Ingreso energético	IE

Inhibidor de proteínas apoptóticas	IAP
Inmunoglobulina	Ig
Interferon	INF
Interleucina	IL
Kilodaltons	KDa
Leucemia linfoide mixta	MLL
Ligando Fas	FasL
Linfocito T cooperador	Linfocito Th
Linfocito T regulador	Treg
Linfocito Th17	Th17
Lisado nuclear	N
Lisado total	LT
Lisina	K
Liver x-receptor	LXR
Los orígenes perinatales de la salud y la enfermedad	DOHaD
Macrófago	Mφ
Metil lisina transferasa	MTL
Mitosis	M
Natural Killer	NK
Obesidad materna	MO
Organización Mundial de la Salud	OMS
Pares de bases	pb
Peroxidasa de rábano	HRP
Peso molecular	PM
Polimerasa	RNApol II
Procaspasa	Pro-C
Proto-oncogen de linfoma de linfocitos	Bcl-2
Receptor de factor de necrosis tumoral	TNFR
Receptor de glucocorticoide	GR
Receptor de linfocito B	BCR
Receptor de linfocito T	TCR
Retículo endoplásmico	RE
Rojo ponceau	RP
Semanas de gestación	SDG
Serina	Ser
Síntesis de DNA	S
Temperatura ambiente	TA
Treonina	T
Triacilglicéridos	TAG
Trimetilación de lisina 4 en la histona 3	H3K4me3

Índice de figuras

Figura 1. Regulación de saciedad.....	17
Figura 2. Alteración de adipocinas en obesidad.....	18
Figura 3. Efectos del ambiente transmitidos transgeneracionalmente.....	20
Figura 4. Proceso de linfopoyesis.....	28
Figura 5. Estructura general de timo.....	29
Figura 6. Visión general de la ontogenia de linfocitos T.....	30
Figura 7. Apoptosis.....	32
Figura 8. Vías de señalización de la apoptosis.....	35
Figura 9. Activación de pro-C.....	36
Figura 10. Modificaciones epigenéticas de H.....	39
Figura 11. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares, utilizando Buffer de CHAPS.....	49
Figura 12. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares utilizando Buffer de RIPA.....	50
Figura 13. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares, utilizando Buffer de Laemmli 2X.....	51
Figura 14. Diferencia de peso entre los tejidos obtenidos.....	51
Figura 15. Comparación de la expresión C3 activa en el timo entre grupo Ctrl y grupo MO.....	52
Figura 16. Comparación de la expresión de H3K4me3 entre grupo Ctrl y grupo MO.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS y la NOM-043-SSA2-2012.....	14
Tabla 2. Factores epidemiológicos asociados al exceso de peso.....	16
Tabla 3. Principios de la programación del desarrollo.....	21
Tabla 4. Linfocitos T colaboradores.....	27
Tabla 5. Proteínas anti y pro-apoptóticas.....	33
Tabla 6. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de PBS 10X.....	67
Tabla 7. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A (citoplasma y membrana).....	67
Tabla 8. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A.1 (Buffer de CHAPS).....	68
Tabla 9. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A.2 (Buffer de RIPA).....	68
Tabla 10. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Solución de lisis A.3 (Laemmli 2X con indicador de pH).....	69
Tabla 11. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Solución de lisis B (Laemmli 2X sin indicador de pH).....	69

Tabla 12. Componentes y cantidades para la preparación de 500 mL de Buffer de lisis de eritrocitos.....	69
Tabla 13. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Laemmli 5X.	70
Tabla 14. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de electroforesis 10X.....	70
Tabla 15. SDS-PAGE: Gel separador acrilamida/bisacrilamida 15%.....	71
Tabla 16. SDS-PAGE: Gel concentrador acrilamida/bisacrilamida 5%	71
Tabla 17. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de transferencia 10X.	71
Tabla 18. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de TBS 10X pH 7,6.	72
Tabla 19. Asignación de carriles para marcador de peso molecular (PM), muestras, y Laemmli 5X; así como, cantidades a cargar (Membrana A).....	72
Tabla 20. Asignación de carriles para marcador de peso molecular (PM), muestras, y Laemmli 2X; así como, cantidades a cargar (Membrana B).....	72

1. Resumen

La obesidad es una enfermedad crónica; dicha condición se ha convertido a lo largo del tiempo en un problema de salud pública a nivel mundial y en particular en México, exponiendo de esta manera a las mujeres en edad reproductiva. La obesidad materna (MO, de sus siglas en inglés) se relaciona con diferentes alteraciones en el desarrollo embrionario, así como con riesgos maternos. La hipótesis de Barker habla de la "programación" en la vida temprana (periodo fetal), lo que lleva al desarrollo de enfermedades en la edad adulta. Existen modelos animales de obesidad materna en roedores generada por una dieta alta en grasas (HFD, del inglés *High Fat Diet*) en el embarazo, donde se ha demostrado que las crías son más grandes, con niveles elevados de glucosa y mayor contenido de lípidos hepáticos al momento del destete. Se ha descrito también en estudios epidemiológicos, que la MO tiene repercusiones en el sistema inmune, como la generación de asma. A nivel molecular, estos cambios "programados" quizá reflejen la alteración de la expresión de los genes *in útero* de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, que actúa directamente en la célula o por medio de señales hormonales. La transmisión de los efectos de programación fetal es parte de la herencia epigenética, que puede ser de la línea materna, paterna o ambos. Cabe mencionar que epigenéticamente existen diversas modificaciones post-traduccionales, una de ellas es la metilación; dicha modificación se puede llevar a cabo en residuos de aminoácidos de histonas, donde una hipermetilación puede llevar a un silenciamiento, por ejemplo, la trimetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) o activación, en el caso de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) de genes. Dado que la muerte celular programada juega un papel importante en el desarrollo del sistema inmune (principalmente en timo), las repercusiones inmunológicas descritas en la progenie de individuos con MO pueden ser efecto, entre otros factores, de una alteración en los niveles de apoptosis, que a su vez, podría ser debida a cambios en la expresión de genes dados por elementos epigenéticos.

Por lo que en este trabajo, se evaluaron los niveles de apoptosis (a través del marcador Caspasa 3 activa) y regulación epigenética (niveles de trimetilación de lisina 4 de la histona H3, H3K4me3) en el timo de las crías adultas (130 PND) de ratas Wistar con MO y de ratas control (Ctrl), mediante Western blot.

Se tuvieron dos grupos estudio (Rata Wistar): Grupo control (Ctrl), que consistió en madres con dieta control y grupo Obesidad Materna (MO), que consistió en madres con dieta obesogénica pre-gestacional y lactancia. Se estudió a la progenie de los dos grupos en edad adulta (130 PND): Ctrl (n=5) y MO (n=6) de distintas camadas. En primer lugar se realizó el homogenizado del timo en buffer de lisis de proteínas totales y se aisló el botón celular que corresponde a las proteínas nucleares. Se analizaron las muestras mediante electroforesis de proteínas en gel de

poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y se identificaron las proteínas de interés (expresión de la caspasa ejecutora de la apoptosis, caspasa 3 activa; regulación epigenética determinando los niveles de trimetilación la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3)), por Western blot. El análisis semicuantitativo de la expresión de proteínas se llevó a cabo mediante densitometría y prueba *t* de Student (Kruskal Wallis). Obteniendo que el análisis de expresión de caspasa 3 en el timo de la progenie del grupo MO arrojó una diferencia significativa (4.33 veces mayor) en comparación con el grupo Ctrl, lo cual indica que hay un aumento de la apoptosis en el grupo de obesidad materna. En cuanto a los niveles de la H3K4me3, hubo una diferencia significativa (0.68 veces menor) con respecto al grupo Ctrl, lo que sugiere una desregulación de la transcripción activa de genes debido a la MO. En conclusión, Los resultados obtenidos sugieren que la MO de la hipótesis de Barker involucra cambios epigenéticos en timocitos en la descendencia en edad adulta, así como niveles de apoptosis aumentados, procesos que tendrían consecuencias en el sistema inmune adaptativo. Estos resultados sugieren que la MO podría estar involucrada en una selección negativa de timocitos alterada, o bien, en la involución tímica temprana en la progenie. Sin embargo, aún no se sabe si estos cambios también se ven reflejados desde edades tempranas o bien hasta la edad adulta y la senescencia.

2. Antecedentes

2.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica; es considerada un desequilibrio entre el consumo y gasto de energía, cuando existe un ingreso energético (IE) mayor que el gasto o consumo energético total (CET) y que es almacenado en el tejido adiposo en forma de lípidos, triacilglicéridos (TAG), (aumento de grasa corporal) (González, 2013; y Varela, 2013). Esto lleva a un aumento en los riesgos para la salud (Moreno, 2012), principalmente por el desarrollo de *Diabetes mellitus*, hipertensión arterial, aterosclerosis y dislipidemias (González, 2013). Dicha condición se ha convertido a lo largo del tiempo en un problema de salud pública en México, exponiendo de esta manera a las mujeres en edad reproductiva.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica la obesidad como una pandemia, donde el 13% de la población adulta mundial es obesa, y de ese porcentaje, el 11% son hombres y el 15% mujeres, por lo que el género con mayor susceptibilidad es la mujer (OMS, 2018). Siete de cada diez mexicanos sufren sobrepeso, y tres de esos siete tiene obesidad. Con base en la antropometría, un índice de masa corporal (IMC) de 25 a 29 kg/m², indica sobrepeso; mientras un IMC de 30 kg/m² o más indica obesidad (OMS, 2016). El IMC corresponde a la relación

entre el peso expresado en kilos y el cuadrado de la altura, expresada en metros (OMS, 2016; Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la obesidad según la OMS y la NOM-043-SSA2-2012.

Clasificación	IMC (kg/m ²)	Riesgo Asociado a la salud
Normo Peso	18.5 – 24.9	Promedio
Exceso de Peso	≥ 25	
Sobrepeso o Pre Obeso	25 - 29.9	AUMENTADO
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9	AUMENTO MODERADO
Obesidad Grado II o severa	35 - 39.9	AUMENTO SEVERO
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40	AUMENTO MUY SEVERO

Tomada de Moreno, G. (2012).

En México según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2016), alrededor de 70% (66.7% en varones y 71.9% en mujeres) de la población mexicana adulta padece sobrepeso u obesidad.

Dependiendo de su origen, la obesidad se clasifica en exógena o endógena (Ríos, 2010). La obesidad endógena es causada por una serie de trastornos metabólicos y/o endócrinos, así como de factores genéticos, epigenéticos y fisiológicos; mientras que la obesidad exógena está dada por hábitos alimenticios y actividad física en desequilibrio, aunque también participan una serie de factores ambientales y sociales (factores económicos, tecnológicos, culturales y políticos) (Rivera, Hernández, Aguilar, Vadillo, *et al.*, 2013). Cabe destacar que puede haber una interacción de diversos factores para la susceptibilidad a obesidad.

El incremento de la obesidad se ve impulsado por los cambios en el sistema alimentario mundial, donde la gran cantidad de alimentos que se consumen son procesados.

2.1.1 Etiopatogenia de la obesidad

Como se ha mencionado, la principal causa de la obesidad es el desequilibrio energético; éste se ve afectado por la gran ingesta de grasa, sal, carbohidratos (CHOs), proteínas y una ingesta pobre en micronutrientes. Al haber un exceso de estas biomoléculas y no utilizarse por completo la energía que proviene de su metabolismo, el organismo comienza a transformarla y almacenarla. .

Ahora bien, cabe mencionar que la glucosa es la principal fuente de energía inmediata de casi todos los tejidos, y se metaboliza a piruvato mediante glucólisis para obtener acetil-CoA y dentro del ciclo de Krebs, oxidarse a CO₂, H₂O y, por fosforilación oxidativa generar Adenosín de trifostato (ATP), la principal molécula de transferencia de energía. Otro camino que puede seguir la glucosa es la entrada a la glucogénesis, donde se incorporan unidades repetidas de glucosa para formar glucógeno en hígado y músculo, con el objetivo de almacenar energía para cuando el organismo lo requiera. Cuando las reservas de glucógeno son máximas en el hígado, el exceso de glucosa se desvía hacia la síntesis de ácidos grasos.

Por otro lado, la principal reserva de energía son los triacilglicéridos (TAG). Estos provienen de ácidos grasos (dieta o β -oxidación) y glicerol (proveniente de CHOs por la vía de las pentosas o acetil-CoA), mediante un proceso de lipogénesis.

Asimismo, el metabolismo de las proteínas conlleva a su desaminación, generando urea y esqueletos de carbono, que se oxidan a CO₂ nuevamente por el ciclo de Krebs, para generar ATP, y/o sintetizar ácidos grasos (si no se consume esa energía), o bien, participar en la gluconeogénesis (Nelson, Lehninger y Cox, 2013).

Estos mecanismos de reserva de energía no consumida generan el aumento progresivo de peso y grasa corporal causantes de la obesidad.

Actualmente, el aumento de personas con sobrepeso y obesidad se debe en parte a la poca actividad física debido al sedentarismo, provocado por las actividades laborales, el transporte, y la gran variedad de establecimientos con comida rápida.

Siendo una enfermedad multifactorial (genética, ambiente, metabolismo, endocrinología), se conoce que sólo del 2 al 3% de obesos, tienen alguna enfermedad endocrinológica, como hipotiroidismo, síndrome de Cushing, hipogonadismo y lesiones hipotalámicas asociadas a hiperfagia (Moreno, 2012), donde se pueden ver afectadas las hormonas implicadas en la sensación de saciedad (leptina, grelina, insulina, etc).

Estudios epidemiológicos han encontrado diversos factores relacionados al sobrepeso y a la obesidad (Tabla 2).

Tabla 2. Factores epidemiológicos asociados al exceso de peso.

Demográficos	Socioculturales	Biológicos	Conductuales	Actividad Física
>Edad	< Nivel educacional	> Paridad	< Ingesta alimentaria	Sedentarismo
Sexo femenino	< Ingreso económico		Tabaquismo	
Raza			Ingesta de alcohol	

Tomada de Moreno, G. (2012).

Ahora bien, se ha llegado a pensar que la microbiota intestinal influye en el desarrollo de la obesidad, ya que un desequilibrio en su composición, llega a asociarse con resistencia a la insulina así como al aumento de peso corporal (González, 2013). Sato, *et al.*, (2008), comprobó que *Lactobacillus gasseri* en leche, disminuye el tamaño de los adipocitos, y reduce los niveles de leptina en suero.

Considerando los factores genéticos y epigenéticos, se ha propuesto que desde etapas tempranas (fetal), se tiene una programación hormonal, psicológica y física que predispone a esta condición (González, 2013). Hasta el momento se han encontrado genes considerados como posibles inductores de obesidad, esto debido a polimorfismos (Doo, Kim, 2011).

2.1.2 Fisiopatogenia de la obesidad

La obesidad, debe entenderse como una enfermedad crónica multifactorial, con una alteración funcional del tejido adiposo. La principal célula del tejido adiposo es el adipocito, que cumple la función de almacenar energía en forma de TAG en sus cuerpos lipídicos; sin embargo, en él, se encuentran células del sistema inmune, como, macrófagos (M ϕ), linfocitos T, además de fibroblastos, preadipocitos, etc. (Suárez, Sánchez y González, 2017).

El adipocito, además de tener la función de reserva energética, tiene función endócrina, ya que secreta adipocinas (citocinas) que se ven implicadas en procesos proinflamatorios (factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-6), resistina), antiinflamatorios (adiponectina), y homeostasis metabólica (leptina) (Oliveira, Meneguz, Aguiar y Barreto, 2011; Suárez, Sánchez y González, 2017), donde algunas de éstas moléculas se ven relacionadas en la regulación de la saciedad. (Figura 1).

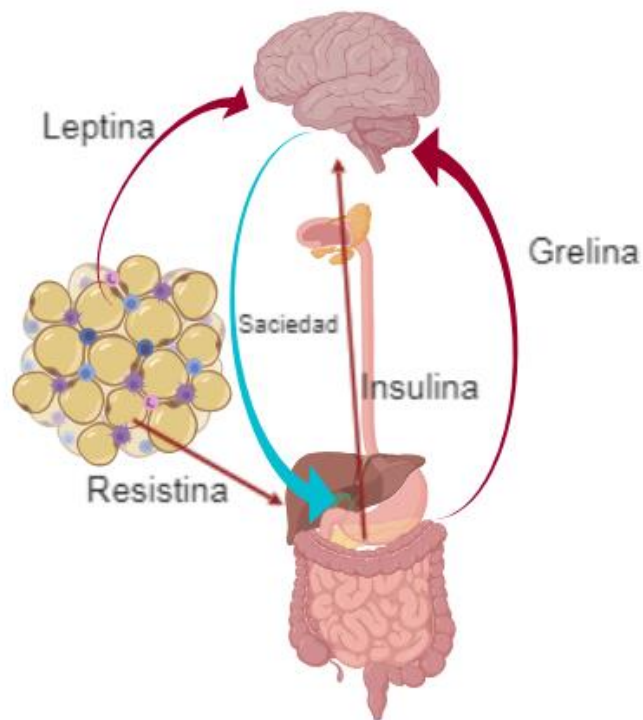


Figura 1. Regulación de saciedad.

La grelina, es una hormona secretada por células enteroendócrinas (fundus gástrico), que llega al hipotálamo dando una señal orexigénica. Leptina, insulina y resistina, aumentan sus concentraciones, regulando la secreción de grelina, favoreciendo un estado de saciedad.

Una dieta alta en grasa (HFD, por sus siglas en inglés *High Fat Diet*), hace que los preadipocitos comiencen a proliferar a nivel visceral; cuando el adipocito llega a su máxima capacidad (20 veces sus diámetro), éste llega a la hipertrofia, que conlleva a resistencia a la insulina, hipoxia, estrés intracelular y apoptosis (Suárez, Sánchez y González, 2017; Barrios, Barrios y Vergara, 2013). Así mismo, las adipocinas sufren un desequilibrio, ya que al existir un proceso inflamatorio, se produce en mayor cantidad TNF- α e IL-6, que en conjunto, disminuyen o inhiben la producción y secreción de adiponectina (aumentando la cantidad de TAG) (Figura 2), que se ha visto relacionada con resistencia a la insulina y *diabetes mellitus* tipo 2; a su vez, existe un aumento de leptina (regula la ingesta de alimento, peso corporal, gasto energético), debido a que su secreción es proporcional a la masa de tejido adiposo (Sánchez, García, Alarcón y Cruz, 2005; Domínguez, 2007) .

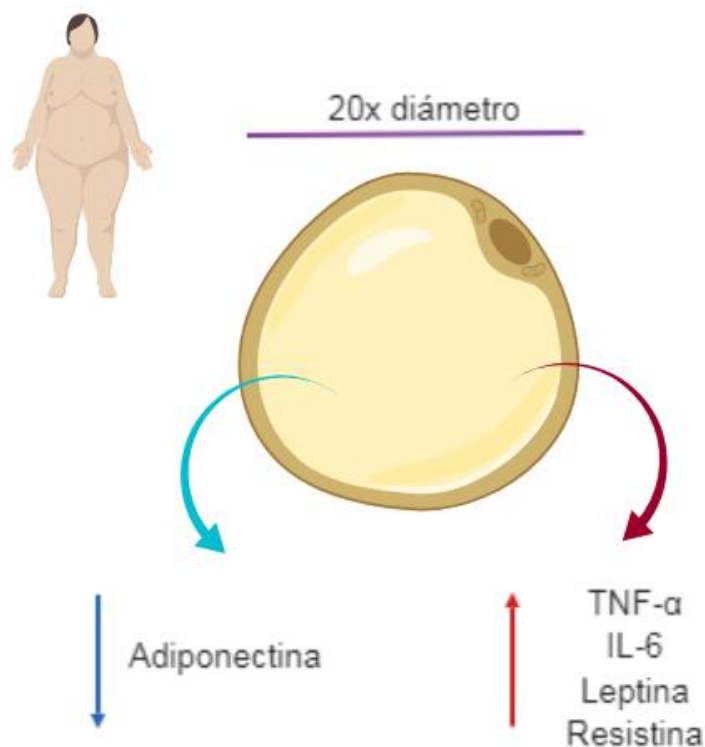


Figura 2. Alteración de adipocinas en obesidad.

El adipocito, puede llegar a su máxima capacidad (20 veces su diámetro), y consigo llegar a la hipertofia; esta alteración lleva a la disminución en la secreción de adiponectina, y elevación en los niveles de moléculas pro-inflamatorias y hormonas.

La relación de obesidad con el aumento de leptina, favorece un estado aterogénico, protrombótico y angiogénico, desarrollando de esta manera hipertensión, inflamación y estrés oxidativo (Oliveira, Meneguz, Aguiar y Barreto, 2011).

Dentro del adipocito, se lleva a cabo un proceso metabólico, mediante el cual, en un estado de hipoglucemia, los TAG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados para obtener ácidos grasos que se dirigirán a músculo esqueleto e hígado (obtener ATP mediante β -oxidación), y glicerol que llegará al hígado (obtener glucosa mediante gluconeogénesis); ahora bien, su efecto contrario es la lipogénesis, donde a partir de acetyl-CoA se producen ácidos grasos (tejido adiposo e hígado) (Nelson, Lehninger y Cox, 2013).

2.2 Obesidad materna

Las infecciones maternas y la desnutrición son factores ambientales intrauterinos que afectan el desarrollo del feto (Skogen y Overland, 2012), lo que eleva la

posibilidad de que en la edad adulta se desarrollen diversos desórdenes o enfermedades, como por ejemplo el aumento en la susceptibilidad a infecciones, predisposición para asma, así como a ciertos tipos de cáncer (Wilson y Messaoudi, 2015; Godfrey, Reynolds, Prescott, Nyirenda, *et al.*, 2017).

La obesidad materna (MO, de sus siglas en inglés), se ha convertido en un problema de salud pública. Se relaciona con diferentes alteraciones en el desarrollo embriofetal, así como con riesgos maternos (diabetes, preeclampsia, cesárea, mortalidad materna) (Farías, 2015), por lo que se considera de alto riesgo. Hasta el momento se conoce que esta condición tiene repercusiones en la descendencia, considerando un riesgo muy alto de padecer defectos congénitos, defecto del tubo neural, gran incidencia de macrosomía (tamaño excesivo), enfermedades metabólicas, diabetes, mortalidad fetal, susceptibilidad a obesidad en etapas como en la adolescencia y edad adulta (Satpathy, Fleming, Frey, Barsoom, *et al.*, 2008).

Esta condición induce un deterioro de las funciones corporales de la madre, afectando principalmente a los aparatos cardiovascular, óseo, reproductivo y digestivo (Oviedo, Marcano, Morón y Solano, 2007). Las investigaciones científicas, han podido demostrar que la salud está relacionada con la calidad de vida desde el ambiente perinatal, y que esto puede programar la predisposición a distintas patologías.

2.2.1 Hipótesis de reprogramación fetal

La hipótesis de Barker postula que la "programación" en la vida temprana es el origen perinatal de la salud y la enfermedad (DOHaD, de sus siglas en inglés, *Developmental Origin of Health and Disease*). Propone que una programación fisiológica y metabólica en una ventana de tiempo crítica, como lo es la gestación y la lactancia, lleva al desarrollo de enfermedades en la edad adulta (Mandy, 2018), debido a alteraciones metabólicas, desde nutrientes y hormonas como las adipocinas (leptina, adiponectina, prostaglandinas (PGI₂, PGF₂α)) (Barrios, Barrios y Vergara, 2013), hasta mediadores inflamatorios como IL-6, IL-1β, TNF-α (Farías y Oyarzún, 2012). Por ejemplo se ha observado un aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias, es por esto que el desarrollo fetal depende del ambiente intrauterino y de la alimentación de la madre (Segovia, Vickers, y Reynolds, 2017).

La programación fetal se ha definido hasta el momento como un proceso de adaptación por el cual factores ambientales y nutricionales alteran el desarrollo durante el periodo de crecimiento perinatal, llevando a cambios metabólicos posnatales y la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónicas en la edad adulta (Barrera y Fernández, 2015).

Existe evidencia de que un ambiente obesogénico intrauterino favorece el desarrollo de adiposidad en los bebés, por lo que incrementa la probabilidad de que al nacer tengan un tamaño mayor para su edad gestacional y que estén más propensos a presentar sobrepeso u obesidad a lo largo de su vida.

La transmisión fenotípica por herencia epigenética muestra que el ambiente intrauterino generado por la madre (F0), programa no solo al feto (F1), sino, también a sus células germinales (F2), por lo que estos cambios fenotípicos pasan de generación en generación (Vickers, 2014) (Figura 3).

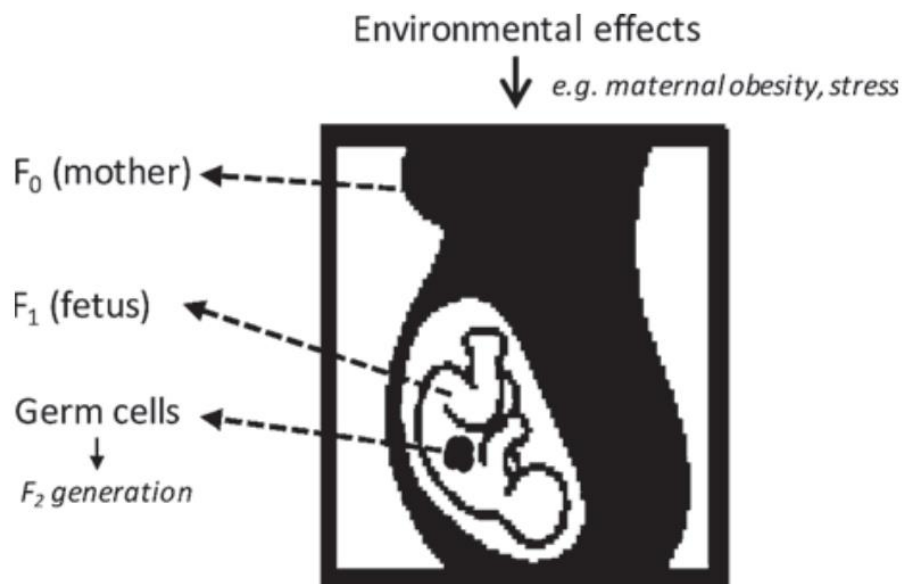


Figura 3. Efectos del ambiente transmitidos transgeneracionalmente.

Un ambiente materno adverso (F0), afecta no solo el desarrollo del feto (F1) sino que también puede llegar a afectar a las células germinales que formaran a la generación F2. Tomada de (Vickers, 2014).

Por otra parte, la condición contraria a la MO es la desnutrición, donde Barker sugirió que dicha condición en distintos trimestres de embarazo, tendría un efecto diferente en el peso al nacimiento y las enfermedades a desarrollarse en la edad adulta; las madres que se encuentran en esa condición, tienen gestantes que modifican su metabolismo para aprovechar y almacenar de manera más eficiente la energía y los nutrientes disponibles (Rivera, Hernández, Aguilar, Vadillo, *et al.*, 2013).

Algunos modelos animales han ayudado para conocer los principios fundamentales de la programación en el desarrollo fetal (Tabla 3). Entre ellos están los siguientes: 1) existe una programación que puede tener efectos permanentes y como consecuencia modificar la susceptibilidad a enfermedades y generar cambios morfológicos y estructurales en órganos; 2) el desarrollo fetal depende de diversas actividades (alimentación, fármacos, drogas, enfermedades maternas) y 3) la

programación pasa de generación en generación y es distinta en hombres y mujeres (Nathanielsz, 2006).

Tabla 3. Principios de la programación del desarrollo

Principio	Descripción
1	<p>Durante el desarrollo, hay períodos críticos de vulnerabilidad a las condiciones no óptimas (disminución de O₂, suministro de nutrientes, exposición hormonal). Los períodos vulnerables ocurren en diferentes momentos para diferentes tejidos, siendo las células que se dividen rápidamente las que están en mayor riesgo. Los factores que aumentan el riesgo incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Exceso o deficiencia de una sustancia endógena (Hormonas, nutrientes o vitaminas); ○ Productos exógenos anormales (alcohol o nicotina); y ○ Condiciones fisiológicas atípicas (presión arterial alta).
2	<p>La programación tiene efectos permanentes que alteran las respuestas en la vida posterior y pueden modificar la susceptibilidad a las enfermedades.</p>
3	<p>El desarrollo fetal depende de la actividad. El desarrollo normal del órgano, depende de la actividad normal continua de dicho órgano. Cada fase de desarrollo proporciona las condiciones requeridas para el desarrollo posterior.</p>
4	<p>La programación involucra varios cambios estructurales en órganos importantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ El número absoluto de células en el órgano puede aumentar o disminuir; ○ Las proporciones relativas y la distribución de diferentes tipos de células dentro del órgano pueden estar desequilibradas; ○ El suministro normal de sangre al órgano puede alterarse; y ○ El exceso o deficiencia de receptores hormonales pueden presentarse como consecuencia de mecanismos de control, como la retroalimentación hormonal (positiva o negativa)
5	<p>La placenta juega un papel clave en la programación fetal ya que secreta de manera exacerbada citocinas pro-inflamatorias, glucosa, lípidos y</p>

	aminoácidos, exponiendo al feto a este medio ambiente alterado.
6	La compensación fetal tiene un precio. En un entorno desfavorable (nutricio, estrés, etc.), el bebé en desarrollo intenta compensar las deficiencias. Después de la compensación, el peso al nacer puede ser normal o solo ligeramente reducido. Sin embargo, el esfuerzo compensatorio tiene un precio (mayor supervivencia celular en órganos “preservados, disminución de masa muscular, etc.).
7	Los intentos realizados después del nacimiento para revertir las consecuencias de la programación pueden tener sus propias consecuencias no deseadas. Cuando las condiciones postnatales son diferentes de aquellas para las cuales el feto se preparó, pueden surgir problemas.
8	Los mecanismos celulares fetales a menudo difieren de los procesos adultos. Los fetos reaccionan de manera diferente a las condiciones no óptimas que los bebés recién nacidos o adultos.
9	Los efectos de la programación pueden pasar de una generación a otra por mecanismos que no necesariamente implican cambios en los genes.
10	La programación a menudo tiene diferentes efectos en hombres y mujeres.

Tomada de Nathanielsz, P. (2006).

2.2.2 Efecto de MO sobre la progenie de la rata

A lo largo de los años, los modelos animales han contribuido al entendimiento de diversos procesos fisiológicos, como el equilibrio energético. Así mismo, dentro del concepto de obesidad, han ayudado al estudio de sus bases fisiológicas y genéticas.

Uno de los descubrimientos en modelos animales que dio pie a investigaciones sobre obesidad, fue el descubrimiento de la leptina (Zhang, Proenca, Maffei, Barone, *et al.*, 1994), hormona codificada por el gen *ob*, producida en el tejido adiposo. Su receptor se encuentra en el hipotálamo y tiene la función de regular la síntesis y degradación de lípidos, participa en la ingesta de alimentos por medio de la señal de saciedad, así como en el aumento de CET (gasto energético total) (Rosado, Monteiro, Chaia y Do Lago, 2006). Así mismo, algunos modelos animales de obesidad han contribuido para la realización de estudios sobre los efectos

ambientales a nivel molecular, como la epigenética (Speakman, Hambly, Mitchell, y Król, 2008).

Existen modelos animales de obesidad materna en roedores, donde se ha demostrado el efecto de la programación fetal en la progenie (Zambrano y Nathanielsz, 2013). Sin embargo, de los mecanismos subyacentes se conocen poco.

La dieta alta en grasa (HFD), es un modelo común implementado con éxito en el embarazo; las crías de estas ratas son más grandes, con niveles elevados de glucosa y mayor contenido de lípidos hepáticos al momento del destete (Bautista, Martínez y Zambrano, 2009). En un modelo similar (ratones), la MO se asoció a un comportamiento hiperfágico, reducción en la locomoción, aumento de la adiposidad, hígado graso y resistencia a la insulina en las crías a los 3 y 6 meses de edad.

A la fecha no están completamente definidos los mediadores moleculares y/o las vías de señalización de la madre que participan en la programación del fenotipo metabólico de sus crías en desarrollo. Se ha reportado que pueden estar implicados mediadores hormonales metabólicos (insulina, leptina, resistina, etc.), nutrientes (glucosa, ácidos grasos, TAG, etc.) y citocinas inflamatorias (IL, TNF- α), etc. (Almanza, Blancas, García, Alarcón, *et al.*, 2008).

Por otro lado, los niveles de leptina en sangre podrían estar implicados en la programación de obesidad. Se ha observado que ésta aumenta en los hijos de mujeres con obesidad o diabetes gestacional y se encuentra reducida en aquellos con restricción del crecimiento intrauterino. Además, algunas citocinas inflamatorias se encuentran elevadas en la MO y se han postulado como mediadores potenciales de la programación metabólica; sin embargo, la información aún es escasa (Farías, 2015).

Diversas investigaciones han demostrado que la dieta materna HFD en ratones se asocia a un aumento de tamaño corporal y poca sensibilidad a la insulina, que persiste en la generación F2 a través de los linajes maternos y paternos (Dunn y Bale, 2009). En otro trabajo, se encontró que la MO se asocia a la presencia de un depósito hepático, con una cantidad aumentada de lípidos y glucógeno, además de algunos marcadores de estrés del retículo endoplásmico (RE) (que lleva a apoptosis celular), e intolerancia a la glucosa, principalmente en los machos adultos evaluados a los 120 días postnatales (Farías, 2015).

Ahora bien, se ha estudiado en la progenie macho de ratas cepa Sprague Dawley, con una HFD, cambios en su sistema reproductor, con una capacidad reproductiva comprometida, así como una predisposición a un aumento de peso a lo largo de su vida (Blanco, 2018). En la rata Wistar, se ha llegado a demostrar que la obesidad tiene un efecto negativo en sus aparatos cardíaco, reproductivo y digestivo (Tejada,

2017); así como obesidad visceral, esteatosis hepática e hipercolesterolemia en la progenie adulta (Dos Santos, Dos, Santos, Dos Santos, Matos, *et. al*, 2015).

En ratas Zucker obesas, se demostró que los cardiomiocitos presentan un aumento considerable de proteínas pro-apoptóticas, de la familia Bcl-2 (proto-oncogen del linfoma de los linfocitos B). Así mismo, el corazón de ratas obesas presenta un incremento de Citocromo C (Cit-c) citosólico, además de niveles altos de caspasas (C), como C9 y C3 activa (Lu, Tzang, Kuo, Wu, *et. al*, 2007). Se sabe que la sobrenutrición materna produce alteraciones en la programación fetal, ya que el nuevo organismo está expuesto a un gran estrés oxidativo (Blanco, 2018).

2.3 Sistema inmune y MO

El sistema inmune lleva a cabo diversas funciones, como reconocer, contener y si es posible, eliminar alguna infección, regular la respuesta inmune, y generar memoria para posteriores infecciones (Murphy, Travers y Walport, 2009).

La inmunidad innata, es la primera línea de defensa del hospedero ante microorganismos. Su importancia radica en la prevención de infecciones y eliminación de agentes extraños; dentro de este tipo de respuesta, se encuentran distintos componentes, entre ellos, barreras mecánicas: piel, epitelio respiratorio, epitelio digestivo; químicas: ácidos grasos, enzimas, pH; microbiológicas: microbiota, péptidos antibióticos (defensinas), células efectoras (neutrófilos, monocitos, M ϕ ; proteínas efectoras: sistema complemento, proteína C reactiva (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

El complemento, es un sistema que modifica la membrana de los patógenos, mediante tres funciones principales: amplificación (inflamación), opsonización y lisis; su activación se da por tres distintas vías, la vía clásica, depende de Ab que se fijan a los Ag del microorganismo; la vía de lectina, reconoce CHOs y participan proteínas de fase aguda (IL-6); la vía alterna, se activa por el reconocimiento de endotoxinas. Estas vías, llevan tanto a la formación del MAC (Complejo de ataque a la membrana), que ayuda a la lisis bacteriana (gram positivas), o la opsonización (Ig, C3b, C4b, I_c3B), y fagocitosis (Murphy, Travers y Walport, 2009).

Los microorganismos patógenos y de la microbiota (principalmente en neonatos) (La Rosa, Gómez y Sánchez, 2014), liberan sustancias que llevan a la estimulación y activación de la inmunidad innata, y muchas de ellas son compartidas por distintos agentes, conocidos como PAMPS (patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos); ahora bien, este sistema, también reconoce sustancias endógenas liberadas por células dañadas, llamadas DAMP (patrones moleculares asociados a daño) (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015), que son

reconocidas por receptores celulares denominados receptores tipo Toll (TLR) (Hanamsagar, Hanke y Kielian, 2012).

El sistema inmune adaptativo, también conocido como adquirido o específico, es capaz de responder a un gran número de antígenos (Ag) capaces de evadir la respuesta inmune innata; sólo se encuentra en vertebrados y su respuesta es tardía (horas o días). La respuesta inmune adaptativa es mediada por linfocitos B, T y sus productos; éstos reconocen y responden a una gran variedad de Ag gracias a sus receptores Ag-específicos.

Los receptores de los linfocitos T (TCR, T cell receptor) son el resultado de la recombinación de segmentos génicos que dan lugar a un gen funcional que se transcribe y traduce en receptores proteicos, dando así protección de memoria a moléculas antigénicas específicas, mediante expansión clonal (Abbas, Lichtman y Pillai, 2015).

La respuesta inmune depende de la actividad de los linfocitos, los cuales se producen en la médula ósea gracias a citocinas e IL; así mismo, viajan en sangre periférica hacia el órgano linfoide en el cual madurarán completamente, o bien, se transportan en su estado maduro hacia los tejidos del organismo.

Esta respuesta está dada por dos mecanismos, la respuesta inmunitaria celular y la respuesta inmunitaria humoral. La respuesta inmunitaria celular es mediada y realizada por linfocitos T, y constituye la principal defensa ante microorganismos intracelulares. Dicha respuesta inicia gracias a las células presentadoras de antígeno (APC), que pueden ser monocitos, macrófagos, linfocitos B, células dendríticas, o células de Langerhans (M ϕ epiteliales) (Sanz, Martín, Reyes y Martín, 2013). Estas células transportan al Ag y segregan IL-1 hacia los linfocitos T CD4+ para su activación. La respuesta inmunitaria humoral se basa en la activación de linfocitos B, que producen anticuerpos (Ab) contra algún Ag específico, mientras que otros linfocitos B se convierten en células de memoria (Saz, 2000). Así mismo, se ven implicadas las proteínas del complemento; este tipo de respuesta es la principal defensa ante infecciones bacterianas (Toche, 2012).

Ambos tipos de respuesta inmune adquirida (humoral y celular) poseen características fundamentales, como, especificidad (capacidad de reconocimiento específico de cada Ag por parte de los linfocitos), diversidad (respuesta a una gran variedad de microorganismos), memoria (amplificación de la respuesta debido a diversas reexposiciones, siendo más eficaz y precoz), especialización (respuesta óptima a diferentes microorganismos) y no reconocimiento y respuesta hacia lo propio (Toche, 2012).

2.3.1 Efecto de MO sobre el sistema inmune

Tanto la MO como el desarrollo de obesidad en el infante se consideran un factor de riesgo de desarrollar asma. Algunos cambios en la metilación del DNA de células mononucleares tienen repercusiones en el sistema inmune, produciendo en cantidades elevadas IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-1B (citocinas inflamatorias), y en cantidades menores IL-10 e IL-4 (citocinas antiinflamatorias), favoreciendo de esta manera el desarrollo de este padecimiento (Castro, Krause, Uauy y Casanello, 2016).

2.3.2 Linfocitos T

Los linfocitos son las células más características del sistema inmune adaptativo; su denominación "T" se debe a que su maduración se lleva a cabo en el timo. Son los encargados de la eliminación de células infectadas y la producción de citocinas que activan a otras células del sistema inmune responsables de coordinar la respuesta inmune de tipo celular (M ϕ) (Muñoz, Regueiro y Fernández, 2016), así como de cooperar con la producción de Ab por los linfocitos B.

Los linfocitos expresan receptores complejos en su superficie (receptores de Ag), los cuales les confieren la capacidad de reconocer distintas moléculas (Ag) pertenecientes a los agentes infecciosos (Muñoz, Regueiro y Fernández, 2016). Los linfocitos T de cada individuo presentan una propiedad conocida como restricción MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), lo que indica que sólo pueden reconocer un Ag si éste se presenta por una molécula MHC. Así mismo, cada linfocito T, tiene en el TCR, una especificidad dual, donde éste reconoce péptidos y a su vez, moléculas MHC que presenta.

Existen dos tipos de linfocitos T, los cuales se diferencian por la expresión de dos moléculas de superficie distintas conocidas como Cluster of differentiation (CD), CD4+ y CD8+, las cuales determinan sus funciones efectoras en la inmunidad adaptativa.

Los linfocitos Th expresan el CD4+, estas células, llevan a cabo la secreción de citocinas que estimulan a los linfocitos B para la producción de Ab y las actividades microbicidas por los M ϕ . Estos tipos de linfocitos reconocen péptidos, que dependiendo de las citocinas que producen, se subdividen nuevamente en Th1 o Th2. Los linfocitos Th1, secretan IL-2 (llamada T-cell growth factor o TCFG), Interferon gamma (INF- γ), TNF- α , TNF- β y responden ante patógenos intracelulares, estimulando el crecimiento (expansión clonal) de los linfocitos que reconocen al Ag en cuestión y proceden a la fagocitosis o bien a la destrucción de la célula infectada (linfocitos T citotóxicos) (Toche, 2012). Los linfocitos Th2, cooperan en la respuesta humoral, principalmente para que los linfocitos B segreguen Ab junto con IL-4, IL-5,

IL-6, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (González, Fernández y Lorenzo, 2005), ante patógenos extracelulares y parásitos.

Ahora bien, los linfocitos T citotóxicos expresan el CD8+; éstos llevan a cabo la lisis celular de aquellas células que presentan Ag extraños en la superficie de su membrana y de aquellas células tumorales. Éste tipo de linfocitos liberan proteínas almacenadas en sus gránulos, como perforinas, que producen poros en la membrana celular e inducen la lisis osmótica, y granzima β , que ingresa a la célula dañada por poros, e induce la muerte celular por la fragmentación del DNA (apoptosis).

Se ha descrito otra subpoblación de linfocitos T, conocida como linfocitos T reguladores (Treg), que se caracterizan por expresar de CD4+, CD25+, y la expresión específica del factor de transcripción “Forkhead box P3” (FoxP3) (Moncrieffe, 2005). Este tipo celular regula la respuesta inmune manteniendo una homeostasis, y evitando respuestas autoinmunes; su principal función, es inhibir a los linfocitos, mediante la expresión de IL-10, TGF- β y adenosina (la unión a su receptor A2Ar, induce la producción de AMPc, donde su acumulación, conlleva a la disminución de IL-2, por lo tanto una baja proliferación de linfocitos T) (Moncrieffe, 2005; Rueda, Velilla, Rojas y Rugeles, 2012).

Recientemente se ha identificado un subtipo más de linfocitos T, conocido como Th17 (Th17) (predominio pro-inflamatorio). Este subtipo celular cumple sus funciones frente a bacterias extracelulares y hongos, mediante la secreción de IL-17 (Moran, 2006).

Tabla 4. Linfocitos T colaboradores

Tipo celular	Agente estimulador	Factor de diferenciación	Citocinas
Th1	Bacterias intracelulares / virus	IL-12	IL-2, IFN- γ
Th2	Helmintos	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13
Th17	Bacterias extracelulares / hongos	TGF- β / IL-6	IL-17, IL-6

IFN: interferón; IL: interleucina; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; Th: linfocito T colaborador.

Tomada de Serrano, A. (2009).

Los linfocitos T a su vez expresan CD2 y CD3, que son marcadores que los diferencian de los linfocitos B (González, Fernández y Lorenzo, 2005).

Diferenciación y maduración de linfocitos T

Los leucocitos se producen en la médula ósea roja; provienen de una célula troncal hematopoyética (CTH) que dará lugar a una célula madre hematopoyética (CMH), la cual al ser estimulada con factores de crecimiento como IL-1 e IL-6 producirá una célula madre linfoide (CML). Ésta célula dará lugar a precursores de linfocitos B y linfocitos T (linfoblastos), que se diferenciarán por las citocinas que las estimulen (Figura 4).

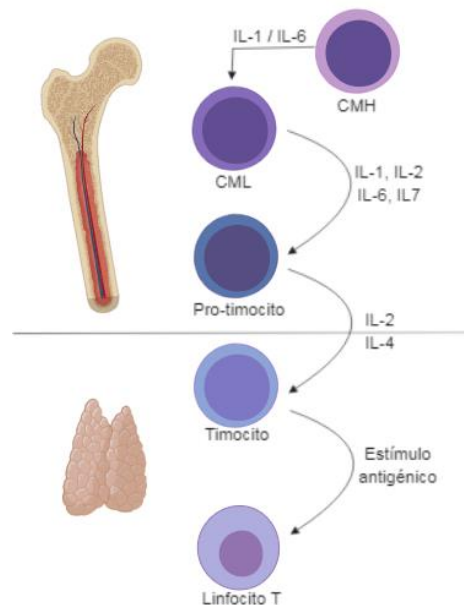


Figura 4. Proceso de linfopoyesis.

En la médula ósea se tiene a la célula madre hematopoyética (CMH), que al ser estimulada por citocinas (IL-1 e IL-6) se diferencia a célula madre linfoide (CML), nuevamente cuando es estimulada por IL-1, IL-2, IL-6 e IL-7, da lugar a un pro-timocito. Éste, al interactuar con IL-2 e IL-4, se desplaza al timo, donde será ahora un timocito y sufrirá un proceso de selección, maduración y diferenciación para después por un estímulo antigénico, ser un linfocito T activo en sangre periférica.

La diferenciación y maduración de los linfocitos T se lleva a cabo en el timo, que es un órgano linfoide primario. En mamíferos, se localiza en el mediastino superior y anterior, formado por 2 lóbulos, rodeado por tejido conectivo (que forma la cápsula) donde se encuentran tanto vasos sanguíneos como linfáticos, así como la inervación del órgano. Dentro de cada lobulillo se encuentra una gran cantidad de linfocitos T en sus distintas etapas de maduración, por lo que a cada una de estas células se les conoce como timocitos (Chávez, Rojas, Fortoul y Tenorio, 2017).

El timo es el primer órgano linfoide que se forma y su crecimiento sigue después del nacimiento debido a la demanda de linfocitos T maduros. En rata éste órgano sigue creciendo hasta alcanzar la madurez sexual; sin embargo, al pasar el tiempo, comienza su involución gradualmente (Pearse, 2006).

Las células epiteliales corticomedulares del timo contienen una gran diversidad de células, como linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y células neuroendócrinas, principalmente. Se divide en corteza y médula, separadas por una zona corticomedular vascular.

Los protimocitos (linfoblastos), migran de la médula ósea y entran al timo a través de la vasculatura en la unión corticomedular y sufren cuatro etapas de maduración; ésto mientras pasan de la zona subcapsular a través de la corteza a la médula y finalmente entran en la circulación como células T periféricas maduras (Figura 5).

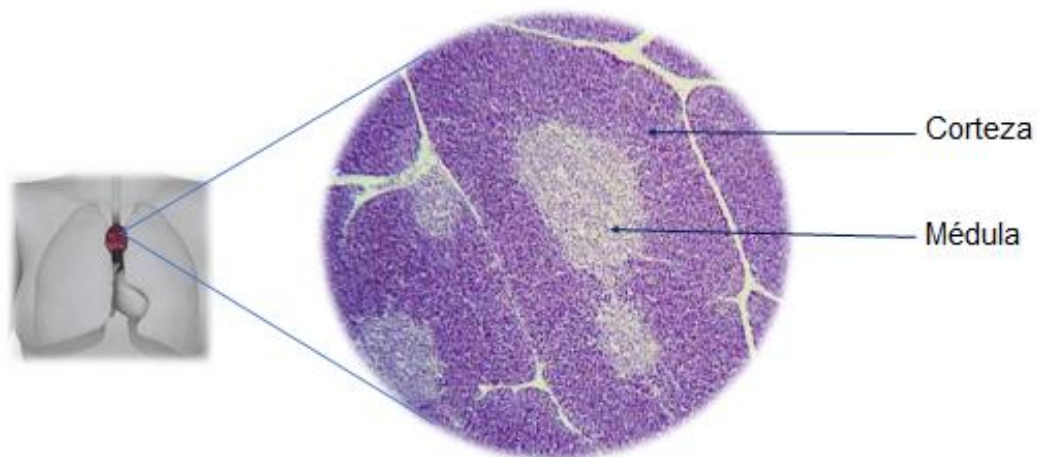


Figura 5. Estructura general de timo.

El timo es un órgano linfoide primario, encargado de la diferenciación y maduración de linfocitos T; tiene dos estructuras importantes que son la corteza y la médula.

Durante la migración intratímica, los timocitos proliferan y se diferencian; ocurren cambios en el tamaño celular y la expresión de Ag de diferenciación y receptores de IL. El cambio fenotípico está acompañado por el reordenamiento del gen del TCR (Pearse, 2006). Así mismo, los timocitos están expuestos a antígenos propios, a los cuáles, deben de ser tolerantes y en este sentido el regulador transcripcional autoinmune AIRE juega un papel crítico al ser responsable de inducir la expresión de antígenos propios por las células epiteliales medulares del timo, a nivel de la selección negativa (Anderson, Venanzi, Chen, Berzins, *et al.*, 2005).

El proceso de maduración de los linfocitos T es complejo y se pueden caracterizar sobre la base del fenotipo inmunológico de las células. Cuando los timocitos ingresan a la corteza tímica no expresan en su superficie el TCR-CD3, ni sus correceptores CD4 y CD8 (Ag de diferenciación). Debido a la ausencia de expresión de correceptores, estos timocitos son denominados dobles negativos (DN; CD4- / CD8-) inmaduro. Una vez en la corteza, los timocitos expresan tanto CD4 como CD8 simultáneamente, por lo que se les denomina células dobles positivas (DP; CD4+ / CD8+). En este estadio de maduración, el timocito es denominado pro-linfocito T (esencial para la selección positiva) (Chávez, Rojas, Fortoul y Tenorio, 2017).

Ahora bien, el compromiso del TCR con MHC-I conlleva a la diferenciación en precursores de linfocitos T citotóxicos (CD4- / CD8 +); por otra parte, el compromiso del TCR con MHC-II, lleva a la diferenciación en precursores de linfocitos Th (CD4+ / CD8-) (estos fenotipos positivos y maduros se encuentran en la médula) (Pearse, 2006) (Figura 6).

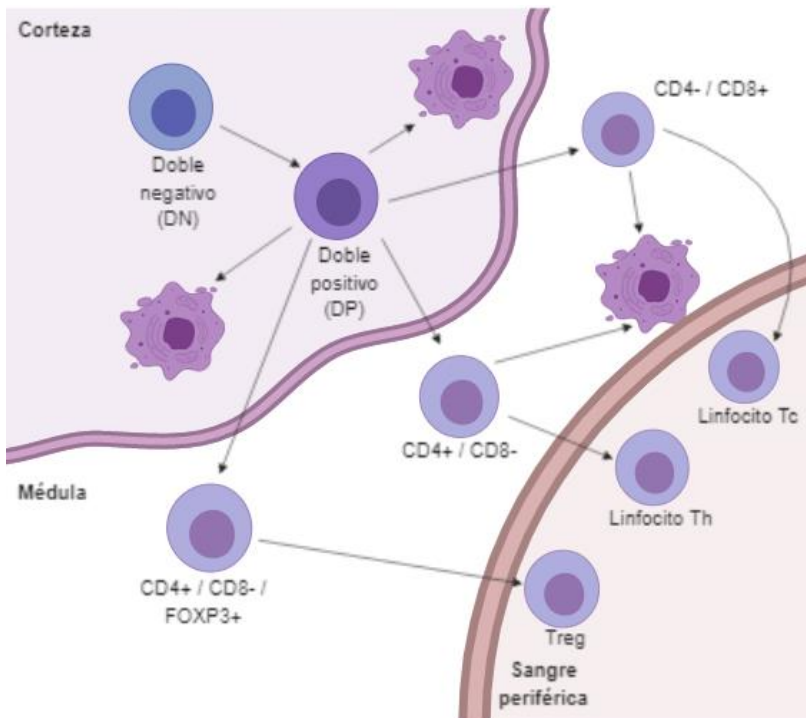


Figura 6. Visión general de la ontogenia de linfocitos T.

La selección positiva lleva a la eliminación de clones de linfocitos T incapaces de reconocer al MHC-I o MHC-II (en corteza). En la selección negativa los linfocitos DP son expuestos a la presentación de MHC. Aquellos linfocitos que reconozcan los autoantígenos serán eliminados por apoptosis (en médula). La células Treg se caracterizan por su capacidad de reconocer Ag propios; evaden la selección positiva y sobreviven con el fin de controlar clones autorreactivas en periferia.

Selección positiva

En el timo también se lleva a cabo la selección positiva, donde sólo hay expansión clonal de linfocitos T capaces de reconocer el Ag propio MHC-I y II (Pearse, 2006). Los timocitos DP, llevan a cabo una interacción con el MHC-I y II de las células epiteliales de la corteza tímica, con la finalidad de seleccionar aquellas células que reconozcan el MHC propio con una intensidad correcta. Si esa intensidad es baja o alta, estos timocitos son eliminados por apoptosis (Chávez, Rojas, Fortoul y Tenorio, 2017).

Selección negativa

En la selección negativa, los timocitos en desarrollo, migran hacia el centro del timo con ayuda del receptor para quimiocina CCR7; los linfocitos DP son expuestos a la presentación de MHC-I y II, donde aquellos linfocitos que los reconozcan como extraños, serán eliminados por apoptosis (células autorreactivas) (Chávez, Rojas,

Fortoul y Tenorio, 2017), lo que provoca la eliminación clonal de células potencialmente dañinas.

2.3.3 Apoptosis

La apoptosis (muerte celular programada) es un proceso fisiológico, genéticamente controlado, dependiente de energía, encargado de mantener en equilibrio (homeostasis) las células y tejidos eliminando células transformadas, infectadas y dañadas. Está implicado en la embriogénesis, eritropoyesis, homeostasis del sistema inmunológico, etc., mediante estímulos extrínsecos o intrínsecos.

La apoptosis actúa de forma contraria a la mitosis, teniendo una relación importante con el ciclo celular. Dentro del ciclo celular se llevan a cabo distintas fases: mitosis (M), fase de crecimiento (G1), síntesis de DNA (S) y fase de crecimiento 2 (G2). Cuando hay daño en el DNA, principalmente en el tercio final de la fase G1, se desencadena la apoptosis con el fin de impedir que células dañadas sigan el proceso de síntesis, evitando así mutaciones (Pérez, Lie, 2012).

El cuerpo humano adulto elimina una gran cantidad de células al día (10^{11}) mediante apoptosis (Malet, 2005). Para que una célula entre en apoptosis, es necesario que deje de recibir señales de supervivencia (factores de crecimiento: TGF- α , TGF- β , IL) y hormonas: eritropoyetina, hormona de crecimiento (GH) y que comience a recibir señales de muerte (Fas, TNF, TRAIL). Este proceso puede surgir por la activación de un programa intrínseco (estrés RE, hipoxia, daño en DNA).

Ambos procesos siguen una serie de acontecimientos ordenados que se diferencian en tres fases: Fase efectora, fase degradativa y fase de eliminación.

La fase efectora comprende el compromiso de la célula hacia la muerte, donde hay un aumento de Ca^{2+} intracelular, activando tanto endonucleasas como caspasas (C), y provocando un cambio morfológico en el citoesqueleto. Dentro de la fase degradativa comienza la degradación de ácidos nucleicos por endonucleasas y proteínas activadas por C, así como la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por $M\phi$. Por último, en la fase de eliminación, los $M\phi$ son atraídos por fosfatidilserina (PS), presente en la superficie de las células apoptóticas, con lo cual fagocitan por completo los cuerpos apoptóticos (Cascales, 2002) (Figura 7).

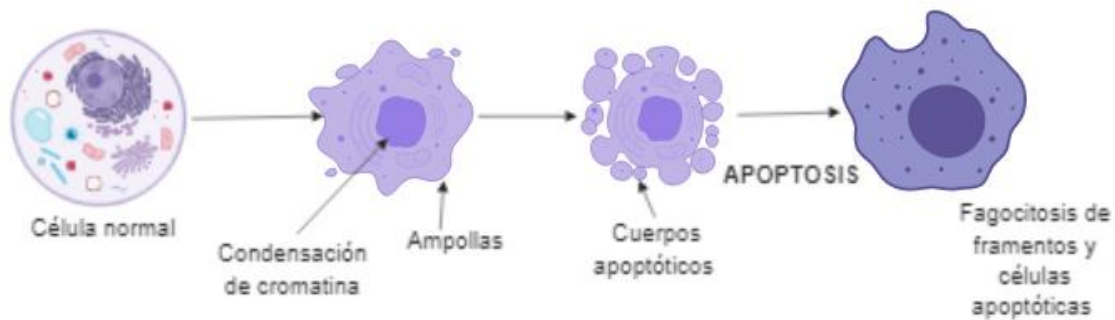


Figura 7. Apoptosis.

Al mandar señales de muerte, la apoptosis comienza con la condensación de la cromatina así como de la formación de ampollas en su membrana, más tarde los cuerpos apoptóticos comienzan a aparecer, para así reclutar a células capaces de fagocitar tanto a los fragmentos apoptóticos como a la célula.

Características morfológicas

La apoptosis es un proceso activo en el cual se ve implicada la síntesis de proteínas. Dicho proceso lleva consigo una serie de características que lo diferencian de otros tipos de muerte celular (necrosis, paraptosis, catástrofe mitótica, autofagia, necroptosis), como son: rotura del citoesqueleto, desorganización de la envoltura nuclear, condensación y fragmentación de la cromatina (picnosis), formación de cuerpos apoptóticos, expresión extracelular de PS, no se presenta un proceso inflamatorio y el contenido celular no es liberado (Arango, Llanes, Díaz y Faxas, 1997).

Cambios bioquímicos en la apoptosis

Los cambios bioquímicos principales son la activación de C, la degradación de proteínas y DNA, y cambios en la membrana que permiten el reconocimiento por parte de Mφ.

Al inicio de la apoptosis ocurre la expresión de PS en la monocapa externa de la membrana celular, permitiendo el reconocimiento temprano de células muertas por Mφ, haciendo que no sean liberados los componentes celulares pro-inflamatorios. A continuación ocurre la degradación del DNA en fragmentos de 50 a 300 Kb, así como una disociación internucleosomal del DNA en oligonucleosomas formados por múltiplos de 180 a 200 pares de bases (pb) por parte de las endonucleasas (Hernández, 2012), que son activadas por acción de las C (Sosa, Brandan, y Jeréz, 2012).

Otra de las características específicas de la apoptosis es la activación de C (iniciadoras y ejecutoras). Estas proteínas rompen la estructura del citoesqueleto después de los residuos aspárticos (Sosa, Brandan, y Jeréz, 2012).

2.3.4 Mecanismo de apoptosis

Existen tres vías por las cuales se activan las C: la vía intrínseca mitocondrial, la vía extrínseca (receptor de muerte), y la vía intrínseca del retículo endoplásmico (RE). Las dos primeras vías están involucradas con la fase efectora.

Vía intrínseca

Como su nombre lo indica, esta vía comienza en el interior de la célula debido a estrés, hipoxia, daño genético, etc., mediante un balance de señales pro y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. La mitocondria es un organelo que alberga una gran cantidad de proteínas pro-apoptóticas, donde la principal es el Cit-c, requerido para la activación de la C9 (García y Vecino, 2003).

Tabla 5. Proteínas anti y pro-apoptóticas

Anti-apoptosis		Pro-apoptosis	
Bcl-2	Bcl-XL	BH 123	BH3
		Bax Bak	Bad Bid Puma

El Cit-c se localiza en el espacio intermembranal mitocondrial (D'Herde, De Prest, Mussche, Schotte, *et al.*, 2000); al existir un estímulo, una proteína de la familia BH3 se une a Bcl-2 inhibiéndolo. De esa manera, miembros de la familia Bcl-2, Bax y Bak son activadas y ocasionan la generación de un poro en la membrana mitocondrial, causando una pérdida de potencial de membrana y la desestabilización de la membrana mitocondrial, liberándose el Cit-c (García y Vecino, 2003) (Figura 8). En el citosol, el Cit-c se une a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1) y ATP, formando un apoptosoma (heptámero). Una vez formado el apoptosoma, se recluta y activa la pro-C9 (autoproteolisis), la cual actúa como holoenzima que procesa a otras C ejecutoras (Malet, 2005), como la C3, que desencadena la última parte de la apoptosis.

Vía extrínseca

Como su nombre lo indica, esta vía se activa por la unión de proteínas extracelulares de señalización (ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte); siendo los más conocidos el receptor de TNF (TNFR), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y FasL, respectivamente (Sosa, Brandan, y Jeréz, 2012).

Las proteínas transmembranales, Fas y TNF, están conformadas por tres dominios, 1) dominio de unión a ligando, 2) dominio transmembrana y 3) dominio de muerte intracelular. Al interactuar el receptor con su ligando, ocurre una oligomerización por una de las cinasas asociada a ese receptor, que a su vez fosforila a los adaptadores FADD (dominio de muerte asociado a Fas), TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR) o TRAFs (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), que al trimerizarse, reclutan a pro-C8, pro-C10 o pro-C2 y forman el complejo de señalización de muerte (DISC). Este complejo recluta C iniciadoras a la membrana celular. La pro-C8 es activada por un corte proteolítico y forma un tetrámero para reclutar a la pro-C3 (Sosa, Brandan, y Jeréz, 2012).

El reclutamiento de caspasas ejecutoras desencadena una cascada de caspasas que dará lugar a la muerte celular. Así mismo, estas C, pueden activar a proteínas de la familia Bcl-2, como Bid, que de igual manera, tiene función pro-apoptótica, permitiendo un cambio en la mitocondria para que esta libere al Cit-c al citosol. Generando de esta manera la activación de la C9 (García y Vecino, 2003) (Figura 8).

Vía común

La fase efectora de la apoptosis involucra la activación de una serie de C. La C que se encuentra río arriba de la vía intrínseca es la C9, en tanto que la de la vía extrínseca es la C8, C10 o C2. Estas dos vías convergen en la activación de la C3, que rompe al inhibidor de la desoxiribonucleasa, la cual es responsable de la degradación del DNA.

La integración de las dos vías llevan a la vía común; ésta se da a nivel de Bid. La C8 es la responsable de mediar la hidrólisis de Bid, promoviendo la liberación del Cit-c, la formación del apoptosoma y la activación de C3.

Así, dependiendo del estímulo y del tipo celular, la activación de la muerte celular por apoptosis se puede llevar a cabo ya sea por la vía intrínseca, la vía extrínseca o a través de ambas vías moleculares (Meresman, 2011) (Figura 8).

Vía intrínseca del retículo endoplásmico (RE)

Esta es una tercera vía, la cual es muy poco conocida. Se cree que es dependiente de la C12 y es independiente de la mitocondria. Cuando el RE sufre de alguna lesión por estrés (hipoxia, radicales libres o falta prolongada de glucosa), hay una síntesis reducida y un desplegamiento de proteínas en la célula. Como

consecuencia, la proteína adaptadora TRAF2 se disocia de la pro-C12, resultando en la activación de la misma (Sosa, Brandan, y Jeréz, 2012) (Figura 8).

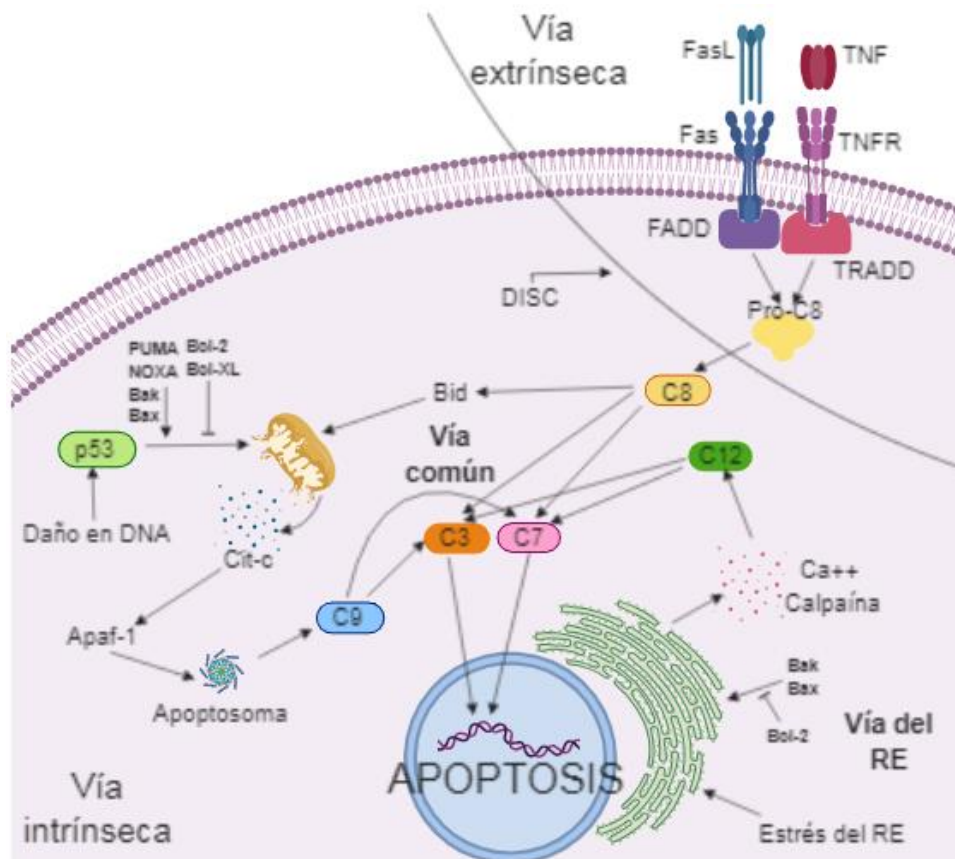


Figura 8. Vías de señalización de la apoptosis.

En la vía extrínseca, el daño en el DNA activa a p53, que promueve junto a proteínas pro-apoptóticas la ruptura de la mitocondria y la liberación del Cit-c. Al unirse con Apaf-1, se formará el apoptosoma que activa a la C9 y ésta a la C3 y C7, ejecutando así la escisión del DNA y dando lugar a la apoptosis. La vía extrínseca lleva consigo la unión de ligandos de muerte a sus receptores, que activarán sus dominios de muerte y reclutarán a la pro-C8 (todo este conjunto es conocido como DISC). La C8 activa tiene la función de activar a la C9 y a la C7, que nuevamente darán paso a la apoptosis o bien, la C8 puede activar a Bid, que promueve la ruptura de la mitocondria. Ahora bien, la vía del RE es activada por estrés en el RE. Éste libera calpaína y Ca²⁺, activando a la C12 y esta a su vez, activa a C3 y C7, dando lugar a la apoptosis. Por último, la vía común se distingue por la convergencia de las otras tres vías en la activación de las C3 y C7, que terminan en apoptosis.

2.3.5 Caspasas (C)

Las C, son la maquinaria ejecutora de la apoptosis. Esta familia de proteasas se caracteriza por su especificidad hacia sustratos que contienen ácido aspártico. Se conocen alrededor de 14 C que se subdividen en tres familias más: dos que participa en la apoptosis y otra en procesos inflamatorios en respuesta a citocinas (Malet, 2005).

Se encuentran como zimógenos en células nucleadas. Dentro del proceso apoptótico, estos zimógenos son activados dependiendo de su función. Las C iniciadoras son activadas por autoproteólisis, mientras que las ejecutoras por proteólisis específica mediada por C iniciadoras, las cuales llevan a cabo la hidrólisis de sitios específicos de diversos sustratos clave.

Durante la apoptosis se presentan cambios en las células, mediados en gran parte, por C; cortan en sitios específicos a proteínas implicadas en la estructura del citoesqueleto, como Gas2, fodrina, β -tubulina y algunos tipos de actina (Elinos, Maldonado y Meléndez, 2003).

Procaspasas (Pro-C)

Las pro-C, tienen un peso entre los 30 y 50 KDa. Estos contienen 3 dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10) (Figura 9).

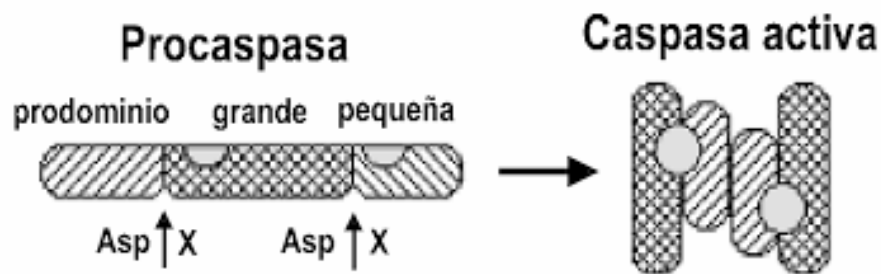


Figura 9. Activación de pro-C.

Las C activas forman un tetrámero que se compone de dos heterodímeros. Cada heterodímero contiene un sitio activo para la unión al sustrato y la catálisis.

Tipos y Regulación de C

El grupo de las C se organiza en tres subgrupos: C implicadas en la producción de citocinas (C1, C4, C5 y C13); C de señalización o efectoras (C2, C8, C9 y C10); y las C ejecutoras de muerte o iniciadoras (C3, C6 y C7). La activación inicial de las C es un proceso irreversible, complejo, y regulado para que sólo se lleve a cabo en el momento correcto. Los mecanismos de regulación para cada tipo de C se enlistan a continuación:

- Las C efectoras: se activan debido a una señal pro-apoptótica que culmina en una C iniciadora, haciendo que la C iniciadora active a las efectoras, provocando el desensamblaje celular.

- Las C iniciadoras: se activan por su unión a cofactores específicos (pro-C8 requiere la unión con su cofactor FADD para su activación).
- Los inhibidores de proteínas apoptóticas (IAPs) como reguladores: las IAPs bloquean la apoptosis a través de la inhibición de C efectoras (Sosa, Brandan y Jeréz, 2012).

2.3.6 Caspasa 3

La C3, activa una DNAsa citoplasmática, escindiendo un inhibidor de la enzima; esta DNAsa induce la escisión internucleosomal del DNA. Estos cambios llevan a alteraciones estructurales nucleares y citoplasmáticas que ocurren en las células apoptóticas. La C3 activa se utiliza como marcador apoptótico.

Es importante recalcar que se ha demostrado la activación de C3 durante la selección negativa en el desarrollo y maduración de linfocitos en el timo (Dzhagalov, Chen, Herzmark y Robey, 2013).

2.3.7 Efecto de MO en sistema inmune de roedor

Odaka, Nakano, Tanaka, Kaburagi, *et al.* (2012), reportaron que la MO afecta epigenéticamente a la descendencia predisponiéndola principalmente a un estado de obesidad debido a un aumento de tejido adiposo. Esto lleva a una disminución en los niveles de IL-2 y por ende a un deterioro en las células T del sistema inmune. Así mismo, una HFD conlleva a un fenotipo inmunológico alterado, y se ha observado que una microbiota intestinal materna (heredable) alterada da como resultado la desregulación de células Treg en ratones adultos (Myles, Fontecilla, Janelins, Vithayathil, *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismos son aún poco conocidos.

2.4 Regulación epigenética y su efecto sobre la MO en la progenie de la rata.

La epigenética es la disciplina que se encarga del estudio e investigación de los cambios en la estructura y organización del DNA heredables, donde no hay cambios en su secuencia y además modulan la expresión génica (obtención de proteínas a partir genes), provenientes de sus ascendentes por efecto del entorno (Ondarza, 2012). Los cambios implicados en dicha regulación son la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de histonas (H), uso de variantes de H, remodelación de la cromatina e incorporación de RNA no codificante en la cromatina (Dambacher, Hahn y Schotta, 2010). Estos factores se conocen como impronta genómica. Algunas variaciones en esta impronta están relacionadas con diversas enfermedades cromosómicas, cáncer, retraso mental e inflamación (Dyce, 1999; Heerwagen, Miller, Barbour y Friedman, 2010).

En un estudio se observó que una ingesta alta en fructosa (componente principal de una dieta obesogénica por CHOs) durante el embarazo, causa que su progenie neonata muestre una señal defectuosa de leptina y una acumulación de TAG en hígado. La misma progenie en edad adulta desarrolla esteatosis hepática, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina debido a una baja expresión del factor de transcripción LXR (Liver X-receptor), provocada por una metilación aumentada en el DNA (principalmente en el promotor). Ésta proteína se encuentra involucrada en el metabolismo de colesterol y ácidos grasos (Rodrigo, Fauste, De la Cuesta, Rodríguez, *et al.*, 2018).

Estudios moleculares han llegado a indicar que la programación fetal puede ser explicada con la epigenética (cambios en la expresión génica hereditaria a través de las modificaciones en el DNA e H centrales, sin cambios en la secuencia del DNA) (Barrera y Fernández, 2015).

2.4.1 Modificación de histonas

El DNA, debido a su gran tamaño, necesita de una compactación. La doble hélice se asocia con un complejo de proteínas octaméricas llamadas histonas (20-80 KDa) formado el nucleosoma, que constituye a la cromatina, la cual cuenta con diferentes grados de compactación (collar de perlas, fibra de 30nm, fibra de 300nm), que llega hasta la formación del cromosoma.

Los cambios post-traduccionales de las histonas determinan qué tan compacta es la cromatina, y por lo tanto, qué tan fácil se da el acceso a los factores de transcripción (Lawrence, Daujat y Schneider, 2016). Estas modificaciones incluyen la metilación en los residuos de lisina (K) y arginina (R), la acetilación en residuos de K, ubiquitinación y sumoilación (adición de proteína SUMO) de K, fosforilación de serinas (Ser) y treoninas (T) y microRNAs (modificación epigenética potencial), todas mediante unión covalente en la cola N-terminal. Cabe mencionar que tanto la acetilación como la metilación de los residuos de K, son marcas moduladoras clave para la activación (descondensación de cromatina, eucromatina) o represión transcripcional (condensación de cromatina, heterocromatina) (García, Ayala y Perdomo, 2012; Heerwagen, Miller, Barbour y Friedman, 2010).

La metilación de residuos de K están regulados por enzimas histona metiltransferasa (HMT) (PRM11, Dominio SET, Dominio no SET) (Martin y Zhang, 2005), e histona demetilasa (HDM). Estos grupos metilo (-CH₃) que se unen a las colas de las H, provienen de folato, metionina y homocisteína, que cumplen la función de cofactores donantes de grupos -CH₃ (Pomilio, Vitale, Ciprian y Vitale, 2016; Qian y Zhou, 2006) (Figura 10).

Por ejemplo, en linfocitos Th, la trimetilación de H3K4 y H3K79, así como, la monometilación de H3K27, H3K9 y H4K20 se ven implicadas en la activación transcripcional, por otro lado, la di y trimetilación de H3K27 se asocian con la represión transcripcional para diferenciación de sus linajes (Wei, Wei, Zhu, Zang, *et al.*, 2009). Otros cambios epigenéticos, en dichas células asociados a apoptosis son la fosforilación de la Ser14 de la H2B, así como, la fosforilación de la Ser28, T45, la metilación de K27 en H3 y K20 de H4 (Van Bavel, Dieker, Kroeze, Tamboer, *et al.*, 2014).

Estudios epidemiológicos han propuesto que las enfermedades del adulto están relacionadas con las condiciones medioambientales durante el desarrollo temprano (intrauterino). Como ya se ha mencionado, la malnutrición materna durante el embarazo se ha relacionado una gran cantidad de enfermedades, como restricción de crecimiento intrauterino (RCIU), el cual se ha vinculado con enfermedades del adulto, refiriendo así a la hipótesis de Barker (Molina, Correa, Rojas y Acuña, 2014).

Se ha sugerido que el patrón de modificaciones que siguen las H es un código, conocido como “el código de las H”, lo que promueve el empaquetamiento y la regulación de la expresión del genoma (Rodríguez, Téllez, Cerbón, López, *et al.*, 2004).

En el nivel molecular, estos cambios “programados” quizá reflejen la alteración de la expresión de los genes *in útero* que actúa directamente en la célula o por medio de señales hormonales de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes (Barrera y Fernández, 2015). La transmisión de los efectos de programación fetal es parte de la herencia epigenética, que puede ser de la línea materna, paterna o ambas. (Vickers, 2014).

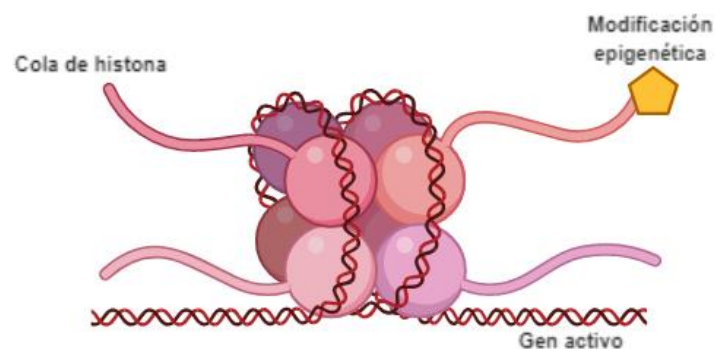


Figura 10. Modificaciones epigenéticas de H.

El mecanismo epigenético se ve afectado por diversos factores y procesos (desarrollo intrauterino, sustancias químicas del medio ambiente, medicamentos, productos farmacéuticos, envejecimiento, dieta). Las modificaciones de histonas se dan en las colas y alteran la medida en que el DNA se envuelve alrededor de las histonas y la disponibilidad de genes en el DNA para activarse.

2.4.2 Histona 3 (H3)

El DNA dentro de las células eucariotas se encuentra en forma de cromatina. Su estructura básica es el nucleosoma, el cual está conformado por un octámero de cuatro proteínas, llamadas H: H2A, H2B, H3 y H4, es ahí, donde el DNA es enrollado (147 pb por octámero de H). Cada una de estas unidades tiene un dominio globular y un dominio cola (Martin y Zhang, 2005). Cabe señalar que la H3 es quién sufre más modificaciones post-traduccionales en comparación a las demás.

La H3 tiene dos variantes principales en humano, H3.1 y H3.3, sin embargo se conocen siete variantes en las células de mamíferos (H3.1, H3.2, H3.3, H3.4, H3.5, H3.X e H3.Y). Ahora bien, en *Rattus norvegicus* (rata Wistar), se conocen las H3.3, H4.4, H3.5 (NCBI; Draizen, *et al.*, 2016). Estas variables muestran diferentes patrones de localización genómica en animales. Recientemente se ha definido que la H3.1 se asocia a un estado de heterocromatina, mientras que la H3.3 se asocia a un estado de eucromatina.

La H3 lleva a cabo diversas funciones; dentro de las más importantes se encuentra la regulación transcripcional. Sin embargo, su metilación favorece otras funciones, como el reclutamiento de RNA polimerasa (RNAPol II) en la región promotora para la transcripción (Dambacher, Hahn y Schotta, 2010), formación de heterocromatina e inactivación de cromosoma X (Qian y Zhuo, 2006), la participación en la coagulación sanguínea, el desarrollo cerebral, la proliferación y regulación positiva de crecimiento celular, el metabolismo proteico celular, la respuesta a hormonas, etc. (Uniprot, 2018).

2.4.3 Trimetilación de lisina 4 de la Histona 3

En la H3, la trimetilación de K4 y la acetilación de las K9 y 14 le dan a la cromatina una conformación abierta (eucromatina), que permite que se lleve a cabo la transcripción de los genes que se encuentran en ella (Ucar y Rattay, 2015).

Se sabe que en la H3 se pueden llevar a cabo tres tipos de metilación de K: mono, di y tri. Para ello se necesita de las enzimas HMT; siendo más específicos, metil lisina transferasas (MLT), donde la principal familia de proteínas capaz de llevar a cabo tanto la di como trimetilación de la K4 cuenta con el Dominio SET (Santos, Schneider, Bannister, Sherriff, *et al.*, 2002). Así mismo estas proteínas pueden catalizar la metilación de K de proteínas celulares, como Cit-c, p53, Rubisco y Taf10 (Qian, Zhou, 2006).

Los estudios respecto a estas modificaciones de H relacionadas con la obesidad materna y sus efectos en la descendencia, son relativamente escasos, a pesar de

que desempeñan un papel importante en la transcripción, reparación del DNA, inducción de la apoptosis y condensación cromosómica.

Hasta ahora no se ha determinado el efecto de factores nutricionales como obesidad sobre el control epigenético de los genes improntados (Dyce, 1999). Sin embargo, en animales de experimentación se han llegado a determinar alteraciones en los patrones de metilación de distintos genes de hepatocitos y cardiomiocitos de fetos, cuyas madres han estado bajo dietas restringidas de nutrientes (Casanello, Krause, Castro y Uauy, 2015).

En ratones se ha podido demostrar que existe una correlación entre las modificaciones de H, principalmente la metilación de éstas y la regulación génica (Qian, Zhou, 2006). Ahora bien, uno de los miembros de la familia de Dominio SET es la proteína MLL (Leucemia linfocítica mixta), que funciona como un regulador del desarrollo, y se ha observado que su desregulación implica un desequilibrio en el gen *Hox*, produciendo defectos en el sistema hematopoyético (Qian, Zhou, 2006).

3. Justificación

Alrededor del 70% de la población mexicana adulta padece sobrepeso u obesidad, considerando que de ese porcentaje, el 71.9% son mujeres en edad reproductiva (ENSANUT, 2016).

La obesidad materna, tanto en el crecimiento como en el desarrollo intrauterino del feto, así como en los primeros años de vida, genera cambios en la descendencia que se asocian a diversas complicaciones metabólicas, cardiovasculares e inmunológicas en la edad adulta (Casanello, Krause, Castro y Uauy, 2015).

El desarrollo del sistema inmune adaptativo de la progeñe se ve alterado por factores de malnutrición materna. Sin embargo, se ha estudiado poco el efecto de la MO en la reprogramación de la respuesta inmune adaptativa de linfocitos T y sus consecuencias en la edad adulta.

Por lo anterior, este trabajo pretende detectar cambios en los niveles de muerte celular programada y de programación epigenética a nivel de modificaciones de histonas en timocitos, y hacer una comparación de estos cambios entre la progeñe adulta de rata Wistar con dieta control y la progeñe adulta de rata Wistar con MO.

4. Hipótesis

La obesidad materna influye en el desarrollo del sistema inmune de la progenie, por lo que habría una diferencia en los niveles de apoptosis (C3 activa) y regulación epigenética (H3K4me3) en los timocitos de las crías en la etapa adulta.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar y comparar los niveles de apoptosis y regulación epigenética a nivel de modificaciones de histonas en el timo de las crías adultas de ratas con obesidad materna vs crías adultas de ratas control mediante técnicas moleculares.

Objetivos particulares

- Estandarizar la obtención de proteínas nucleares para el estudio de la metilación de histonas, mediante la lisis de tejido con distintos buffers de extracción (CHAPS, RIPA, Laemmli 2x) y técnicas moleculares.
- Determinar la expresión de caspasa 3 activa y comparar los niveles de apoptosis de timocitos de las crías adultas de ratas con obesidad materna vs crías adultas de ratas control.
- Determinar los cambios en la regulación epigenética (metilación de histonas) en timocitos midiendo la H3 trimetilada (H3K4me3), para comparar los niveles de metilación de H3 de las crías adultas de ratas con obesidad materna vs crías adultas de ratas control.

6. Material y métodos

Diseño experimental

Se tuvieron dos grupos de estudio (Rata Wistar): Grupo control (Ctrl), madre con dieta control (Rodent RQ 22-5: 22% proteína, 5% grasa, 31% polisacáridos, 31% azúcares simples, 4% fibra, 6% minerales, 1% vitaminas, 4.0 Kcal/g), y grupo MO: madre con dieta obesogénica. El modelo de MO (preconcepción, perinatal e infantil hasta el destete) en la rata se basó en una dieta obesogénica HFD (23.5% proteína, 20% manteca de cerdo, 5% grasa, 20.2% polisacáridos, 20.2% azúcares simples, 5% fibra, 5% minerales, 1% vitaminas, 4.9 Kcal/g) (Zambrano, Martínez, Rodríguez, y Nathanielsz, 2010; Taylor, Matthews, Khan, Rees, *et al.*, 2018). Se estudió a la

progenie macho de los dos grupos en edad adulta (PND130), 5 animales del grupo Ctrl (n=5) y 6 animales del grupo MO (n=6) de distintas camadas.

Los tejidos (timo) fueron un donativo en colaboración con la Dra. Zambrano y el Dr. Reyes, del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán; dichos tejidos, se mantuvieron congelados a -80°C.

Obtención de tejido para extraer proteínas totales mediante lisis celular

Se descongelaron las muestras de timo de las crías adultas del grupo Ctrl y del grupo MO en hielo. Cada órgano fue pesado y disgregado mecánicamente dentro de PBS 1X frío para recuperar el sobrenadante (evitando la recolección de tejido) en tubos Falcon de 15 mL etiquetados como Ctrl1, Ctrl2, Ctrl3, Ctrl5 y Ctrl6 (grupo Ctrl), y MO1, MO2, MO3, MO4, MO5 y MO6 (grupo MO). Se centrifugaron las muestras a 1200 rpm / 6 minutos / 4° C, para sólo recuperar células (pellet) y desechar tejido (sobrenadante). Se agregaron 2 mL de Buffer de lisis de eritrocitos frío (Solución C) a los pellets obtenidos. Nuevamente se llevó a cabo otra centrifugación a 1200 rpm / 6 minutos / 4° C y el sobrenadante fue desechado, repitiendo el procedimiento hasta que los pellets de células consiguieron una coloración blanca-amarillenta. Se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X frío, centrifugando a 1200 rpm / 6 minutos / 4° C. Se desechó por completo el PBS de lavado y se agregaron 200 µL de la Buffer de lisis celular (Solución de lisis A), se mezclaron con vórtex y se incubaron por 1 hora / 4°C. Pasado el tiempo, se traspasó el contenido de cada tubo, a tubos Eppendorf bien etiquetados y se centrifugaron a 14,000 rpm / 20 minutos / 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes en otros tubos Eppendorf identificados como lisados totales (LT) de controles (Ctrl) y obesidad materna (MO). El botón celular se guardó a -20°C para obtener las proteínas nucleares. Se introdujeron los tubos Eppendorf con muestra de LT en hielo seco para congelar rápidamente las muestras y mantenerlas a -20° C.

Cuantificación de proteínas LT por el método de Bradford

En una placa de 96 pozos para ELISA, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas LT, por el método de Bradford a 595 nm, con una curva de calibración de albúmina, por duplicado, de los 0.1mg / mL a los 1.5 mg / mL. Se agregaron las muestras a cuantificar por duplicado, agregando 5µL de muestra y 250 µL de reactivo de Bradford. Se llevó a cabo la lectura en el espectrofotómetro Xmark (Biorad) a una λ de 595 nm. Se graficaron los datos correspondientes a la curva de calibración y se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación para la cuantificación.

Preparación de muestras LT

Se agregó la cantidad de Laemmli 5X y DTT 1 M (final DTT 0.1M) necesaria a cada una de las muestras. Se calentaron por 5 minutos a baño María y se congelaron, manteniéndolas de 4° a -20° C.

Estandarización para la obtención de proteínas nucleares

Buffer de CHAPS

Se aisló el timo de la rata, después de su eutanasia con CO₂ (realizada por el MVZ Responsable del Bioterio), y se colocó en un tubo Eppendorf con PBS 1X frío, etiquetado como Tchaps. Se disgregó el órgano mecánicamente dentro del PBS 1X frío y se recuperó todo el sobrenadante evitando la recolección de tejido. Se agregaron 200 µL de la Solución C fría. Se centrifugó el homogenizado por 5 minutos / 2000rpm / 4 °C y se eliminó totalmente el sobrenadante. Este paso se realizó 2 veces más hasta que el pellet celular consiguió una coloración blanquecina. Se lavó el pellet con 200 µL de PBS 1X frío y se centrifugó nuevamente por 5 minutos / 2000rpm / 4 °C, desechando el sobrenadante por completo. Se agregó Buffer de CHAPS (Solución de lisis A.1) fría de 2 a 3 veces el volumen del pellet. La muestra junto con la solución A.1 se incubó 1 hora / 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación por 20 minutos / 14000 rpm / 4 °C. Y se procedió a recuperar el sobrenadante, para ser congelado a -20°C. Se descongeló la muestra y se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por espectrofotometría a 595nm con el método de Bradford,; se preparó la muestra con Laemmli 5X y DTT y se analizó mediante electroforesis de proteínas y Western blot.

Buffer de RIPA

Se aisló el timo de la rata, después de su eutanasia con CO₂ (realizada por el MVZ Responsable del Bioterio), y se colocó en una caja petri con Medio de cultivo (RPMI 1640, GIBCO) etiquetada como LTTN. Se disgregó el órgano mecánicamente dentro del medio de cultivo frío y se recuperó todo el sobrenadante en tubo Falcon, evitando la recolección de tejido. Se llevó a cabo una centrifugación por 6 minutos / 1200rpm / 4 °C, para recuperar el pellet celular. Se agregaron 500 µL de Solución C fría. Se centrifugó por 6 minutos / 1200rpm / 4 °C y se eliminó totalmente el sobrenadante. Este paso se realizó 1 vez más hasta que el pellet celular consiguió una coloración blanquecina. Se lavó el pellet con 200 µL de Medio de cultivo y se centrifugó nuevamente por 6 minutos / 1200rpm / 4 °C, desechando el sobrenadante por completo. Se agregó Buffer de RIPA (Solución de lisis A.2) fría, de 2 a 3 veces el volumen del pellet. La muestra junto con la solución A.2 se incubó 1 hora / 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación por 15 minutos / 14000 rpm / 4 °C y se procedió a recuperar el sobrenadante, para ser congelado. Se descongeló la

muestra y se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por espectrofotometría a 595nm con el método de Bradford,; se preparó la muestra con Laemmli 5X y DTT y se analizó mediante electroforesis de proteínas y Western blot.

Buffer Laemmli 2X

“Para esta estandarización, se utilizaron 3 mL sangre periférica, recolectada en un tubo con EDTA como anticoagulante.”

Se agregó a un tubo Falcon 3 mL de Ficoll (Histopaque-1077, Sigma) y se agregó la sangre obtenida muy lentamente, evitando que se mezclen. Se centrifugó el tubo por 30 minutos / 400 G / TA (se quitó el freno de la centrífuga, para mantener el gradiente esperado). Al terminar la centrifugación, se eliminó la fracción que contiene plaquetas y plasma, recuperando la fase siguiente en otro tubo (fase con células mononucleares). Se realizaron 2 lavados a las células mononucleares recuperadas con PBS 1X frío, centrifugando a 1200 rpm / 5 minutos / TA, recuperando el pellet. Se resuspendió el pellet y se agregaron 40 µL de Laemmli 2X (Solución de lisis nuclear A.3); se traspasó en tubo Eppendorf y se agregaron 4 µL de DTT. Se calentaron las muestras a baño María por 5 minutos y se analizaron mediante electroforesis de proteínas y Western blot.

Obtención de proteínas nucleares.

A los pellets obtenidos de los LT se les agregó 50µL de Laemmli 2X sin indicador de pH. Se congelaron con hielo seco y se mantuvieron a -20° C por 18 horas. Se descongelaron los pellets en frío, y se centrifugaron a 14000 rpm / 10 minutos / 4° C. Se separó el sobrenadante en tubos Eppendorf identificados como proteínas nucleares (N) de Ctrl o MO y se guardaron los pellets obtenidos a -20°C. A los sobrenadantes se le agregaron 50µL de Laemmli 2X con indicador de pH y 5µL de DTT 1 M por tubo. Se calentaron a baño María por 5 minutos y se mantuvieron en congelación.

Separación de proteínas mediante gel de electroforesis desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se ensamblaron los vidrios para geles de poliacrilamida. Se prepararon 20 mL de la solución para el gel separador de electroforesis desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % como se indica en la Tabla 15, adicionando en orden los componentes. Se agregaron 7.5 mL a cada placa de la solución para gel separador al 15% con ayuda de una micropipeta, dejando caer la solución por una de las esquinas de la placa de vidrio. Se adicionaron 200 µL de H₂O miliQ a cada gel, por una esquina del vidrio, para romper la tensión superficial y permitir la polimerización

de forma horizontal. Dejando polimerizar por un mínimo de 40 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de polimerización, se decantó el agua en la tarja y se secó el sobrante con papel filtro. Se prepararon 10 mL de la solución para el gel concentrador de electroforesis desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 5% como se indica en la Tabla 16, adicionando en orden los componentes. Se agregaron 3.5 mL a cada gel de la solución para gel concentrador con ayuda de una pipeta por una esquina de la placa de vidrio evitando la formación de burbujas. Se colocaron los peines de 1.5 mm entre las placas de vidrio. Se dejaron polimerizar por un mínimo de 20 minutos. Se retiraron los peines; así mismo, se retiraron del soporte de polimerización el marco de la placa y se desmontaron las placas de vidrio, de tal forma que no se despegaran los vidrios de los geles. Se ensambló la cámara de electroforesis, adicionando buffer de electroforesis 1X en el espacio entre las dos placas del marco de sujeción hasta casi derramar. Se agregó en cada carril del Gel A para LT, entre 15 μ L y 40 μ L de muestra, y 2 μ L de marcador de peso molecular (PM Dual color, Biorad), para asegurar que en cada carril se cargaran 10 μ g de proteína (Tabla 19). Se agregó en cada carril del Gel B para N, entre 10 μ L y 32 μ L de muestra, y 2 μ L de marcador de peso molecular (PM Dual color, Biorad), para asegurar que en cada carril se cargaran 20 μ g de proteína (Tabla 20). Se adicionó buffer de electroforesis 1X en la parte externa del marco de sujeción hasta quedar completamente cubierto el electrodo. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis, ajustando a 100V por 20 minutos de corrimiento para concentración de muestras. Transcurridos los 20 minutos, se paró el corrimiento y se ajustó nuevamente a 170V para el corrimiento de separación; una vez que el frente de migración llegó a la parte inferior del marco de sujeción se detuvo el corrimiento, quedando finalizada la electroforesis.

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Al sacar las placas con los geles, se quitaron los vidrios CH y se sumergieron los geles con el vidrio G en un poco de buffer de transferencia 1X frío; se separó gel A con ayuda de una cuchilla plástica la parte correspondiente al gel concentrador y se hizo lo mismo con el gel B. En otro recipiente largo, se agregó buffer de transferencia 1X frío, y se colocaron ahí mismo, los cassettes para transferencia, 4 esponjas de transferencia, 4 hojas de papel filtro de 6x8 cm, y 2 membranas de nitrocelulosa de 6x8 cm. Para realizar los sándwiches, se colocó sobre el polo negativo (parte negra del casete), los componentes anteriormente sumergidos en buffer en el siguiente orden: una esponja de transferencia, un papel filtro, gel A, una membrana de nitrocelulosa, un papel filtro y una esponja de transferencia. Se repitió lo mismo para el gel B. Una vez hecho el sándwich, se ensambló la cámara de transferencia. Se llenó la cámara de transferencia con buffer de transferencia 1X frío dejando 2 cm de la parte superior y se colocó un refrigerante. Se cerró la cámara y se ajustó a 100V por un mínimo de 1 hora, a 4°C. Transcurrido el tiempo se apagó la fuente de poder y se procedió a desmontar la cama de transferencia. Se realizó un

lavado a cada membrana de nitrocelulosa con TBS-T por 1 minuto dentro de un recipiente.

Tinción de membrana con Rojo Ponceau

En otro recipiente, se agregaron aproximadamente 20 mL de Rojo Ponceau (RP) (Sigma-Aldrich) y se sumergieron una por una las membranas de nitrocelulosa por 5 minutos para verificar que la transferencia de proteínas fuera exitosa. Se marcaron las bandas del marcador de peso molecular (PM). Posteriormente se enjuagaron las membranas con H₂O miliQ dos veces y después con TBS-T, hasta que se eliminó por completo el colorante.

Bloqueo de membrana

Se bloquearon las membranas con Leche descremada 5%, preparada en 20 mL de TBS-T. Para la solución de bloqueo, se pesaron 1 g de Leche descremada y se disolvieron en 20 mL de TBS-T, en un vaso de precipitado de 25 mL, con agitador magnético. Se introdujo cada membrana en recipientes distintos con 10 mL de la solución de bloqueo (leche 5 %), incubando durante 1 hr / TA / agitación. Una vez terminada la incubación, se desechó la solución de bloqueo y se realizaron 2 lavados con TBS-T (cada lavado de 2 minutos).

Inmunoblot.

Se prepararon los anticuerpos primarios en una solución de Starting block (Thermo Fischer Scientific) con azida de sodio al 0.05%. Se etiquetó cada tubo con los datos siguientes: Starting block, Azida de sodio 0.05%, Ab primario, marca, dilución y fecha en que se preparó; se guardaron a 4° C.

- Membrana A

Ab primario	Marca (catálogo, especie)	Dilución	Incubación	Ab secundario	Dilución	Incubación
α-Caspasa 3 activa	Cell Signaling (CS-9661, IgG conejo)	1:1000	18 hrs / 4° C	α-IgG conejo (Rb)-HRP	1:5000	1 hr / TA
α-β Actina	Abcam (8226, IgG ratón)	1:10000	1 hr / TA	α-IgG ratón (Ms)-HRP	1:5000	1 hr / TA

- Membrana B

Ab primario	Marca (catálogo, especie)	Dilución	Incubación	Ab secundario	Dilución	Incubación
α -H3K4me3	Abcam (8580, IgG conejo)	1:2000	1 hr / TA	α -IgG conejo (Rb)-HRP	1:10000	1 hr / TA
α -H3T	Millipore (donativo, IgG conejo)	1:1000	1 hr / TA	α -IgG conejo (Rb)-HRP	1:10000	

Se incubó cada membrana con los anticuerpos primarios y secundarios en las condiciones adecuadas para ellos. Entre cada anticuerpo se realizaron 6 lavados con TBS-T; cada lavado con una duración de 5 minutos.

Revelado

En el cuarto oscuro, para la membrana A se utilizó como sustrato quimioluminiscente “Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate”, mientras que para la membrana B, se utilizó “Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate”. Se colocaron las membranas sobre dicha mezcla, quedando en contacto el sustrato y las proteínas de la membrana (ayudado de una pinza que no toque la zona de proteína), y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. En el transcurso de la incubación se colocaron en tres recipientes distintos 1: Solución reveladora, 2: Agua corriente y 3: Solución fijadora. Trascorrida la incubación, se eliminó el exceso de sustrato con una servitoalla y se colocaron las membranas dentro del acetato del cassette para revelar. Se encendió la lámpara de luz roja y se apagaron por completo equipos electrónicos y luz de iluminación; se recortaron placas autoradiográficas. Se colocaron sobre el acetato que cubre la membrana y se cerró el cassette; se tomaron exposiciones de distintos tiempos (1 minuto a 10 minutos). Se retiraron las placas autoradiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham), y se introdujeron 20 segundos dentro de la solución reveladora y enjuagando un poco en el recipiente con agua corriente, por último se introdujeron dentro de la solución fijadora por 5 minutos y se enjuagaron nuevamente en agua corriente y se dejaron secar. Las placas autoradiográficas se etiquetaron y se marcaron los PM.

Análisis estadístico

Las bandas en las placas autorradiográficas correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron mediante densitometría con el programa Image J (NIH, EUA). Se comparó el nivel de expresión de la proteína de interés con el nivel de expresión de un control interno (β -actina o H3T, además de expresión de proteína total por RP). Se analizaron los resultados mediante la prueba *t* de *Student* no paramétrica (Kruskal Wallis) con el programa GraphPad Prism versión 5.

7. Resultados

- **Estandarización para la obtención de proteínas nucleares**

La estandarización de la técnica para obtener las proteínas nucleares se llevó a cabo con la finalidad de obtener la banda de H3K4me3 esperada (15-17 KDa) sin artefactos.

En la Figura 11 se muestra la tinción de proteínas totales nucleares de timocitos obtenidas mediante la utilización del buffer de CHAPS. Al realizar el inmunoblot se observó la presencia de una sola banda; sin embargo, en un peso molecular mayor al esperado para la H3K4me3; entre 75 -150 KDa en vez de 15-17 KDa al correspondiente.

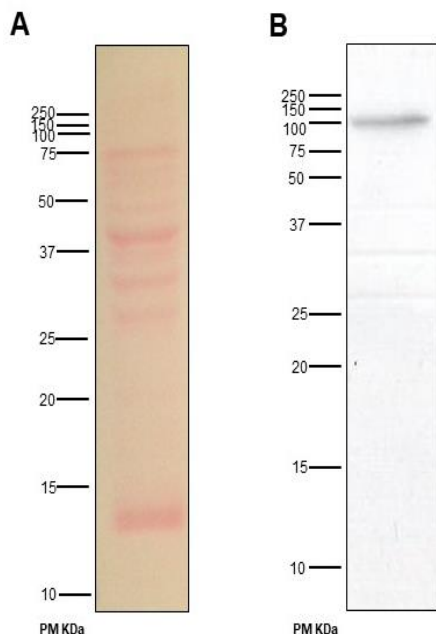


Figura 11. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares, utilizando Buffer de CHAPS.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% de proteínas totales timocitos transferidas a membrana de nitrocelulosa, tinción con RP. **B)** Inmunoblot α -H3K4me3 (Abcam – 8580) (1:1,000), α – IgG Rb – HRP (1:10,000). Bloqueo: Leche descremada 5 % en TBS-T, con exposición de 10 minutos, banda en PM superior al esperado (alrededor de los 15 - 17 KDa), sin la detección de bandas inespecíficas.

Con base en el resultado anterior, se probó otro buffer de extracción de proteínas nucleares con RIPA, el cual utiliza deoxicolato de sodio como detergente, en vez de CHAPS. Se llevó a cabo la obtención de proteínas nucleares de timocitos con este buffer (Figura 12). Se observa nuevamente el patrón de proteínas totales obtenidas y el inmunoblot, donde se puede apreciar tanto la banda esperada de la histona (15 – 17 KDa) como bandas inespecíficas en diversos PM.

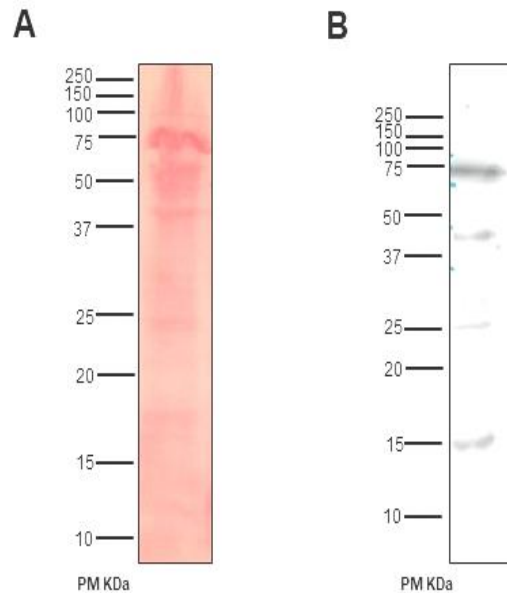


Figura 12. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares utilizando Buffer de RIPA.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% de proteínas totales de timocitos transferidas a membrana de nitrocelulosa, tinción con RP. **B)** Inmunoblot α -H3K4me3 (Abcam – 8580) (1:2,000), α – IgG Rb – HRP (1:10,000). Bloqueo: Leche descremada 5 % en TBS-T, con exposición de 5 minutos, banda en PM esperado (alrededor de los 15 - 17 KDa), así como la detección de bandas inespecíficas.

Por último, se llevó a cabo otra metodología para la extracción de proteínas nucleares utilizando el buffer Laemmli 2X. Esta vez las células utilizadas fueron mononucleares obtenidas de sangre periférica mediante un gradiente de densidad (Ficoll). En la Figura 13, se observan tanto el patrón de proteínas totales como el inmunoblot para dicha técnica. En este caso se obtuvo una sola banda entre los PM de 15 – 17 KDa, por lo que esta metodología, fue la utilizada para la experimentación.

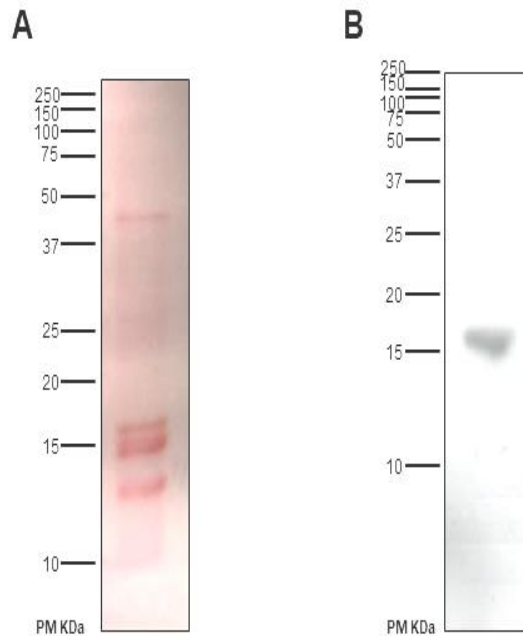


Figura 13. Estandarización para la obtención de proteínas nucleares, utilizando Buffer de Laemmli 2X.

A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% de proteínas totales de células mononucleares transferidas a membrana de nitrocelulosa; tinción con RP. **B)** Inmunoblot α -H3K4me3 (Abcam – 8580) (1:2,000), α – IgG Rb – HRP (1:10,000), Bloqueo: Leche descremada 5 % en TBS-T, con exposición de 15 minutos; banda en PM esperado (alrededor de los 15 - 17 KDa), sin la detección de bandas inespecíficas.

Una vez estandarizadas las técnicas, los timos fueron pesados antes de su procesamiento. En la Figura 14 se muestra que no hubo diferencia significativa entre los pesos del grupo Ctrl con respecto al grupo MO.

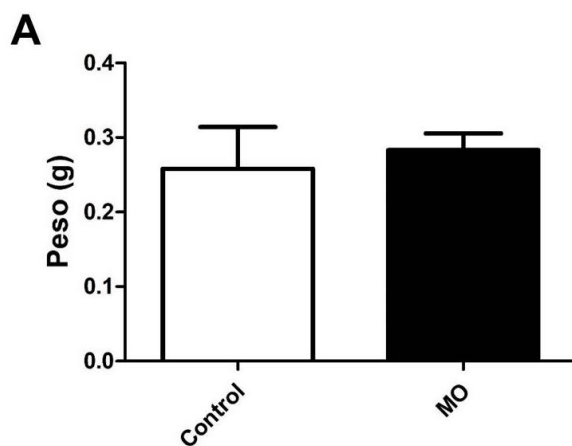


Figura 14. Diferencia de peso entre los tejidos obtenidos.

A) Los tejidos se pesaron en balanza analítica. Los datos fueron analizados mediante la prueba *t* de Student sin diferencia estadística significativa con un valor de $p=0.6623$ y un valor de error estándar de la media de 0.2581 ± 0.05 para Ctrl y 0.2832 ± 0.02 para MO.

En la Figura 15 se aprecian los cambios en los niveles de expresión de C3 activa en la progenie del grupo MO. Se observa un incremento de 4.33 veces su expresión con respecto al grupo Ctrl (** $p < 0.005$).

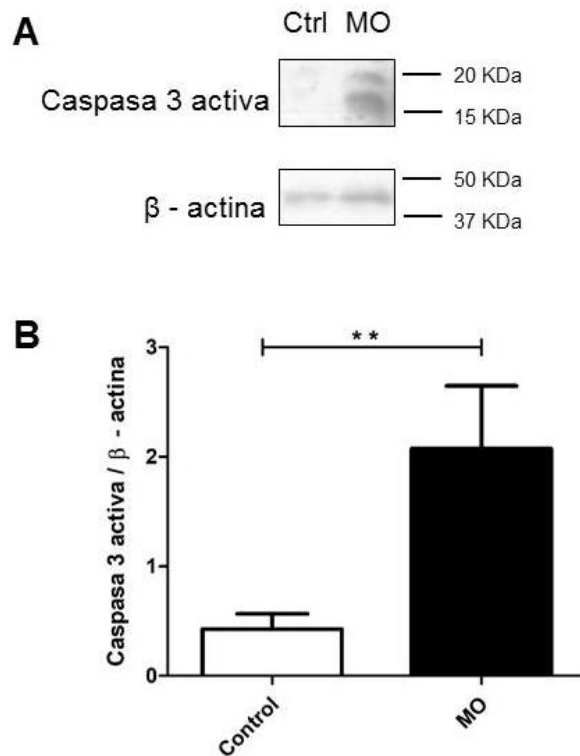


Figura 15. Comparación de la expresión C3 activa en el timo entre grupo Ctrl y grupo MO.

A) Los LT de timocitos fueron analizados por medio de la técnica Western Blot para evaluar los niveles de expresión de un marcador apoptótico, C3 activa, utilizando como proteína interna β -actina (Ctrl, grupo control; MO, grupo de obesidad materna). **B)** Niveles de la proteína C3 activa normalizada con los niveles de proteína interna mediante el análisis por densitometría; los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student, ** $p < 0.005$; grupo (Ctrl n = 5, grupo MO n = 6).

Por otro lado, al analizar la presencia de H3K4me3 se observa que en el grupo MO la trimetilación de la K4 en la H3 es menor respecto al grupo Ctrl. Mediante el análisis de esta marca epigenética con la proteína total (nuclear), el grupo MO es 0.68 veces menor que en el grupo Ctrl (* $p < 0.05$), mientras que utilizando como proteína interna la H3 total, no se muestra significancia estadística ($p = 0.1775$). Sin embargo, se observa nuevamente la tendencia a la disminución de la trimetilación en este grupo MO (Figura 16).

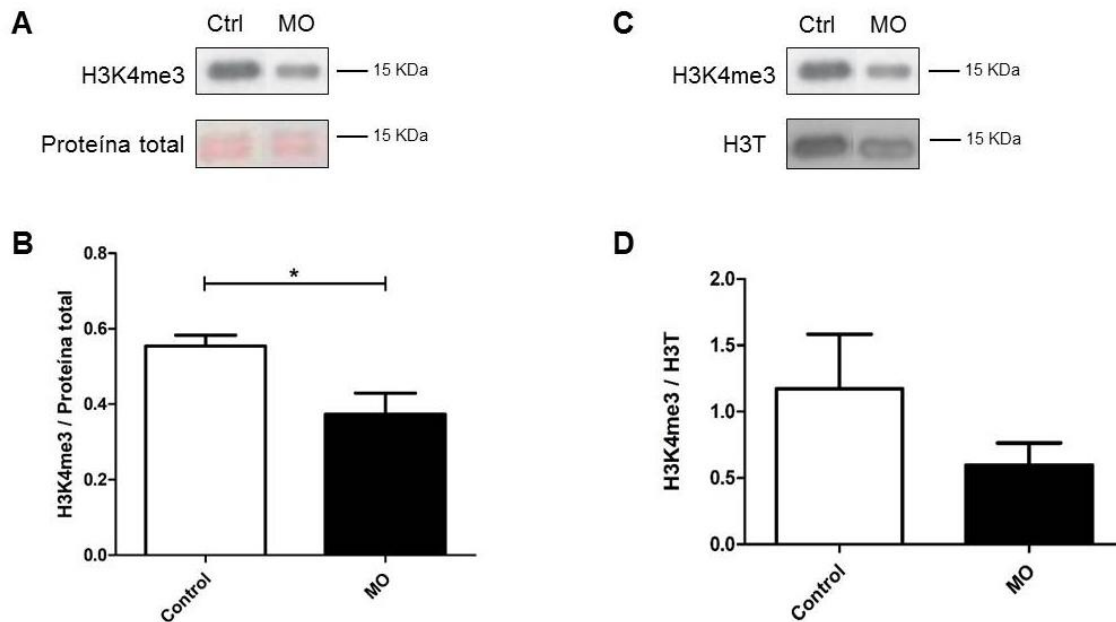


Figura 16. Comparación de la expresión de H3K4me3 entre grupo Ctrl y grupo MO.

A) Los lisados N de timocitos fueron analizados por medio de la técnica Western Blot para evaluar la presencia de H3K4me3 utilizando como proteína interna el RP de proteína total (Ctrl, grupo control; MO, grupo de obesidad materna). **B)** Niveles de la proteína H3K4me3 mediante el análisis por densitometría. Se observa la disminución de ésta proteína en el grupo MO, en comparación con el grupo Ctrl; los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student, * $p < 0.05$; grupo Ctrl $n = 5$, grupo MO $n = 6$. **C)** Los lisados N de timocitos fueron analizados por medio de la técnica Western Blot para evaluar los niveles de H3K4me3 utilizando como proteína interna H3T (Ctrl, grupo control; MO, grupo de obesidad materna). **D)** Niveles de la proteína H3K4me3 mediante el análisis por densitometría. Se observa la disminución de ésta proteína en el grupo MO en comparación al grupo Ctrl; los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student; grupo Control $n = 5$, grupo MO $n = 6$.

8. Discusión

La obesidad en términos generales es considerada una pandemia; ahora bien, durante el embarazo, la obesidad lleva a un mayor riesgo de complicaciones perinatales, tanto para la madre como para el feto.

A lo largo de los años se ha evidenciado que el embarazo es una ventana crítica para el buen desarrollo del feto, así como de sus posteriores etapas de vida como la adultez, en donde se ha demostrado que la MO favorece al desarrollo de diabetes, asma, hígado graso, obesidad, etc.

En el presente trabajo se empleó el modelo de rata gestante obesa, inducido por una dieta alta en grasa (HFD) (pregestacional - destete), para evaluar el efecto de la programación fetal en el sistema inmune adaptativo de su progenie adulta; en particular en el timo. Se reportan los cambios en los niveles de apoptosis a través

de la expresión de C3 activa y en la regulación epigenética mediante la expresión de la trimetilación de la histona H3 (H3K4me3) en timocitos de los grupos de estudio (Grupo Ctrl y Grupo MO).

Se han utilizado varios modelos animales para analizar los efectos del exceso de nutrición durante la gestación y el periodo postnatal temprano en su progenie en desarrollo; es el caso del modelo de madres alimentadas con HFD durante la gestación y la lactancia para desarrollar la obesidad materna. En la rata, las crías provenientes de estas madres, no reflejan diferencias de peso al nacimiento ni destete sino hasta edades tempranas, teniendo predominio alrededor de los 800 PND, en donde hay un incremento de tejido adiposo con características hipertróficas, hiperleptinemia y trigliceridemia. Así mismo, hay un mayor contenido de lípidos hepáticos al destete en comparación con las crías de madres control (Bautista, Martínez, Zambrano y 2009).

Los timos de las crías macho (130 PND) donados por el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, en colaboración con la Dra. Zambrano y el Dr. Reyes, fueron pesados antes de su procesamiento, sin embargo, sus pesos no mostraron diferencias significativas entre los grupos. No obstante, cabe mencionar que los timos del grupo MO mostraron una cantidad mayor de tejido adiposo con respecto al grupo control; esto puede deberse al incremento de adiposidad que se ha reportado en crías de madres con obesidad (Bautista, Martínez, Zambrano y 2009).

El sistema inmunológico se desarrolla desde la etapa fetal, alrededor de las cinco semanas de gestación (SDG). El desarrollo de las células linfoides comienza entre las 8 y 12 SDG en el humano (Zhang, Zhivaki y Lo, 2017), mientras que en la rata, el timo se origina a partir de la 5° SDG, en la tercera bolsa faríngea, hasta que alcanza su posición definitiva. Sin embargo, su crecimiento y desarrollo termina hasta que alcanza la madurez sexual (Repetto, Aliendo y Biasutto, 2010). Uno de los retos del sistema inmunológico, es el reconocer y discriminar entre los Ag propios del individuo como de aquellos Ag extraños, tales como microorganismos, tumores, trasplantes, etc., lo cual se lleva a cabo desde el desarrollo fetal (Salazar y Ávila, 2014).

Otro evento clave durante el desarrollo del sistema inmune es la programación de muerte celular o apoptosis que regula entre otros procesos la selección de células que saldrán a la periferia desde los órganos linfoides primarios (Dzhagalov, Chen, Herzmark y Robey, 2013). La C3 activa es una proteasa implicada en la apoptosis, encargada de catalizar la escisión del DNA en diversos tejidos y células (Porter y Jänicke, 1999), por lo que en este caso se utilizó como un marcador de activación apoptótica.

Se observaron niveles de expresión aumentados de C3 activa en el timo de la progenie del grupo MO con respecto al grupo Ctrl, sugiriendo un mayor nivel de

apoptosis. Se sabe que el timo, con el paso de los años, sufre un proceso de involución, en el cual, este tejido es reemplazado por tejido adiposo, favoreciendo de esta manera su atrofia y disminución de funciones (Rezzani, Nardo, Peroni, y Rodella, 2014). En el humano, este proceso comienza a partir de la pubertad, mientras que en roedores, aproximadamente a los 6 meses de edad (170 PND) (Piscoya y Rodríguez, 1999).

Existen factores que se ven involucrados en la inmunosenescencia, como el estrés, malnutrición, eventos ocurridos durante la lactancia, etc. Este es un mecanismo mediado por hormonas esteroides y la inducción de apoptosis en los timocitos corticales (Piscoya y Rodríguez, 1999). Cabe mencionar también que se ha reportado que la proteína liberada del RE por estrés (calpaína), se ve involucrada en procesos de senescencia celular (García y Vecino, 2003).

Como se ha mencionado, la malnutrición materna favorece al desarrollo de patologías en su progenie, y una de ellas es la obesidad (Farías, 2015). Ésta, es un estado de estrés que podría estar favoreciendo la activación de apoptosis en los timocitos por diversas vías, ya sea por la activación de p53 o por señales extrínsecas de muerte. Nuestros resultados mostraron mayores niveles de apoptosis en la progenie del grupo MO. Un nivel mayor de apoptosis sugiere una disminución en la maduración y diferenciación de linfocitos T, ya sea por su activación en la selección positiva o negativa, o bien, por una posible involución tímica temprana, dada por el aumento de adiposidad en el órgano.

La apoptosis tanto de timocitos como de linfocitos T maduros, también se puede llevar a cabo por un mecanismo dependiente de glucocorticoides (GCs) (López, 2012). Los GCs son esteroides provenientes de la glándula suprarrenal, que al unirse a su receptor (GR), inducen la producción de citocinas anti-inflamatorias. Esto tiene estrecha relación con la MO, ya que se considera como factor de desarrollo de estados inflamatorios a nivel sistémico (Papapietro y Guerrero, 2017). En el grupo MO podría estar alterada la vía de señalización de GCs o los GR, ya que con una mayor adiposidad hay un aumento de células inflamatorias por una producción elevada de IL-6, proteína C reactiva (PCR) y TNF- α así como un aumento de la concentración plasmática de GCs, durante el embarazo (Ghnenis, Odhiambo, McCormick, Nathanielsz, *et al.*, 2017)

Así mismo, una producción elevada de IL-6 y TNF- α se relaciona con una deficiencia en la recepción de leptina (Sánchez, 2005). Tanto los GCs como la leptina se relacionan con la vía de JAK2 / STAT3, que se ve inhibida y por tanto, se lleva a cabo el proceso de apoptosis acelerando la aparición de C3 y C9 (Liu, Gan, Zhou, Jin, *et al.*, 2015). Esto podría explicar la relación entre el aumento de tejido adiposo y la apoptosis en timocitos.

Así mismo, dentro de la gestación, ocurren modificaciones epigenéticas, tanto en el DNA como en las histonas. Estas modificaciones tienen una función clave en el desarrollo y diferenciación celular, así como en el registro de señales o factores ambientales en condiciones fisiológicas y patológicas (Casanello, Krause, Castro y Uauy, 2015).

Los resultados arrojaron niveles menores de trimetilación de la lisina de la histona H4 en el timo del grupo MO en comparación con el Ctrl. Los niveles altos de H3K4me3 se asocian a la activación de genes (Ruthenburg, Allis, y Wysocka, 2006) y se ha encontrado que dicha marca se sitúa cerca de regiones promotoras, teniendo así, un papel importante en la transcripción de genes (Dambacher, Hahn y Schotta, 2010). Por lo tanto, se puede sugerir que el grupo MO tiene una menor transcripción de genes que el Ctrl.

Para que se lleve a cabo la metilación de K, se necesita de HMT y de grupos $-CH_3$. Estos grupos provienen de una dieta adecuada de folatos, metionina y homocisteína; así mismo, se ha reportado que dicha dieta tiene una correlación directa con el grado de metilación de H y DNA (Castro, Krause, Uauy y Casanello, 2016), y es importante en el metabolismo de las células y la síntesis de proteínas, por lo tanto es vital durante el crecimiento.

Ahora bien, las HMT que se especializan en la trimetilación de la H3K4, son las que cuentan con el Dominio SET. Una de ellas es la MLL2, y se ha observado *in vitro* que si se encuentra ausente, los niveles de Bcl-2 se reducen (Lubitz, Glaser, Schaft, Stewart, *et al.*, 2007). Así mismo, la HMT SET7/9 se relaciona tanto con la H3K4, como con una posible metilación de p53 (guardián del genoma) (Qian y Zhou, 2006), siendo importante para su estabilización y actividad post-transcripcional que es una proteína implicada en la reparación de DNA. Si el daño se repara, prosigue el ciclo celular; sin embargo, si el daño no puede ser reparado, la célula entra al proceso de apoptosis o bien a la senescencia. Se sabe también que p53 tiene un papel importante en la selección negativa de timocitos (Arango, Llanes, Díaz y Faxas, 1997).

SET7/9 trimetila H3K4, dirigiendo selectivamente la expresión de genes diana p53, estimulando así la velocidad de ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) de transcripción por la interacción de H3K4me3 con la subunidad TAF3 del complejo TFIID. En las células, el agotamiento de H3K4me3 impide el reclutamiento de TFIID y RNAPol II en los promotores del ciclo celular regulados por p53, pero no tiene efecto en el reclutamiento de promotores pro-apoptóticos de p53 (Moorefield, 2013; Lauberth, Nakayama, Wu, Tang, *et al.*, 2013); así mismo, SET7/9, monometila en K327 a p53 en respuesta al daño en el DNA (Morgunkova y Barlev, 2006).

Así pues, se podría inferir que al tener una disminución en los niveles de metilación de H3K4, los niveles de apoptosis (C3 activa) se verán aumentados al tener una

cantidad menor de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2). Así mismo, se podría ver implicado p53, ya que puede estar llevando a cabo una desregulación de la selección negativa, o bien, como ya se había mencionado, la senescencia tímica temprana (donde p53 juega un papel importante) en el grupo MO.

9. Conclusiones

Se llevó a cabo la estandarización para la obtención de proteínas nucleares, donde el protocolo más sencillo y eficiente, fue el Laemmli 2X.

Se evaluaron los niveles de C3 activa y de trimetilación de H3K4 en los timos de las crías adultas de ratas con MO y ratas Ctrl mediante Western Blot, y se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Se encontraron niveles elevados 4.33 veces de C3 activa en el grupo MO, así como una disminución de 0.68 veces H3K4me3 con respecto al grupo Ctrl, y un pequeño aumento de adiposidad en los timos. Con base en esto, se sugiere que la disminución de marcas epigenéticas aumenta la probabilidad de muerte celular programada, ya sea de timocitos o bien de linfocitos T.

Estos resultados, concuerdan con la hipótesis de Barker, ya que se infiere que la MO conlleva a una programación epigenética del sistema inmune adaptativo en la descendencia en edad adulta. Sin embargo, aún no se sabe si estos cambios también se ven reflejados desde edades tempranas o bien hasta la senescencia.

10. Perspectivas

- ⊙ Identificar y aislar las subpoblaciones de timocitos en el grupo Ctrl y MO.
- ⊙ Determinar los niveles de proteínas anti y pro-apoptóticas en los timocitos, para poder definir si su deficiencia o incremento es la que provoca un aumento de apoptosis en timocitos.
- ⊙ Determinar los niveles de GCs y de leptina para identificar si la HFD de la madre es capaz de programar a los timocitos de su progenie a nivel hormonal.
- ⊙ Determinar los niveles de GR y de receptor de leptina para identificar si la HFD de la madre es capaz de programar a los timocitos de su progenie a nivel hormonal.

- Determinar la cantidad de adiposidad en el timo en el grupo Ctrl y MO.
- Determinar los niveles de C3 activa y H3K4me3 en los timocitos a través del tiempo (neonato, puberto, adulto y senescente), para definir si la programación se ve reflejada desde el nacimiento.

11. Referencias

Abbas, A., Litchman, A., y Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. (Octava ed.). México, D.F: Elsevier.

Almanza, J., Blancas, G., García, R., Alarcón, F., et al. (2008). Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx*, 144(6): 535-542.

Anderson, M., Venanzi, E., Chen, Z., Berzins, P., et al. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, 23(2), 227–239.

Arango, M., Llanes, L., Díaz, T., y Faxas, M. (1997). La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol*, 13(2), 126-134.

Barrera, R., y Fernández, L. (2015). Programación metabólica fetal. *Perinatología y Reproducción Humana*, 29(3), 99-105.

Barrios, J., Barrios, E., y Vergara, J. (2013). Efecto de la obesidad en la reproducción femenina. *Rev Mex Cienc Farm.*, 44(3), 8-18.

Bautista, C., Martínez, P., y Zambrano, E. (2009). Obesidad materna: Consecuencias sobre el metabolismo de la progenie. *Revista de la Escuela de Medicina “Dr. José Sierra Flores”*, 23(2), 10-15.

Blanco, M. (2018). Disfunción reproductiva en la rata macho, a nivel gonadal, causada por sobrepeso u obesidad materna inducida por dieta. Universidad Argentina de la empresa, Facultad de Ingeniería y Ciencias exactas, Argentina: UADE.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248–254.

Casanello, P., Karause, B., Castro, J., y Uauy, R. (2015). Programación fetal de enfermedades crónicas: conceptos actuales y epigenética. *Rev Chil Pediatr.*, 86(3),135-137.

Cascales, M. (2002). Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2002, Apoptosis. *Real Academia de Doctores de España*, 7, 97-120.

Castro, J., Krause, B., Uauy, R., y Casanello, P. (2016). Epigenética en enfermedades alérgicas y asma. *Rev Chil Pediatr*, 87(2), 88-95.

Chávez, F., Rojas, M., Fortoul, T., y Tenorio, E. (2017). Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 60(5), 36-44.

D'Herde, K., De Prest, B., Mussche, S., Schotte, P., et al. (2000). Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Nature, Cell Death & Differentiation*, 7, 331–337.

Dambacher, S., Hahn, M., y Schotta, G. (2010). Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity*, 105, 24-37.

DOF. (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013

Domínguez, C. (2007). Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. *Revista de endocrinología y nutrición*, 15(3), 149-155.

Doo, M., y Kim, Y. (2011). Association between ESR1 rs1884051 polymorphism and dietary total energy and plant protein intake on obesity in Korean men. *Nutrition Research and Practice*, 5(6), 527-532.

Dos Santos, Dos, Santos, Dos Santos, Matos, et. al. (2015). Maternal and post-weaning exposure to a high fat diet promotes visceral obesity and hepatic steatosis in adult rats. *Nutr. Hosp*, 32(4), 1653-1658.

Draizen, E., et al (2016). "HistoneDB 2.0: una base de datos de histonas con variantes, un recurso integrado para explorar las histonas y sus variantes". Base de datos (2016). PMID: 26989147

Dunn, G., y Bale, T. (2009). Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology*, 150, 4999-5009.

Dyce, E. (1999). Impronta genómica. *AMC*, 3(4), ISSN 1025-0255.

Dzhagalov, I., Chen, K., Herzmark, P., y Robey, E. (2013). Elimination of Self-Reactive T Cells in the Thymus: A Timeline for Negative Selection. *PLOS Biology*, 11(5), e1001566.

Elinos, C., Maldonado, V., y Meléndez, J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx.*, 139(5,) 493-499.

ENSANUT. (2016). Cifras de Sobrepeso y Obesidad en México-ENSANUT MC 2016 20 diciembre, 2016. <http://oment.uanl.mx/cifras-de-sobrepeso-y-obesidad-en-mexico-ensanut-mc-2016/>

Farías, M. (2015). Exploring developmental origins of health and disease in latinoamerica: Obesidad materna y programación fetal. *Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 65(1). ISSN: 0004-0622

Farías, M., y Oyarzún, E. (2012). Obesidad en el embarazo: razones para volver a preocuparse de la nutrición materna. *Medwave* 12(7), e5459.

García, M., y Vecino, E. (2003). Vías de la señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Arch Soc Esp Oftalmol.*, 78(7), ISSN: 0365-6691

García, R., Ayala, P., y Perdomo, S. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud*, 10(1), 59-71.

Ghnenis, A., Odhiambo, F., McCormick, R., Nathanielsz, W., et al. (2017) Maternal obesity in the ewe increases cardiac ventricular expression of glucocorticoid receptors, proinflammatory cytokines and fibrosis in adult male offspring. *PLOS One*, 12(12), 1-13.

Godfrey, K., Reynolds, M., Prescott, S., Nyirenda, M., et al. (2017). Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabet Endocrinol*, 5(1), 53-64.

González, Á., Fernández, E., y Lorenzo, S. (2005). Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Universidad de Vigo. Medicina - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(33), 2162-2173.

González, E. (2013). Obesidad: Análisis etiopatogénico y fisiopatológico. *Endocrinol Nutr.*, 60(1), 17-24.

Hanamsagar, R., Hanke M., y Kielian, T. (2012). Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology*, 33(7): 333-342.

Heerwagen, M., Miller, M., Barbour, L., y Friedman, J. (2010). Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R711-R722.

Hernández, S. (2012). Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina 1-fosfato (S1P) y del sistema Notch. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

La Rosa, D., Gómez, E., y Sánchez, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana Pediatría*, 86(4), 502-213.

- Laemmli, U.K.(1970). *Nature* (London) 227, 680. Doi: 10.1038/227680a0.
- Lauberth, S., Nakayama, T., Wu, X., Tang, Z., et al. (2013). H3K4me3 Interactions with TAF3 Regulate Preinitiation Complex Assembly and Selective Gene Activation. *Cell*, 152(5), 1021-1036.
- Lawrence, M., Daujat, S., y Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression *Trends in Genetics*, 32(1), 1-15.
- Liu, Z., Gan, I., Zhou, Z., Jin, W., et al., (2015). SOCS3 promotes inflammation and apoptosis via inhibiting Jak2/Stat3 signaling pathway in 3T3/L1 adipocyte. *Immunobiology*, 220, 947-953.
- López, D. (2012). Análisis de las vías indicadoras de apoptosis en timocitos de ratas desnutridas. Tesis UAM Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.
- Lu, M., Tzang, B., Kuo, W., Wu, F., et al. (2007) More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*, 15(11), 2634–42.
- Lubitz, S., Glaser, S., Schaft, J., Stewart, A., et al., (2007). Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase MLL2. *Mol Biol Cell* 18(6),2356-2366.
- Malet, G. (2005). Identificación de moduladores del apoptosoma mediante química combinatoria. Universidad de Valencia. España.
- Mandy, M., y Nyirenda, M. (2018). Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *Int health*, 10(2), 66-70.
- Martin, C., y Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysisne methylation. *Nature Review, Molecular Cell Biology*, 6(11), 838-849.
- Meresman, G. (2011). Relevancia de la apoptosis en la reproducción femenina. *Invest. clín.*, 52(3), 274-290.
- Molina, S., Correa, D., Rojas, J., y Acuña, E. (2014). Orígenes fetales de la patología del adulto: la restricción del crecimiento intrauterino como factor de riesgo. *Rev. chil. obstet. Ginecol.*, 79(6), ISSN 0717-7526
- Moncrieffe, H. (2005). Células T reguladoras (Tregs). University College London, Reino Unido. British Society for immunology. <http://inmunologia.eu/celulas-inmunologia-en-un-mordisco/celulas-t-reguladoras-tregs>
- Moorefield, B. (2013). PICKing H3K4me3. *Nature structural and molecular biology*, 20(4), 411-411.

Moran, E. (2006). Células Th17. Instituto de Dermatología Charles, Universidad de Dublín, Irlanda. British Society for immunology. <http://inmunologia.eu/celulas-inmunologia-en-un-mordisco/celulas-th17>

Moreno, G. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Elsevier*, 23(2), 116 - 205.

Morgunkova, A., y Barlev, N. (2006). Lysine methylation goes global. *Cell Cycle*, 5(12), 1308-1312.

Muñoz, M., Regueiro, J., y Fernández, E. (2016). TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat Immunol*, 17(6), 721-727.

Murphy, K., Travers, P., y Walport, M. (2009). Inmunobiología de Janeway. (Séptima ed.). México, D.F.: Mc Graw Hill.

Myles, I., Fontecilla, N., Janelins, B., Vithayathil, P., et al. (2013). Parental Dietary Fat Intake Alters Offspring Microbiome and Immunity. *J Immunol.*, 191(6), 3200-3209

Nathanielsz, P. (2006). Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR Journal*, 47(1), 73–82.

Nelson, D., Lehninger, A., y Cox, M. (2013). Lehninger Principios de bioquímica. (Sexta ed.). México, D.F.: Omega.

Odaka, Y., Nakano, M., Tanaka, T., Kaburagi, T., et al. (2012). The Influence of a High-Fat Dietary Environment in the Fetal Period on Postnatal Metabolic and Immune Function. *Obesity (Silver Spring)*, 18(9), 1688-1694.

Oliveira, C., Meneguz, R., Aguiar, M., y Barreto, J. (2011). Rol Emergente del Eje GH/IGF-I en el Control Cardiometabólico. *Arq Bras Cardiol*, 97(5), 434-439.

OMS. (2016). Mayo 2016: Un estudio destaca la creciente amenaza de las enfermedades no transmisibles para la supervivencia de las mujeres al embarazo y al parto. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. Recuperado en Agosto 2018 de: <http://www.who.int/bulletin/releases/NFM0516/es/>

OMS. (2018). Obesidad y sobrepeso. Recuperado en Marzo del 2019 de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Ondarza, R. (2012). La epigenética, la otra cara de la genética. *Mensaje Bioquímico*, 36, 200-211.

Oviedo, G., Marcano, M., Morón, A., y Solano, L. (2007). Exceso de peso y patologías asociadas en mujeres adultas. *Nutr Hosp.*, 22(3), 358-62

Papapietro, K., y Guerrero, J. (2017). Obesidad, inflamación y glucocorticoides. *Rev Hosp Clín Univ Chile*, 27, 309 – 19.

Pearse, G. (2006). Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicologic Pathology*, 34, 504-514.

Pérez, J., y Lie, A. (2012). Apoptosis mecanismo de acción. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revciemmedhab/cmh-2012/cmh122o.pdf>

Piscoya, J., y Rodríguez, J. (1999). Inmunidad e inmunosenescencia. *Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 57(4). ISSN 1025 - 5583

Pomilio, A., Vitale, M., Ciprian, J., y Vitale, A. (2016). Implicancias clínicas de metiltransferasas de moléculas pequeñas. *Acta Bioquím Clín Latinoam.*, 50(1), 77-98.

Porter, A., y Jänicke, R. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation. Cell Death Differ.*, 6(2), 99- 104.

Qian, C., y Zhuo, M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(23), 2755-2763.

Repetto, E., Aliendo, M., y Biasutto, S. (2010). Cambios morfológicas del timo en la etapa fetal y su importancia clínica. *Rev Arg de Anat Clin.*, 2(1), 7-15.

Rezzani, R., Nardo, L., Peroni, M., y Rodella, L. (2014). Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Dordr.)*, 36(1), 313-51.

Ríos, N. (2010). Obesidad en México. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*, 43(27): 1-5.

Rivera, J., Hernández, M., Aguilar, C., Vadillo, F., et al. (2013). Obesidad en México. Recomendaciones para una política de Estado. *UNAM: México* ISBN: 978-607-02-4478-0

Rodrigo, S., Fauste, E., De la Cuesta, M., Rodríguez, L., et al. (2018). Maternal fructose induces gender-dependent changes in both LXR α promoter methylation and cholesterol metabolism in progeny. *J Nutr Biochem* 61, 163-172.

Rodríguez, M., Téllez, N., Cerbón, M., López, M., et al. (2004). DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev. invest. Clín.*, 56(1), 56-71.

Rosado, E., Monteiro, J., Chaia, V., y Do Lago, M. (2006). Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona. *Nutr Hosp.*, 21(6), 686-693.

Rueda, C., Velilla, P., Rojas, M., y Rugeles, M. (2012). AMPc: una molécula clave en los eventos de regulación inmune y en el control de la replicación del VIH. *Infectio.*, 16(1), 59-71.

Ruthenburg, J., Allis, C., y Wysocka, J. (2006). Methylation of Lysine 4 on Histone 3: Intricacy of Writing and Reading a Single Epigenetic Mark. *Molecular Cell Review.*, 25(1), 15-30.

Salazar, L., y Ávila, D. (2014). Inmunología perinatal. *FEMINA*, 42(4), 185-192.

Sánchez, F., García, R., Alarcón, F., y Cruz, M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac. Med. Méx.*, 141(6), 405-412.

Sánchez, J. (2005). Perfil fisiológico de la leptina. *Colomb Med.*, 36, 50-59.

Santos, H., Schneider, R., Bannister, A., Sherriff, J., et al., (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* 149(26), 407-411.

Sanz, J., Martín, M., Reyes, E., y Martín, A. (2013). Antigen presenting cells. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 2013-03-01, 11(28), 1720-1727.

Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Hamad, E., et al. (2008). Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr.* 99, 1013-1017.

Satpathy, H., Fleming, A., Frey, D., Barsoom, M., et al. (2008). Maternal obesity and pregnancy. *Postgrad Med*, 120(3), 1-9.

Saz, P. (2000). Sistema inmunitario. Mecanismos inmunitarios. http://www.unizar.es/med_naturista/Tratamientos/inmuno%20y%20piel/Autoinmunes%20y%20alergias.pdf

Segovia, S., Vickers, M., y Reynolds, C. (2017). The impact of maternal obesity on inflammatory processes and consequences for later offspring health outcomes. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(05), 529–540.

Serrano, A. (2009). Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología clínica*, 5(S1), 1-82.

Skogen, J., y Overland, S. (2012). The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. *JRSM Short Rep.* 3(8), 59.

Sosa, R., Brandan, N., y Jeréz, J. (2012). Apoptosis. Cátedra de bioquímica. Facultad de Medicina UNNE.

Speakman, J., Hambly, C., Mitchell, S., y Król, E. (2008). The contribution of animal models to the study of obesity. *The International Journal of Laboratory Animal Science and Welfare*, 42, 413-432.

Suárez, W., Sánchez, A., y González, J. (2017). Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. *Rev. chil. nutr.*, 44(3).

Taylor, P., Matthews, P., Khan, I., Rees, D., et al., (2018). Generation of maternal obesity models in studies of developmental programming in rodents. "Investigations of early nutrition effects on long-term health", *Methods and applications. Methods in Molecular biology series*, 1735, 167-199.

Tejada, M. (2017). Malformaciones fetales inducidas por cambios en el ambiente materno. Educación Superior en Salud: Autonomía, financiación y Calidad: <http://uvsalud.univalle.edu.co/simposioinvestiga/index.php/XIX/XIXSimposio/paper/view/816>

Toche, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Clínica Médica Las Condes*, 23(4), 364-507.

Ucar, O., y Rattay, K. (2015). Promiscuous gene expression in the thymus: a matter of epigenetics, miRNA, and more? *Frontiers in immunology*, 6, 93.

Uniprot. (2018). UniProtKB - P84243 (H33_HUMAN). Core data. <https://www.uniprot.org/uniprot/P84243#expression>

Van Bavel, C., Dieker, J., Kroeze, Y., Tamboer, W., et al. (2014). Apoptosis-induced histone H3 methylation is targeted by autoantibodies in systematic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(1), 201–207.

Varela, G. (2013). Balance energético. <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1494/1557>

Vickers, M. (2014). Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 64(S1), 26–34.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., et al. (2009). Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. *Immunity*, 30: 155-167.

Wilson, R., y Messaoudi, I. (2015). The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity. *Mol Cell Endocrinol*. 418, 134.

Zambrano, E., Martínez, P., Rodríguez, y Nathanielsz, P. (2010). Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol*, 15(588), 1791-1799.

Zambrano, E., y Nathanielsz P. (2013). Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr Rev.*, 71(1), 42-54.

Zhang, X., Zhivaki, D., y Lo, R. (2017) Unique aspects of the perinatal immune system. *Nature reviews, immunology*, 17(8), 495-507.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., et al. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425– 432.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones, Buffers de extracción de proteínas

PBS 10X (1 L)

Tabla 6. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de PBS 10X.

Componente	Cantidad
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo. Refrigerar,

PBS 1X (500 mL)

Agregar 50 mL de PBS 10X y aforar con 450 mL de H₂O miliQ en una probeta de 500 mL, agitar solución y transferir a frasco de 500 mL, etiquetado. Refrigerar.

Buffer de lisis celular (Solución de lisis A)

Tabla 7. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A (citoplasma y membrana).

Componente	0.5 mL	1 mL
Tris-HCl 200 mM pH 7.6 (20 mM)	50 µL	100 µL
NaCl 1M (100 mM)	50 µL	100 µL
NP- 40 (1 %)	5 µL	10 µL
EDTA 0.5 M (1 mM)	5 µL	10 µL
Inhibidor de proteasas 25X (Roche)	20 µL	40 µL
Na ₃ VO ₄ 200 mM (2 mM)	5 µL	10 µL
NaF 1 M (50 mM)	25 µL	50 µL
H ₂ O miliQ	340 µL	680µL

Buffer de CHAPS (Solución de lisis A.1)

Tabla 8. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A.1 (Buffer de CHAPS).

Componente	0.5 mL	1 mL
Tris-HCl 200 mM pH 7.6 (20 mM)	50 μ L	100 μ L
NaCl 1M (100 mM)	50 μ L	100 μ L
CHAPS 10% (1 %)	50 μ L	100 μ L
EDTA 0.5 M (1 Mm)	5 μ L	10 μ L
Inhibidor de proteasas 25X (Roche)	20 μ L	40 μ L
Na ₃ VO ₄ 200 mM (2 mM)	5 μ L	10 μ L
NaF 1 M (50 mM)	25 μ L	50 μ L
H ₂ O miliQ	295 μ L	590 μ L

Buffer de RIPA (Solución de lisis A.2)

Tabla 9. Componentes y cantidades para la preparación de 0.5 mL y 1 mL de Solución de lisis A.2 (Buffer de RIPA).

Componente	1mL
Tris-HCl 200 mM pH 7.6 (20 mM)	100 μ L
EDTA 0.5 M (1 Mm)	10 μ L
NP- 40 (1 %)	10 μ L
Deoxicolato de sodio 10% (1%)	100 μ L
SDS 10% (0.1%)	10 μ L
NaCl 1M (150mM)	150 μ L
Inhibidor de proteasas 25X (Roche)	40 μ L
Na ₃ VO ₄ 200 mM (2 mM)	10 μ L
NaF 1 M (50 mM)	50 μ L
H ₂ O miliQ	520 μ L

Laemmli 2X con indicador de pH (Solución de lisis nuclear A.3)

Tabla 10. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Solución de lisis A.3 (Laemmli 2X con indicador de pH).

Componente	10 mL
Tris-HCl 1M pH 6.8 (65.8 mM)	658 μ L
Glicerol (26.3 %)	2630 μ L
SDS 10% (2.1 %)	2100 μ L
Azul de bromofenol (0.01%)	0.001 g
Disolver en H ₂ O miliQ Aforar a 10 mL Guardar a TA	

Laemmli 2X sin indicador de pH (Solución de lisis nuclear B)

Tabla 11. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Solución de lisis B (Laemmli 2X sin indicador de pH).

Componente	10 mL
Tris-HCl 1M pH 6.8 (65.8 mM)	658 μ L
Glicerol (26.3 %)	2630 μ L
SDS 10% (2.1 %)	2100 μ L
Disolver en H ₂ O miliQ Aforar a 10 mL Guardar a TA	

Solución de lisis C (eritrocitos)

Tabla 12. Componentes y cantidades para la preparación de 500 mL de Buffer de lisis de eritrocitos.

Componente	Cantidad
NH ₄ Cl 155 mM	4.1 g
KHCO ₃ 10 mM	0.5 g
EDTA 0.1 mM	0.015 g
Disolver los componentes en 300 mL de H ₂ O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 500 mL y aforar con H ₂ O miliQ a 500 mL; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo. Refrigerar.	

Anexo 2. Preparación de soluciones para preparación de muestras

DTT 1M (5 mL)

Disolver en 5 mL de H₂O miliQ, 0.771 g de DTT; traspasar a tubos Eppendorf en alícuotas de 500 µL. Etiquetar y congelar.

Laemmli 5X (10 mL)

Tabla 13. Componentes y cantidades para la preparación de 10 mL de Laemmli 5X.

Componente	Cantidad
Tris-HCl pH 6.8 1M (164.5 mM)	1.645 mL
Glicerol (55.5 %)	5.55 mL
SDS (5.25 %)	525 mg
Azul de bromofenol (0.025 %)	2.5 mg

Disolver el SDS en 2.5 mL de H₂O miliQ, agregar los demás componentes y seguir mezclando en agitador magnético, traspasar a tubo Falcon de 15 mL y llevar a 10 mL con H₂O miliQ y etiquetarlo.

Anexo 3. Preparación de soluciones para electroforesis y transferencia

Buffer de electroforesis 10X (1L)

Tabla 14. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de electroforesis 10X.

Componente	Cantidad
Tris (0.5M)	30 g
Glicina (1.92 M)	144 g
SDS 20 % (1%)	50 mL

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo.

Buffer de electroforesis 1X (1L)

Agregar 100 mL de buffer de electroforesis 10X y aforar con 900 mL de H₂O miliQ en una probeta de 1L, agitar solución y transferir a frasco de 1L, etiquetado.

Tabla 15.SDS-PAGE: Gel separador acrilamida/bisacrilamida 15%

Componente	10mL (15%)	20mL (15%)
H ₂ O miliQ	2.4mL	4.8mL
Tris-HCl 1.5M (pH 8.8)	2.5mL	5mL
Poliacrilamida-bisacrilamida 30%	5mL	10mL
APS 10%	100µL	200µL
TEMED	4µL	8µL

Tabla 16.SDS-PAGE: Gel concentrador acrilamida/bisacrilamida 5%

Componente	5mL (5%)	10mL (5%)
H ₂ O miliQ	3.45mL	6.9mL
Tris-HCl 0.5M (pH 6.8)	1.25mL	2.5mL
Poliacrilamida-bisacrilamida 30%	0.850mL	1.7mL
APS 10%	50µL	100µL
TEMED	5µL	10µL

Buffer de transferencia 10X (1L)

Tabla 17.Componentes y cantidades para la preparación de 1L de Buffer de transferencia 10X.

Componente	Cantidad
Tris (0.5M)	30 g
Glicina (1.92 M)	144 g

Disolver los componentes en 800 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo.

Buffer de transferencia 1X (1L)

Agregar 100 mL de buffer de transferencia 10X, agregar 200 mL de etanol absoluto y aforar con 700 mL de H₂O miliQ en una probeta de 1L, agitar solución y transferir a frasco de 1L, etiquetado. Refrigerar.

TBS 10X pH 7,6 (1 L)

Tabla 18. Componentes y cantidades para la preparación de 1L de TBS 10X pH 7.6.

Componente	Cantidad
Tris (0.2M)	24.2 g
NaCl (1.37 M)	80 g

Disolver los componentes en 700 mL de H₂O miliQ en un agitador magnético, ajustar a pH 7,6 con HCl, traspasar a probeta de 1L y aforar con H₂O miliQ a 1L; colocar la solución en frasco de vidrio y etiquetarlo. Refrigerar.

TBS-Tween (TBS-T) 500 mL

Agregar 50 mL de TBS 10X, aforar con 450 mL de H₂O miliQ en una probeta de 500 mL, traspasar a un frasco de vidrio y agregar 0.5 mL de Tween 20, mezclar, etiquetar. Refrigerar.

Anexo 4. Preparación de soluciones, para Ab primarios

Azida de sodio 10% (100 mL)

Disolver en 100 mL de H₂O miliQ, 10 g de azida de sodio. Para el manejo de este reactivo, utilizar guantes, lentes de seguridad, cubrebocas y bata. Transferir a frasco de 200 mL, etiquetado. Refrigerar.

Tabla 19. Asignación de carriles para marcador de peso molecular (PM), muestras, y Laemmli 5X; así como, cantidades a cargar (Membrana A)

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Mtra LT	PM	Ctrl1	MO1	Ctrl2	MO2	Ctrl3	MO3	Ctrl5	MO5	Ctrl6	MO6	MO4	Laemmli 5X	Laemmli 5X	Laemmli 5X
µl	2	15	35	23	40	26	40	40	23	40	10	40	40	40	40
Laemmli 5X	38	25	5	17	0	14	0	0	17	0	30	0	0	0	0

Tabla 20. Asignación de carriles para marcador de peso molecular (PM), muestras, y Laemmli 2X; así como, cantidades a cargar (Membrana B)

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Mtra N	PM	Ctrl1	Ctrl2	Ctrl3	Ctrl5	Ctrl6	MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	Laemmli 2X	Laemmli 2X	Laemmli 2X
µl	2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Laemmli 2X	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0