



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN



**ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO
METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES
TRANSGENERACIONAL.**

TESIS

PRESENTA:

P.L.N ESMERALDA GUIZADO HERNANDEZ

Para obtener el grado de:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

SINODALES

Dra. María Alejandra Terrazas Meraz
Mtra. Alma Margarita Venosa Castañón
Dra. Carol Botello Amaro
Dra. Delia Vanessa Lopez Guerrero
Mtra. Diana Rivera Bahena

Agradecimientos.

El camino para realizar un trabajo en tesis puede ser difícil, pero sin duda brinda un aprendizaje incomparable. El optimismo de realizar una investigación es necesario para lograr con mayor facilidad cada aspecto de la tesis. Sin duda siempre se requiere desarrollar habilidades importantes para su desarrollo. Estoy segura de que haber realizado este proyecto dejó mucho aprendizaje y habilidades académicas, que por supuesto, serán implementadas en mi práctica profesional. Todo lo aprendido respecto al objetivo del proyecto me motiva a seguir preparándome en esta área. Quiero agradecer a mi Directora de tesis; la Dra. Azucena Salazar Pila, quien despertó en mí a motivación y el gusto por la investigación desde los primeros semestres que fue mi profesora, es una persona y una profesional muy admirable. Agradezco la confianza depositada en mí; además de la paciencia y comprensión durante todo el desarrollo del proyecto. Así mismo, agradezco el apoyo de la Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez y el Dr. Juan José Acevedo por haberme brindado el apoyo en colaboración con el proyecto. Finalmente, y no menos importante quiero hacer un agradecimiento especial para mi familia, por su constante apoyo durante toda la carrera y por siempre confiar en mí y hacer esto posible.

Resumen:

El proyecto de tesis consistió en la realización de un modelo murino de diabetes tipo 2 transgeneracional. El objetivo fue conocer la relación de la calidad de la dieta durante el desarrollo intrauterino (programación fetal) y el posterior consumo calórico excesivo durante la etapa postnatal con un estado con un estado diabético de la progenie de padres con diabetes. Se requirió de la innovación, para la creación del alimento hipercalórico para el consumo de los roedores y el diseño de los *primers* para el gen GLUT4 para roedor. Los indicadores nutricionales para la medición del desarrollo de DMT2 fueron: la calidad de la dieta (dieta que satisfaga los requerimientos de energía y todos los nutrientes esenciales para mantener la salud) y cantidad de la dieta de acuerdo a su proporción de macronutrientes. El estado de metilación del gen GLUT4 se determinó como el indicador epigenético relacionado con el estado diabético.

Los resultados sugieren continuar con las mejoras del diseño de los primers para GLUT4, analizado otra región o sitio de islas CpG para el gen GLUT4 en roedores. En cuanto a las técnicas de investigación empleadas para el desarrollo del modelo de diabetes transgeneracional se concluyó que se debe mantener la inducción a la dieta hipercalórica por un tiempo más prolongado; un periodo >16 semanas para evidenciar los mecanismos biológicos de la DMT2. Se destaca un incremento de peso mayor al nacer asociado al consumo del agua azucarada contrastado con alimento sólido hipercalórico. Los niveles de glucosa se mantuvieron superiores a lo normal. No se destacan como valores de riesgo para el desarrollo de DMT2 según los resultados mediante el análisis estadístico. Se sugiere hacer mediciones de glucosa sérica > 6 semanas para descartar la influencia de los mecanismos homeostáticos de regulación de la glucosa.

Summary:

The thesis project consisted in the realization of a murine model of transgenerational type 2 diabetes. The objective was to know the relationship between the quality of the diet during intrauterine development (fetal programming) and the subsequent excessive caloric intake during the postnatal stage with a state with a diabetic state of the progeny of parents with diabetes. Innovation was required for the creation of the hypercaloric food for the consumption of rodents and the design of the primers for the GLUT4 gene for rodents. The nutritional indicators for measuring the development of DMT2 were: diet quality (diet that meets energy requirements and all essential nutrients to maintain health) and diet quantity according to its macronutrient ratio. The methylation status of the GLUT4 gene was determined as the epigenetic indicator related to the diabetic status.

The results suggest continuing with the improvements in the design of the primers for GLUT4, analyzing another region or CpG island site for the GLUT4 gene in rodents. Regarding the research techniques used for the development of the transgenerational diabetes model, it was concluded that the induction of a hypercaloric diet should be maintained for a longer time; a period >16 weeks to demonstrate the biological mechanisms of DMT2. There is a greater increase in weight at birth associated with the consumption of sugar water compared with high-calorie solid food. Glucose levels remained above normal. They do not stand out as risk values for the development of T2DM according to the results through statistical analysis. It is suggested to make serum glucose measurements > 6 weeks to rule out the influence of homeostatic glucose regulation mechanisms.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	2
2.1 Diabetes mellitus tipo 2	2
2.2 Regulación fisiológica de la glucosa y en DMT2	4
2.3 Alimentación hipercalórica, procesos de glucotoxicidad y lipotoxicidad: regulación epigenética	6
2.4 Dieta hipercalórica en la programación metabólica.	9
2.5 Metilación del ADN.	13
2.6 Ciclo del carbono y metilación	15
2.7 Uso del modelo murino para la DMT2.	16
3. JUSTIFICACIÓN.	18
4. HIPÓTESIS.	19
5. OBJETIVOS	
5.1. General.	19
5.2. Específicos.	19
6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.	20
6.1 Diseño del estudio.	20
6.2 Universo de trabajo y muestra.	20
6.3 Instrumentos de investigación.	22
6.4 Desarrollo del proyecto.	35
6.5 Diseño de análisis estadístico.	37
7. RESULTADOS.	37
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	46
9. CONCLUSIONES.	54

10. PERSPECTIVAS.....	54
12. REFERENCIAS.....	55
13. ANEXOS.....	60

Lista de siglas, símbolos y abreviaturas.

- **ADA:** Sociedad Americana de Diabetes.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AGE:** Advance glycation end products.
- **AGL:** Ácidos grasos libres.
- **AKT:** Grupo de enzimas que participan en varios procesos relacionados con el crecimiento, ayudan a transferir las señales en el interior de las células. La enzima de Akt es un tipo de proteína serina-treonina cinasa (proteína cinasa B).
- **ALX:** Aloxano. Tóxico de los islotes de Langerhans, que se emplea en experimentación para inducir diabetes mellitus.
- **AS160:** Proteína de 160 kDa (designada como AS160, para Akt sustrato de 160 kDa) con un dominio Rab GAP (proteína activadora de GTPasa) predicho que es fosforilado en múltiples sitios por la proteína quinasa Akt - ATP: Adenosina Trifosfato.
- **CAF:** Dieta de comida de cafetería.
- **CD1:** Cepa no consanguínea. Utilizada para experimentación con la consideración de un genotipo no específico.
- **CH3:** Grupo metilo.
- **CpG:** Dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina.
- **DAG:** Diacilglicerol.
- **DMG:** Diabetes gestacional mellitus.
- **DMT2:** Diabetes mellitus tipo 2.
- **DNMTs:** Enzimas ADN metiltransferasas cataliza la transferencia de un grupo metilo al ADN
- **DNMT3A:** Enzima ADN-metiltransferasas 3A es una enzima codificada en humanos por el gen DNMT3A.
- **DNMT3B:** Es una enzima que en humanos está codificada por el gen DNMT3B.
- **ERO:** Especies reactivas del oxígeno.
- **ENSANUT:** Encuesta nacional de salud y nutrición.
- **FAD:** Flavina adenina dinucleótido
- **GLUT:** son un tipo de proteínas transportadoras que actúan por difusión facilitada y están distribuidos diferencialmente en los tejidos corporales.

- **GLUT4**: Proteína localizada en el citoplasma almacenado en forma de vesículas en tejidos sensibles a la insulina.
- **GLUT4 MET-FWR**: Cebador para GLUT4 metilado forward.
- **GLUT4 NO MET-FWR**: Cebador para GLUT4 no metilado forward.
- **GLUT4 MET-RVS**: Cebador para GLUT4 metilado reverse.
- **GLUT4 NO MET- FWR**: Cebador para GLUT4 no metilado reverse.
- **GSK-3**: El glucógeno sintasa cinasa 3 es una proteína cinasa de serina/treonina que interviene en la adición de moléculas de fosfato a los residuos de aminoácidos de serina y treonina.
- **GTS**: Sistema de transporte de glucosa.
- **HbA1c**: Hemoglobina glucosilada.
- **HFD**: Dieta con alto contenido en grasa.
- **HFHSD**: Dieta con alto contenido en grasa y azúcar.
- **HSD**: Dieta con alto contenido en azúcar.
- **INS**: Insulina.
- **IR**: Receptor de insulina.
- **IRS**: Sustrato del receptor de insulina.
- **IGF-2**: Factor de crecimiento insulínico tipo 2.
- **IMC**: Índice de masa corporal.
- **LEARn**: Modelo latent early-life associated regulation.
- **MAP**: Vía de cinasas activadas por mitógenos.
- **MAT**: Metionina adenosiltransferasa.
- **Met**: Metilación.
- **mg/dL**: Abreviatura de miligramos por decilitro.
- **mg/kg**: Abreviatura de miligramos por kilogramos de peso.
- **ml**: Abreviatura de mililitros
- **ms**: Metionina-sintasa
- **MT**: Metiltransferasas.
- **NCBI**: National Center for Biotechnology Information.
- **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.
- **pb**: Pares de bases nitrogenadas.

- **STZ:** Estreptozotocina Tóxico de los islotes de Langerhans, que se emplea en experimentación para inducir diabetes mellitus.
- **SAM:** S-adenosilmetionina substrato esencial para la metilación del ADN.
- **SAH:** S-adenosilhomocisteína substrato esencial para la metilación del ADN.
- SAHH:** S-adenosilhomocisteína hidrolasa
- **Ser/Thr:** Serina/Treonina.
- **SHMT:** Serina hidroximetiltransferasa.
- **SO⁴:** Sulfato.
- **TBE 1%:** Disolución tampón formada por tris, borato EDTA para su uso en electroforesis.
- **Tyr:** Tirosina.
- **RPM:** Revoluciones por minuto.
- **P:** Fosfato
- **Ph:** Fosforilación.
- **PI3K:** Fosfatidilinositol-3 cinasa.
- **PIP3:** Segundo mensajero celular de la vía AKT.
- **PLP:** Piridoxal-5´-fosfato
- **PY:** Tirosina fosforilada.
- **g:** Símbolo de gramo. Unidad principal de masa del Sistema Cegesimal de unidades.
- **h:** Símbolo que representa las horas.
- **°C:** Grados Celsius.
- **µL:** Medida de volumen de un líquido equivale a un microlitro.
- **%:** Símbolo que indica porcentaje.
- **>:** Símbolo que indica mayor que

Índice de lista de tablas.

Tabla 1. Cálculo de dosis de ALX para inducción a diabetes	23
Tabla 2. Proporciones calóricas de macronutrientes de alimento hipercalórico	25
Tabla 3. Cuadro comparativo de alimento estándar y alimento hipercalórico.	26
Tabla 4. Preparación de reactivos para la PCR punto final y temperaturas tratadas en el termociclador.	33
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para GLUT4 de roedor.	33
Tabla 6. Condiciones tratadas para electroforesis para gen GLUT4 de roedor.	35
Tabla 7. Condiciones implementadas para la PCR para gen GLUT4 de roedor.	42
Tabla 8. Condiciones implementadas para electroforesis para gen GLUT4 de roedor.	42
Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos metilados y sus condiciones de amplificación para la PCR del gen GLUT4 de roedor para los geles amplificados.	43

Índice de lista de figuras.

Figura 1. Modelo que propone el rol de la epigenética en los mecanismos patogénicos de la diabetes	3
Figura 2. Representación de la vía de señalización de insulina	6
Figura 3. Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes.	8
Figura 4. Vía de PI3K/AKT en tejido muscular en estado normal y resistencia a la insulina...	9
Figura 5. Mecanismos biológicos implicados en la programación metabólica	11
Figura 6. Epigenética de la programación paterna en la descendencia	12
Figura 7. Metilación de ADN y resultado en la expresión genética	13
Figura 8. Ruta de la homocisteína	16
Figura 9. El ciclo de la homocisteína/ S-adenosilmetionina (HYC/SAM)	16
Figura 10. Toma de glucosa con tiras reactivas y glucómetro marca Accu-check	24
Figura 11. Información nutrimental de alimento hipercalórico	26
Figura 12. Elaboración del alimento hipercalórico.	27
Figura 13. Fórmula para la determinación delta cambio de peso.	28
Figura 14. Extracción de sangre por punción cardiaca	29
Figura 15. ADN extraído	30
Figura 16. Mediciones de niveles de glucosa sérica durante el tratamiento dietético.	38
Figura 17. Cambio de peso corporal durante las semanas de estudio en ratones CD1	39
Figura 18. Delta de cambio peso promedio final	39
Figura 19. Medición de los diferentes consumo de tratamiento dietéticos por grupo.	41
Figura 20. Amplificación de la muestra 4AM estado metilado	44
Figura 21. Amplificación de la muestra 1AM estado metilado	45

1. INTRODUCCIÓN

La programación fetal se define como un proceso de adaptación, donde los factores ambientales como la nutrición pueden alterar las vías de desarrollo durante el crecimiento prenatal, induciendo con ello cambios en el metabolismo postnatal y aumentando la susceptibilidad de padecer enfermedades crónicas en la vida adulta, como la diabetes mellitus 2 (DMT2)¹. El origen multifactorial de la DMT2 representa el fenotipo final de problemas metabólicos crónicos que pueden iniciar desde las primeras etapas de la vida ². Su origen, inicia a nivel epigenético durante la vida intrauterina. La nutrición materna afecta el crecimiento del feto y de igual forma impacta en su desarrollo durante la infancia ³. El impacto del ambiente intrauterino de las mujeres gestantes está determinado principalmente por la nutrición, tomando en cuenta que los componentes de la dieta afectan la expresión de los genes, es decir, que genes serán inducidos y cuáles serán reprimidos frente a determinado nutriente ⁴. La epigenética se refiere a los cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos ⁵. Estos cambios son modulados por diferentes mecanismo, el más estudiado es la metilación del ADN, a través de este mecanismo existe una modificación covalente en los dinucleótidos CpG, que es catalizado por enzimas que transfieren un grupo metilo, creando marcas epigenéticas potencialmente hereditarias mediante la división celular mitótica^{6,7}. Los estados de hiperglucemia característicos de las DMT2 inducen la desmetilación de dinucleótidos del genoma, generando cambios que afectan la memoria metabólica e inducen la aparición de enfermedades crónicas ⁷.

2. ANTECEDENTES.

2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 2.

La diabetes mellitus es definida como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia, a consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, por la falla de las células β pancreáticas⁹. La última encuesta realizada por la ENSANUT en 2021, reporta 15 millones de personas con DMT2, La prevalencia de diabetes diagnosticada es de 10.4%, no diagnosticada de 5.4% con un total de 15.8%. Además, el 36% de los adultos con diabetes desconocen su condición⁸.

La proporción de población que desconoce su condición de diabetes es mayor en menores de 40 años (61%) que en adultos mayores (18%)⁸. Por lo que, se considera un problema de salud pública grave en la etapa de la vida de adulto joven, misma que se considera etapa productiva económicamente, afectando así su capacidad de trabajo y provocando un aumento en la morbimortalidad⁷. Los criterios de diagnóstico para diabetes según la American Diabetes Association 2023, son los siguientes: glucosa en ayunas (>126 mg/dl), hemoglobina glucosilada (>6.5%), prueba de tolerancia a la glucosa (200mg/dl), prueba aleatoria o casual (>200 mg/dl) 12 La diabetes tiene un origen multifactorial en el que participan factores genéticos y factores medioambientales. Su fisiopatología se debe a un exceso crónico de la energía, que se desarrolla en personas genética y epigenéticamente susceptibles, sus mecanismos adaptativos fallan y son incapaces de compensar el exceso energético⁷.

Resultando una inflamación crónica de bajo grado en los tejidos, un incremento de glucógeno hepático y la resistencia a la insulina⁷. La insulina es una hormona anabólica

encargada principalmente de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl favoreciendo la entrada y almacenamiento de la glucosa en músculo, tejido adiposo y en hígado, de este modo se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción¹¹. La resistencia a la insulina es de una las principales características de la DMT2. Ocurre en tejidos insulino sensibles como el hígado, musculo esquelético y tejido adiposo. La resistencia a la insulina desregula la homeostasis de la glucosa, lípidos, proteínas, efectos mitógenos, diferenciación celular y la presión arterial ¹¹. La predisposición a la resistencia insulínica y/o a la disfunción de células β pancreáticas se hereda de forma no Mendeliana, debido a su heterogeneidad genética y patogenia multigénica. Además, los factores medioambientales tales como una dieta inadecuada e inactividad física pueden modular dichas manifestaciones del fenotipo⁷ como se presenta dicha correlación a continuación (figura 1):

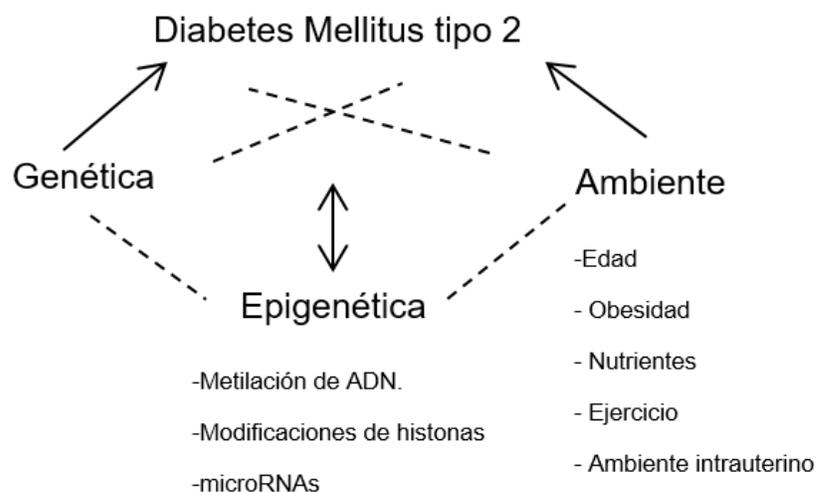


Figura 1. Modelo que propone el rol de la epigenética en los mecanismos patogénicos de la diabetes. (modificado: Ling, 2009)

2.2 Regulación fisiológica de la glucosa y en DMT2.

La obesidad y la DMT2 están asociadas con la resistencia a la insulina. En la resistencia a la insulina, la actividad de las células β aumenta, aumentando la liberación de la insulina adicional para mantener la tolerancia normal a la glucosa, lo que resulta en el desarrollo de hiperinsulinemia²⁷. El metabolismo de la glucosa aporta energía a la célula mediante la biosíntesis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) a través de la glucólisis como vía catabólica. La homeostasis de la glucemia involucra tres procesos: 1) absorción de glucosa en el intestino delgado; 2) internalización y consumo de glucosa por los tejidos corporales, y 3) la producción hepática de glucosa¹³. La membrana celular no es permeable a moléculas polares como la glucosa, por lo que es necesaria la participación de proteínas transportadoras acopladas a la membrana¹³.

El sistema de transporte de glucosa (GTS) es estimulado por la insulina; causando una regulación positiva en la translocación de las proteínas transportadoras de glucosa, manteniendo así, la homeostasis del metabolismo de los carbohidratos y lípidos¹⁴. Dado que los tejidos tienen diferentes necesidades de energía, la absorción de glucosa en sangre está mediada por las proteínas transportadoras de glucosa específicas en cada tejido llamadas GLUT¹⁴. Los GLUT son un tipo de proteínas transportadoras que actúan por difusión facilitada y están distribuidos diferencialmente en los tejidos corporales¹³.

En condiciones postprandiales, la glucosa alta en la sangre estimula la liberación de insulina de las células β que se encuentran en los islotes de Langerhans en el páncreas, regulando la absorción de glucosa en sangre, al unirse el receptor de la insulina permitiendo la entrada de glucosa a las células de los músculos esqueléticos y tejido

adiposo¹⁴. Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un número de interacciones proteicas. Existen dos vías principales de transducción: La vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activada por mitógenos (MAP cinasas) Ambas vías regulan la acción de la insulina asociada a la regulación del metabolismo energético, la expresión génica y efectos mitogénicos¹¹. La vía de señalización de PI3K es el mecanismo principal en el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y lípidos¹⁷. Comienza con una fosforilación del receptor en residuos de tirosina (Tyr) llevando una serie de eventos de fosforilación/desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Estas cinasas son responsables de transmitir la señal de la insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula¹¹. La translocación de las vesículas de almacenamiento de GLUT4 ubicadas en el citosol, sucede mediante exocitosis, se integra a la membrana, con la subsecuente captación de glucosa¹³.

La desregulación de GLUT4 da como resultado la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Se ha demostrado en números estudios que la calidad de los macronutrientes de la dieta influye en la expresión de los genes transportadores de glucosa y sensibilidad de la insulina¹⁶. En pacientes diabéticos tipo II, los tejidos blanco de la insulina se encuentran con una expresión disminuida, al igual que los niveles de fosforilación de la PI3K cinasa y la proteína cinasa B, los cuales constituyen elementos de señalización temprana de la insulina¹⁷. A continuación se muestra la representación de la vía de la insulina en un estado normal (figura 2):

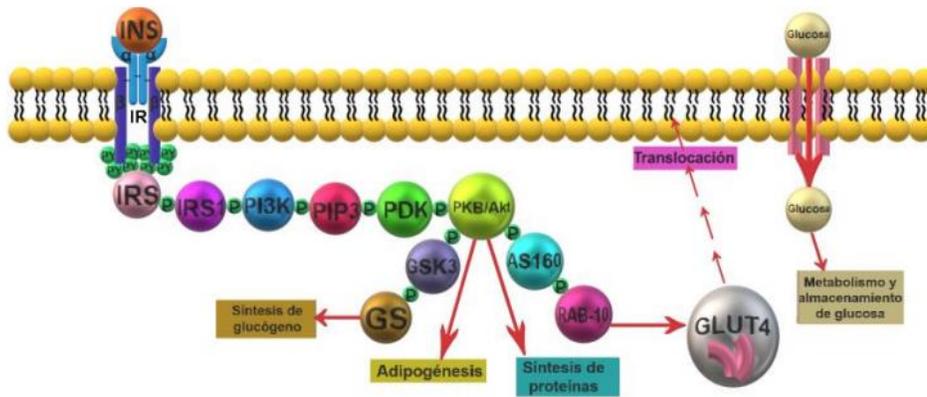


Figura 2. Representación de la vía de señalización de insulina (modificación: Gutiérrez Rodelo, 2017)

2.3 Alimentación hipercalórica, procesos de glucotoxicidad y lipotoxicidad: regulación epigenética.

Las sustancias químicas comunes presentes en la dieta pueden afectar el genoma del humano, de manera directa e indirecta, al alterar la expresión o estructura de los genes²⁴.

Los nutrientes de los alimentos pueden tener un efecto a nivel celular a través de diferentes sitios de acción 1) pueden actuar como ligandos para receptores de factores de transcripción; 2) pueden ser metabolizados por rutas metabólicas primarias y secundarias, y en consecuencia alterar concentraciones de sustratos e intermediarios y 3) pueden afectar positiva o negativamente las vías de señalización²⁴.

El consumo calórico en exceso de los individuos altera su estado homeostático a un estado obesogénico con una progresión que en camina a la resistencia a la insulina en los órganos sensibles a su acción, puesto que los AGL (ácidos grasos libres) se depositan en los órganos, produciendo lipotoxicidad²⁸. Los factores desencadenantes de la lipotoxicidad serían: 1) Incremento de la resistencia a la insulina y disminución de la

secreción de insulina pancreática. A su vez, la cascada de señalización se ve afectada en la activación de sus receptores por lipotoxicidad y 2) Inhibición del transporte de glucosa, reducción de la síntesis de glucógeno, y alteración de la glucólisis. De este modo, los AGL logran obstruir el metabolismo de la glucosa²⁸ (figura 3).

El estado hiperglicémico en pacientes con DMT2 puede causar productos de glicación avanzada, tal es el caso del aumento de la actividad de la hexosaminas, originando cambios funcionales y químicos de las proteínas, y a su vez alterando la expresión de los genes²⁶. La glicación avanzada deriva de la hiperglucemia crónica y es causada por la interacción de glucosa, fructosa, glucosa-6-fosfato y sus derivados con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. De este modo, se forman productos de glicación avanzada, conocidos como AGE (*por sus siglas en inglés, advance glycation end products*)²⁶.

A nivel metabólico, la glicación se inicia con la reacción de los grupos carbonilos de los carbohidratos con los grupos amino de las proteínas, en especial con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina dando origen a los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina y está asociado con la progresión de la DMT2²⁶. Los AGE pueden tener un efecto negativo de la función de las proteínas, suelen desregular la acción de algunos receptores en específico como los receptores I y II, dado que son moléculas capaces de ligarse a los AGE. La formación de los AGE en los ácidos nucleicos puede producir efectos dañinos en la proliferación celular y en la expresión génica²⁶. El enlace que se forma entre las proteínas de señalización y la N-acetilglucosamina es del tipo "O-" glicosídico (O-NaGlc). Existen evidencias de que la incorporación de N-acetilglucosamina en residuos de serina y treonina pueden afectar varios procesos celulares al inhibir la fosforilación de proteínas en estos residuos. Esto

sugiere que algunas de las proteínas que participan en la acción de la insulina, como los IRS y el transportador GLUT4, pueden ser modificadas a nivel postraduccional por la adición de la N-acetilglucosamina. Estos residuos de serina y/o treonina requieren de ser fosforilados para que la insulina ejerza su acción; sin embargo, al unirse la N-acetilglucosamina, el proceso de fosforilación no se realiza y con ello la acción de la insulina disminuye²⁶.

La glucosaminilación del transportador GLUT4 altera su afinidad a la glucosa, disminuye su actividad y estabilidad, y modifica su distribución celular; lo cual puede conducir a la falla o al desarreglo del sistema de transporte de la glucosa²⁶.

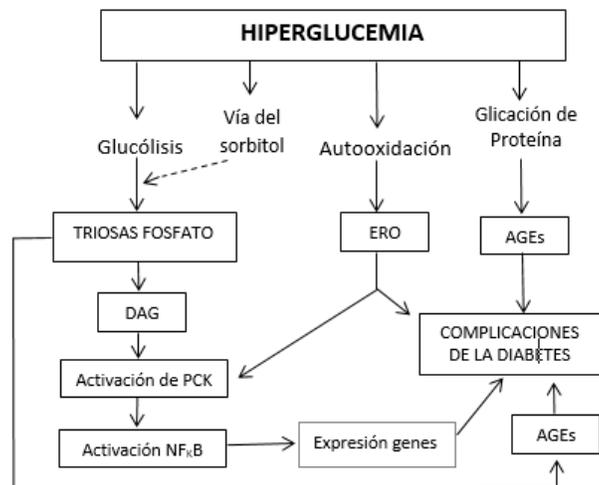


Figura 3. Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes. (modificado: Díaz-Flores, 2004)

La señalización de PI3K/AKT juega un papel central en la fisiología celular al mediar las señales del factor de crecimiento durante el crecimiento del organismo y los procesos celulares críticos, como la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, la síntesis de proteínas y la proliferación y supervivencia celular. Un desequilibrio en esta vía conduce al desarrollo de obesidad y DMT2²⁷. La obesidad está asociada con la

resistencia a la insulina, y desencadenado la acumulación ectópica de lípidos y posteriormente provocando lipotoxicidad y resistencia a la insulina, siendo la vía de señalización de PI3K/AKT la promotora de la biosíntesis de lípidos y a su vez, la inhibidora de la lipólisis. Al existir una sobreexpresión de dicha vía y una activación constitutiva de AKT en las células β pancreáticas da como resultado un aumento en la masa, la proliferación y el tamaño celular de las células β , por lo tanto, se bloquea la vía PI3K/AKT mediada por insulina, lo que reduce la secreción de insulina y la función de las células β ²⁷.

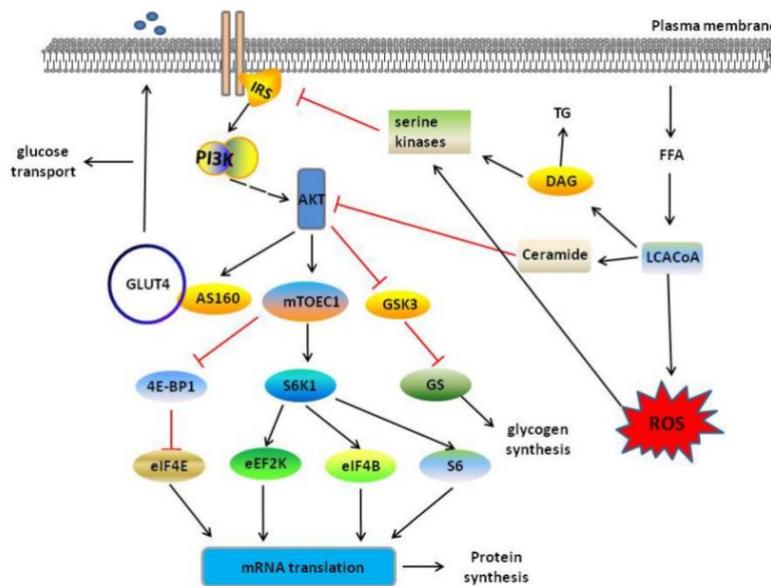


Figura 4. Vía PI3K/AKT en tejido muscular en estado normal y resistencia a la insulina. (tomado: Xingjun Huang, 2018)

2.4 Dieta hipercalórica en la programación metabólica.

La definición de la calidad de la dieta ha sido utilizada para referirse a una dieta que satisfaga los requerimientos de energía y todos los nutrientes esenciales para mantener la salud³⁴. Los elementos principales que comprenden a la calidad de la dieta son, tales como ingesta energética de nutrientes, grupos de alimentos que se consumen y su tipo,

así como la cantidad de comidas al día que se realizan³⁴. Por lo tanto, la calidad deberá ser influenciada por diferentes elementos que conlleven a un estado nutricional de salud óptimo.

Por otro lado, una baja calidad de la dieta materna conlleva a efectos sobre nutrición fetal, y una posterior nutrición postnatal caracterizada por ser desequilibrada tiende a incrementar el riesgo de desarrollar patologías metabólicas¹⁸. La obesidad materna y la diabetes gestacional son patologías vinculadas al exceso nutricional. Diferentes estudios han demostrado como la obesidad materna se suele asociar a macrosomía al nacimiento¹⁶.

En lo que respecta a estudios realizados en animales, simular un ambiente obesogénico materno, encabezado por un consumo mayoritario de grasas y carbohidratos en una dieta hipercalórica, ha demostrado una relación con el aumento del peso al nacer, incrementado la adiposidad, alteraciones en el metabolismo de la glucosa e insulina y una elevación de las cifras tensionales¹⁷. La ingesta de grasas de la dieta materna es un factor importante que determina la calidad de los ácidos grasos transferidos a través de la placenta que posteriormente serán secretados en la lactancia. Por lo que un aumento en esta ingesta, da la posibilidad de un fenotipo de adaptación con desequilibrios en ácidos grasos que contribuyen al aumento de enfermedades metabólicas¹La epigenética es el colectivo de cambios en el fenotipo debido a procesos que surgen independientes de la secuencia primaria del ADN. Está íntimamente relacionada con los cambios en los niveles y perfiles de expresión de los genes²⁰.

Los cambios epigenéticos pueden ocurrir en estadios tempranos de la vida y hacerse manifiestos en la edad adulta y la vejez. Esta teoría se conoce como el *modelo latent early-life associated regulation (LEARn)*. Según esta teoría, los factores ambientales pueden cambiar el genoma mediante marcas epigenéticas en fases tempranas de la vida, posiblemente durante la vida in utero²⁰ (figura 5).

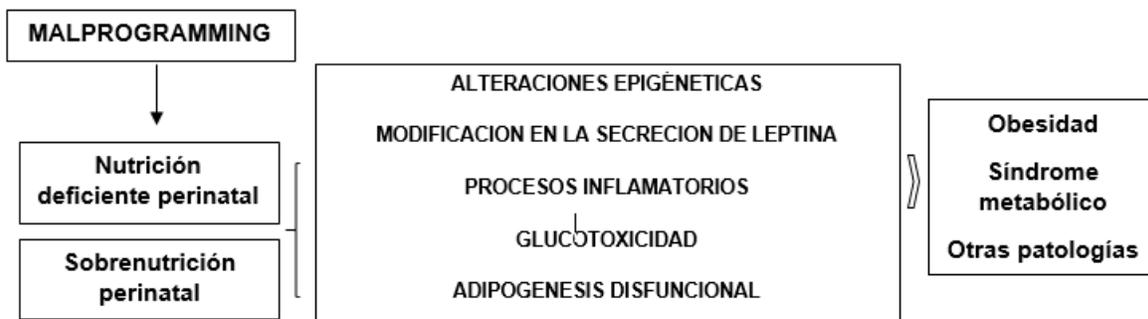


Figura 5. Mecanismos biológicos implicados en la programación metabólica. (modificado: Maria Teresa Ramírez-López, 2015) ("Malprogramming"; programación deficiente por su traducción al inglés)

La susceptibilidad a cambios en el epigenoma varía en las distintas etapas del ciclo vital, ya que existen ventanas epigenéticas en las que la predisposición a los cambios es específicamente influenciado como sucede en el embarazo donde se produce un borrado de marcas epigenéticas y una posterior reconstrucción en el código de la metilación del ADN¹.

Durante el desarrollo embrionario hay genes que deben ser improntados de acuerdo con el origen parental, es decir, metilados y silenciados transcripcionalmente (figura 6). Se denomina impronta a la expresión diferencial de alelos dependiendo de su procedencia parental y el fenómeno ocurre debido a que la metilación en los gametos masculinos y femeninos está específicamente determinada⁵. Hay evidencias que sugieren que los genes con impronta podrían ser elementos clave para la transmisión de efectos

transgeneracionales, en respuesta a cambios rápidos en la alimentación y en el estilo de vida⁵. Entre el 40% y el 70% de la variabilidad del peso corporal se ha atribuido a la herencia genética¹⁹. La evidencia actual apoya la hipótesis de que la propensión a la obesidad en adultos se origina en etapas tempranas del desarrollo y tiene efectos inter y transgeneracionales⁶.

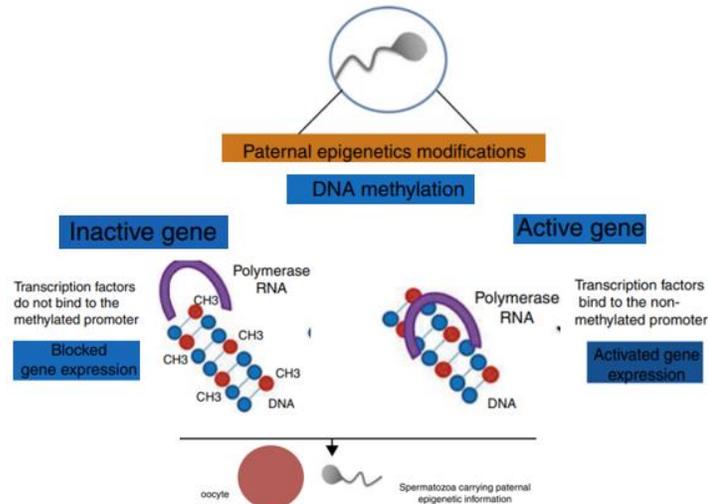


Figura 6. Epigenética de la programación paterna en la descendencia. (modificado: Ramírez, 2018)

En relación con el metabolismo energético, patrón epigenético de la nutrición de la madre gestante y su influencia en la programación fetal aunado al excesivo peso del niño en su primer año de vida, podrían ser una herramienta efectiva para el evaluar el riesgo de padecer obesidad y comorbilidades asociadas como la DMT2¹⁹.

Los estudios que investigan la asociación entre la metilación global, la metilación sitio específico o metilación de todo el genoma del ADN con respecto a la obesidad se resumen en resultados con un impacto en los perfiles de metilación⁶. El desarrollo de métodos epigenómicos de cuantificación realizados con un análisis de sangre periférica logró analizar: la metilación de cuantificación específica de sitios y asociaciones de

numerosos genes y sus CpGs con respecto a la obesidad y DMT2⁶. Se ha planteado la hipótesis de que la “memoria metabólica” es la cascada en que la hiperglucemia intracelular induce la sobreproducción de superóxidos a nivel mitocondrial, un proceso crucial en la activación de todas las vías que interviene en la patogenia y en las complicaciones⁷. La asociación de las modificaciones epigenéticas como una de las reguladoras de las funciones del metabolismo y la relación de alteraciones en las vías moleculares podrían explicar su relación con respecto a la diabetes como un fenómeno de memoria metabólica⁷.

2.5 Metilación del ADN.

Esta modificación epigenética en el ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metilcitosinas están presentes en los dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) como se representa en a continuación en la figura 7.

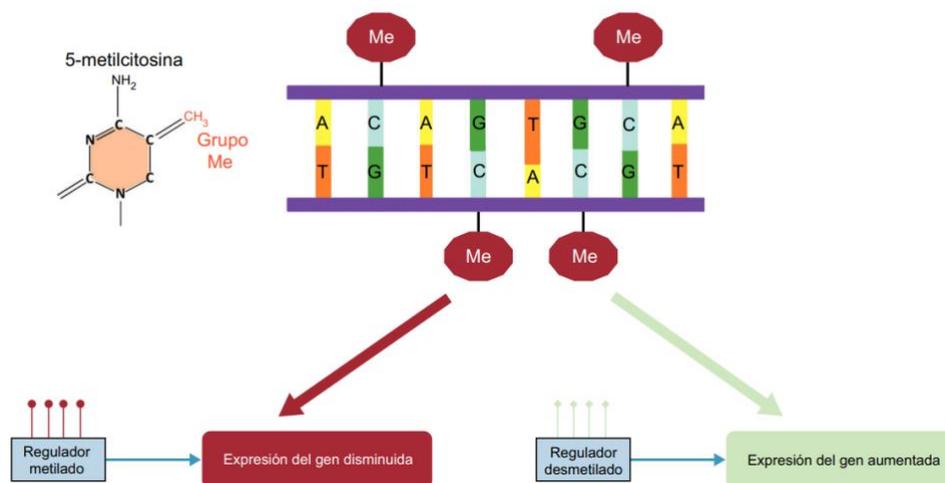


Figura 7. Metilación de ADN y resultado en la expresión génica. Me: metilo, A: adenina, T: timina, C: citosina, G: guanina. (tomado: Dolores Corella, 2017)

La metilación del ADN se realiza por las ADN metiltransferasas. Estas se clasifican en dos grupos: ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1), que son las que mantienen los patrones de metilación, y de novo (DNMT3A y DNMT3B), que son las que realizan nuevas metilaciones. También existen desmetilasas que se encargarían del proceso inverso de eliminación de los grupos metilo, pero estos mecanismos son menos conocidos²¹.

En el genoma humano hay 56 millones de sitios CpG, de los cuales el 70-80% están metilados y corresponden al 4-6% de todas las citosinas. Los dinucleótidos de CpGs están concentrados en las pequeñas regiones llamadas islas CpGs que conforman el 70% de los promotores de genes humanos⁷. La distribución de las CpGs en el genoma es heterogénea. Algunas áreas son ricas y otras pobres en dinucleótidos CpG⁷. Estas zonas ricas en dicho dinucleótidos (más del 60%) se denominan islas CpG. Estas islas suelen concentrarse entre el promotor y la zona del inicio de la transcripción²¹. Los niveles y patrones de metilación son tejido específico y no todas las citosinas están metiladas. Esto último es lo que diferencia los estados de actividad génica entre células diferenciadas, ya que inducen procesos fisiológicos claves del desarrollo⁷.

La metilación es crucial para establecer las características fenotípicas de las células, tejidos y organismos. Además, puede ser heredada a través de múltiples divisiones celulares. Los patrones de metilación genómicos son establecidos durante dos períodos del desarrollo, en células germinales y en la pre implantación embrionaria, generando células con un amplio potencial de desarrollo⁷. Existen dos mecanismos principales de desmetilación, la demetilación pasiva y la desmetilación activa. La desmetilación pasiva ocurre por la reducción o ausencia en la actividad de las *DNMTs*, en especial de la

DNMT1, en el mantenimiento de la 5mC tras la replicación celular, perdiéndose así la metilación en la hebra hemimetilada. La desmetilación activa, por su parte, ocurre en respuesta a cambios de señales en la célula⁷. La dieta puede ejercer un efecto sobre las *DNMT* o sobre la disponibilidad de moléculas donantes de grupos metilo o implicadas en su metabolismo¹⁹.

2.6 Ciclo del carbono y metilación.

El metabolismo bioquímico de un carbono es clave para el proceso de metilación del DNA. La S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH) son sustratos y productos esenciales para la metilación. Su tasa se ha utilizado como indicador de la capacidad de metilación celular estableciendo que una disminución de SAM disminuye a su vez la metilación. El ciclo de un carbono recibe este nombre porque transporta un carbono durante su reacción y está conformado por tres ciclos bioquímicos que participan conjuntamente⁷.

La transmetilación, conocido como el ciclo de SAM, es importante por aportar el grupo metilo a la *DNMT1*. El segundo es el ciclo del folato, fundamental para la síntesis de poliaminas donde el folato es el compuesto donador del grupo metilo. Finalmente, el ciclo de la transulfuración, que es esencial e importante para la generación de precursores de glutatión y taurina. Evidencias genéticas recientes sugieren que la hiperactivación de esta vía conduce a estados epigenéticos alterados⁷.

La metionina-sintasa (MS) junto al cofactor vitamínico B12, son importantes en la reacción para generar metionina. A partir de este compuesto junto el adenosil- trifosfato (ATP), la MAT cataliza la reacción para generar SAM, compuesto principal que dona su grupo metilo a las DNMTs para producir S-adenosilhomocisteína y entrar al ciclo de transulfuración o remetilarse⁷.

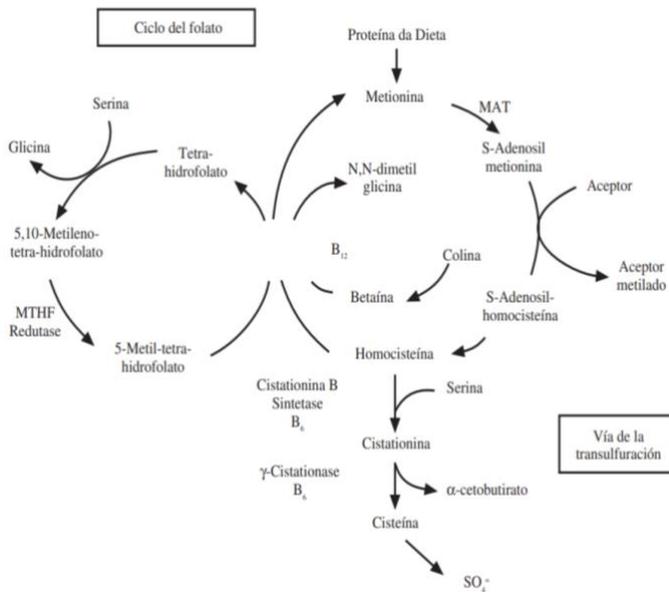


Figura 8. Rutas de la homocisteína (tomado: Sánchez, 2007)

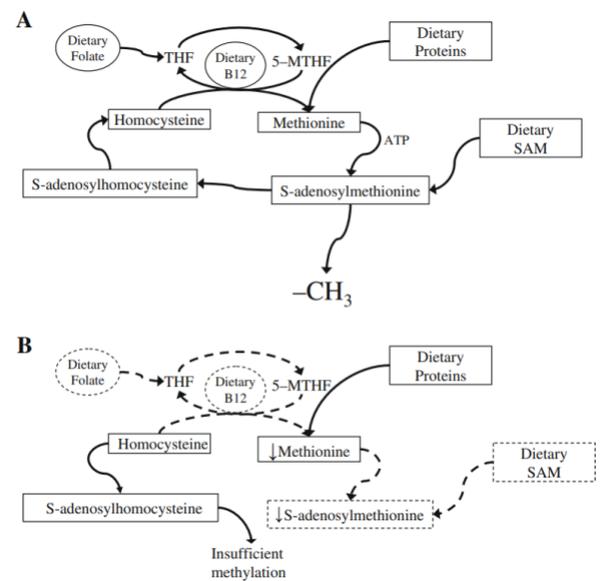


Figura 9. El ciclo la homocisteína/S-adenosilmetionina (HCY/SAM). (tomado de: Sánchez, 2007) (A) Vía normal. (B) Vía patógena (inversa).

2.7 Uso del modelo murino para la DMT2.

El modelo murino se emplea en la experimentación in vivo con frecuencia, por ser un análogo de humanos, la similitud de los roedores con el metabolismo humano y su accesible manipulación es lo que promueve el desarrollo de estudios en modelos in vivo con roedores¹⁹. La confirmación de que la nutrición afecta a la metilación del ADN se ha

alcanzado fundamentalmente por medio de modelos experimentales en animales¹⁹. Estudios en roedores con una administración de dietas obesogénicas e hipoproteicas durante el embarazo se demostraron que hay cambios en el metabolismo de las enzimas *DNMT*, así como cambios en la expresión y metilación de promotores de genes involucrados en metabolismo lipídico celular¹⁹.

Los modelos más populares de obesidad inducida por la dieta son: alto contenido en grasa (*HFD*), alto contenido en azúcar (*HSD*), alto contenido en grasa y azúcar (*HFHSD*) y dietas de comida de cafetería (*CAF*). Las dietas tipo *HFD* provocan un desequilibrio en el metabólico, disminución del gasto energético y como resultado el aumento de peso de roedores de laboratorio²³. El desarrollo de un modelo transgeneracional de diabetes requiere de un modelo in vivo en roedores para lograr adaptar y evaluar las condiciones que generan la patología. La similitud del metabolismo de los roedores, permite comparar las condiciones y los resultados como un posible mecanismo en humanos.

Existen múltiples modelos animales utilizados para la inducción de diabetes en su mayoría son experimentados en roedores. La diabetes se puede inducir químicamente a través del daño de las células pancreáticas derivado de la administración de fármacos como Aloxano (*ALX*) y/o estreptozotocina (*STZ*). La combinación de una dieta *HFD* y la administración del fármaco *ALX*, podrían ser dos factores a imitar en la fisiopatología de la *DMT2*. El uso de la dieta *HFD* provoca resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa mientras que la administración de *ALX* reduce la funcionalidad de las células beta pancreáticas²³.

3. JUSTIFICACION.

Este estudio se realizó en un modelo murino transgeneracional de DMT2 con el que se quiso medir el impacto negativo que puede tener el ambiente intra uterino alterado, así como la alimentación hipercalórica en la vida posnatal, sobre la epigenética y el fenotipo de diabetes. Dicho estudio pretende contribuir en el conocimiento de este fenómeno complejo y de difícil análisis en humanos.

La calidad de la dieta en etapas tempranas de la vida considera las necesidades nutrimentales y energéticas de la misma, tiene un gran impacto como factor ambiental a nivel epigenético (programación fetal), su influencia recae en la expresión de la genética, por lo cual, se considera un indicador del estado de salud/enfermedad a través de la estimación del impacto que tiene un ambiente intrauterino nutricional subóptimo en el estado del epigenoma y el fenotipo de la descendencia.

La diabetes mellitus tipo 2 representa el 90% de los casos de diabetes en el país. El riesgo que tienen los familiares de personas con DTM2 se establece con el valor lambda, el cual depende del grado de parentesco y su prevalencia. Como factor bioquímico de riesgo se utiliza el índice de sensibilidad a insulina. Si la DMT2 es consecuencia de una adaptación *in útero*, la prevención primaria podría consistir en proteger el desarrollo del feto durante la etapa de la programación fetal y su etapa post natal.

4. HIPOTESIS

El estado no metilado del gen GLUT4 y el consumo de dieta hipercalórica estarán relacionados con el riesgo de padecer DMT2 en la descendencia de progenitores diabéticos alimentados con dieta hipercalórica.

5. OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar el estado metilado/ no metilado del gen GLUT4 y su relación con el tipo de tratamiento dietético hipercalórico administrado en la progenie de ratones diabetizados en los Laboratorio A y B de investigación de la Facultad de Nutrición del año 2019 al 2020.

Objetivos específicos.

1. Analizar el efecto de la dieta en los niveles de glucosa y el peso en gramos por grupo de estudio en los ratones diabetizados.
2. Generar un modelo murino de DMT2 transgeneracional y una dieta hipercalórica modificada, para el estudio epigenético de su influencia sobre del estado de metilación del gen GLUT4.
3. Analizar el estado metilado del gen GLUT4 en los grupos experimentales mediante PCR punto final.

6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

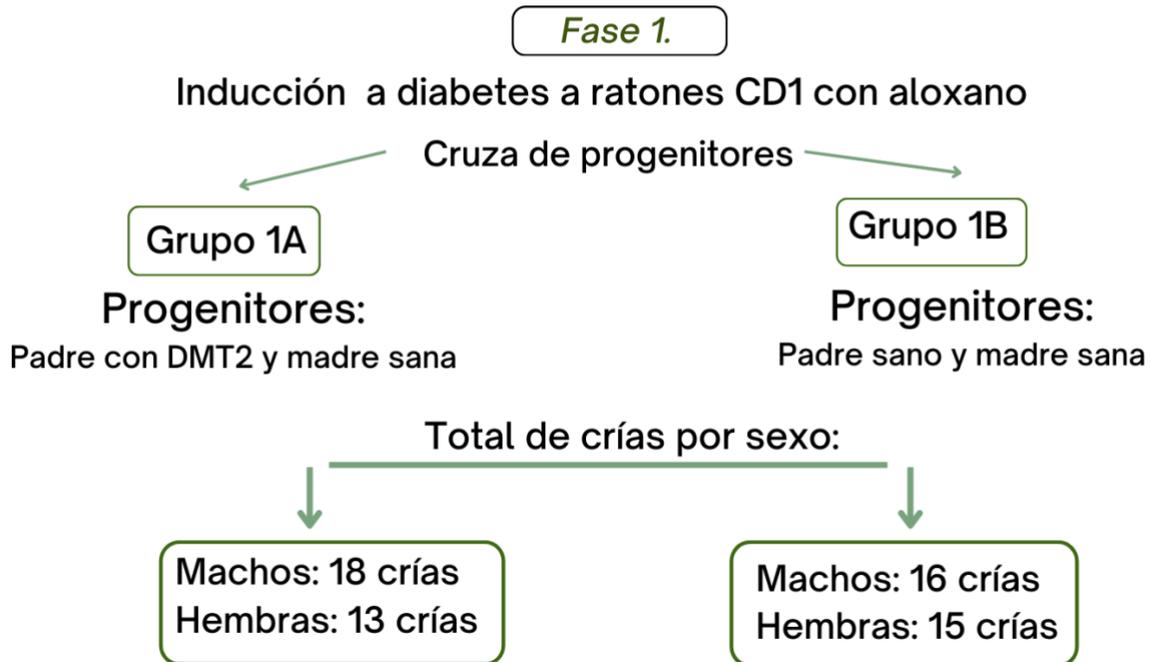
A) DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio con diseño experimental, en un modelo murino; se desarrolló con ratones CD1 en dos fases: 1) Fase 1: Inducción a DMT2 e inducción de dieta hipercalórica 2) Fase 2: Inducción a dieta hipercalórica y evaluación del nivel de metilación de GLUT4. El desarrollo experimental se llevó a cabo como una colaboración entre el Laboratorio de Electrofisiología de la Facultad de Medicina-UAEM y los Laboratorios A y B de investigación de con la Facultad de Nutrición.

B) UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA

El siguiente diagrama describe la creación del modelo murino transgeneracional de diabetes. Se realizaron diferentes cruzas de progenitores: padre con diabetes y madre control (puesto que no se logró la inducción a diabetes en la madre), a su vez, se realizó la inducción a dieta hipercalórica en los progenitores durante la etapa de gestación. Finalmente se sometieron a las crías al consumo de los diferentes tratamientos hipercalóricos por grupo como se muestra a continuación:

Modelo murino transgeneracional de DMT2



Fase .2

DISTRIBUCIÓN DEL TOTAL DE CRÍAS POR TRATAMIENTO NUTRICIONAL

● Control (Adicional a las cruza de los grupos 1A y 1B):	8
● Dieta normal + agua azucarada (DN + AA)	18
● Dieta hipercalórica + agua azucarada (DH + AA)	19
● Dieta hipercalórica + agua normal (DH + AN)	17

Tiempo de tratamiento nutricional:

14 semanas

C) INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

Inducción a diabetes en ratones progenitores.

Se realizó la inducción química en roedores de cepa CD1 mediante un agente químico Aloxano (ALX). Compuesto ácido formado por la oxidación del ácido úrico; los estudios reportan que tiene una actividad diabetogénica³³. El procedimiento implementado se describe a continuación.

1. Se realizó el registro en la bitácora de cada uno de los roedores que fueron inducidos a diabetes mediante una báscula digital marca TORREY MODELO L-PCR-40. Se tomó el peso mayor del registro para la posterior realización del cálculo para la dosis de administración de ALX.
2. La fórmula de administración ALX implementada es la siguiente: 200 mg/kg peso.
3. La dosis total de ALX fue pesada en la báscula analítica y posteriormente se diluyó con 100 μ l de agua destilada por cada ratón.
4. Se estableció la dosis de administración para cada ratón de acuerdo a su peso (Tabla 1).
5. Se realizó la medición del nivel de glucemia en sangre una semana posterior y se registró en la bitácora. Se consideró un nivel de glucosa \geq 200 mg/dl como una inducción positiva. En caso no haber obtenido un valor positivo (\geq 200 mg/dl) se procede a una reinducción. Si el resultado fue negativo se repite el procedimiento hasta tres veces, con lapsos de espera de una semana para lograr un resultado positivo (\geq 200 mg/dl). Si no se logra en el tiempo establecido, se descarta la inducción a diabetes con ALX.

Tabla 1. Cálculo de dosis de ALX para inducción a diabetes

Descripción del método de inducción a diabetes con ALX.	
1. Cálculo de ALX con respecto al peso	2. Cálculo de ALX para inducción a diabetes
Semana 1	Semana 1
Listado del peso ratones 1. Ratón 1: 18 g 2. Ratón 2: 18 g 3. Ratón 3: 18 g 4. Ratón 4: 20 g 5. Ratón 5: 16.5 g	1. Fórmula 200 mg de ALX / Kg 2. Realizar el cálculo mediante una regla de tres, tomando el peso mayor del listado $\begin{array}{r} 200 \text{ mg de ALX} - 1000 \text{ g} \\ 20 \text{ g} \quad \quad \quad - - \quad X \end{array}$ 3. Resultado 4mg de ALX.
3. Monitoreo de la glucosa. Se monitorea el nivel de glucosa con el glucómetro semanalmente.	4. Cálculo para el total de ratones. 4.1 Total, de ratones 5. Se agrega 1 ratón extra para tener un margen de error de la preparación. 4.2 6 ratones x 4mg de ALX = 24g 5. Disolución de ALX con agua destilada Se agrega agua destilada 100 ul de agua por cada ratón a los gramos totales de ALX. 600 de agua destilada + 24g de ALX 6. Cálculo de dosis de aplicación individual. Se toman 100 ul de dosis para el ratón con el mayor peso. Para el resto de los ratones con menor peso se realiza una regla de tres. $\begin{array}{r} 20\text{g} - 100 \text{ ul ALX preparado} \\ \text{Peso del ratón} - - \quad X \end{array}$

Determinación de glucemia.

Se monitorearon los niveles de glucosa en sangre durante la etapa de crecimiento del roedor mediante el uso del glucómetro de marca Accu-chek Perfoma y tiras reactivas³³.

1. La toma de muestra de sangre para la medición de glucosa se realizó con un corte de 1 milímetro de la extremidad de la cola del ratón (Figura 10), como lo menciona la literatura (Manejo de animales de Bioterio de la UAM-1 y la NOM-062-ZOO-1999)^{32,33}.
2. Se depositó la gota de sangre en la tira reactiva, para su medición de glucosa con el glucómetro, Se registró el valor obtenido en la bitácora.



Figura 10. Toma de glucosa con tiras reactivas y glucómetro marca Accu-check

Dieta hipercalórica

Se alimentó con una dieta densamente energética a seis grupos. La dieta hipercalórica se consideró con un incremento 20.5% más calórica con respecto a la dieta estándar. La distribución de macronutrientos de la dieta hipercalórica consistió en 20% carbohidratos simples (azúcar refinada, marca zulka), 20% grasas saturadas (mantequilla Eugenia sin sal) y 60% alimento estándar (Laboratory Rodent Diet 5001). El cálculo nutrimental del alimento estándar vs dieta hipercalórica se muestran en la tabla 3. La información nutrimental del alimento sólido hipercalórico se muestra en la figura 11.

1. Se mezcló alimento estándar 600 g, mantequilla sin sal 200 g y azúcar refinada 200 g para una mezcla total de 1000 g (Tabla 2). Los ingredientes fueron pesados en una báscula digital marca TORREY MODELO L-PCR-40.
2. La mezcla se realizó comenzando por acremar la mantequilla con las manos (se usaron guantes de látex), conforme la mantequilla perdió su consistencia sólida se fue agregando el azúcar de manera paulatina, hasta que la mezcla obtuvo una consistencia homogénea.

3. El alimento estándar tiene una presentación de pellets, por lo que fue necesario pulverizarlos en una licuadora. Al obtener el alimento pulverizado se procedió a agregarlo a la mezcla de la mantequilla y azúcar previamente realizada.
4. Se formó el alimento en forma de pellets con un peso aproximado de 5 g.
5. Posteriormente se colocaron en una charola para horno previamente engrasada.
6. Se pre calentó el horno durante 10 minutos a una temperatura de 180 °C. Posteriormente se hornearon los pellets durante 5 a 10 min, hasta obtener una consistencia dura, con una cocción completa.
7. Se pusieron a enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Se pesó el total de la producción, se registró en la bitácora y se rotuló con la fecha y cantidad total en la caja de conservación (recipiente de aluminio) donde se almacenaron.

Tabla 2. Proporciones calóricas de macronutrientes de alimento hipercalórico.

Alimento	Porcentaje (%)	Energía (kcal)	Proteína (g)	Lípidos (g)	Hidratos de carbono (g)	Fibra (g)
Pellet molido (600g)	60%	2,454	183	36.61	348.13	31.8
Mantequilla (200g)	20%	1,458	1.2	160	3.4	0
Azúcar (200g)	20%	800	0	0	200	0
TOTAL:	100%	4,712	184.2	196.61	551.53	31.8

Tabla 3. Cuadro comparativo de alimento estándar y alimento hipercalórico.

ALIMENTO ESTANDAR	ALIMENTO MODIFICADO	AGUA AZUCARADA
<i>Aporte calórico (%):</i>	<i>Aporte calórico (%):</i>	<i>Aporte calórico (%):</i>
Proteínas: 29.829%	Proteínas: 15.63%	Solución al 20% (sacarosa)
Grasas: 13.427%	Grasas: 37.55%	Carbohidratos por cada 100 ml de
Carbohidratos: 56.744%	Carbohidratos: 46.82%	solución: 20g
Total de energía: 4.09 kcal/g	Total de energía: 4.09 kcal/g	Total de energía: 80 kcal

INFORMACIÓN NUTRIMENTAL	
Tamaño de la porción: 5 g	
Contenido energético	23.6 kcal
Proteínas	0.9 g
Grasa total (lípidos)	1 g
Carbohidratos (hidratos de carbono) de los cuales	2.75 g
Azúcares	1 g
Fibra dietética	0.27 g

Figura 11. Información nutrimental de alimento hipercalórico.

Medición del consumo dietético.

Se registró y evaluó el consumo de alimento de los roedores independientemente del grupo al que pertenecieran.

1. Se pesó el alimento en una báscula digital Torrey modelo L-Pcr-40 para cada grupo de ratones
2. Se registró el peso en la bitácora con la fecha correspondiente y el gramaje para cada grupo de ratones. Cada tercer día se pesaron los pellets restantes en una báscula digital.

3. Posteriormente se agregó más alimento para tres días más. Los datos se registraron en la bitácora.
4. El alimento pesado fue considerado para el número total de roedores de cada grupo. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar el promedio del consumo individual. A continuación, se muestra la presentación la elaboración de los *pellets* de 5 g (Figura 13).



Figura 12. Elaboración del alimento hipercalórico.

Medición del peso y determinación de delta cambio de peso.

Se evaluó la ganancia ponderal del cambio de peso de los roedores desde su nacimiento hasta el final del tratamiento.

1. Se pesaron los roedores en una báscula digital.
2. Se registraron los datos en la bitácora del cambio de peso de manera semanal.
3. Se calculó el cambio de peso para cada roedor empleando la ecuación Δ de cambio de peso.

$$\Delta P: \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso final}} \times 100$$

Figura 13. Fórmula para la determinación delta cambio de peso.

Extracción de sangre por punción cardiaca en roedores.

Al concluir el tratamiento dietético, se procede a la extracción de sangre mediante la técnica de punción cardiaca con la finalidad de obtener 5 ml de sangre como lo indica la literatura (Manejo de animales de Bioterio de la UAM-1 y la NOM-062-ZOO-1999)^{32,33}; para su posterior uso en la determinación de la metilación. El procedimiento se describe a continuación:

1. Se aplicó anestesia al ratón con el fármaco pentobarbital con una dosis de 12 μ l para 50 kg con jeringa de insulina. Su efecto de ocurrió a los 2 minutos aproximadamente.
2. Se colocó en decúbito dorsal sobre una superficie plana, se roció alcohol del 90% sobre el roedor para evitar contaminación de la muestra.
3. Se procedió a realizar un orificio en la cavidad abdominal con unas tijeras quirúrgicas. La disección se llevó desde el orificio en la cavidad abdominal hasta el pecho con una línea vertical. Al visualizar la caja torácica se procedió a realizar el corte (es necesario ser preciso y cuidadoso para evitar perforar el corazón). Primeramente, se corta el tejido conectivo y después se procede a cortar la caja torácica.
4. Se extrajo la sangre por punción cardiaca. Se utilizó una jeringa de insulina para ser insertada en el ventrículo izquierdo del corazón y comenzar a extraerla. La sangre

recolectada se colocó en un tubo eppendorf con heparina para evitar su coagulación. El procedimiento se repitió hasta que el corazón dejó de latir.

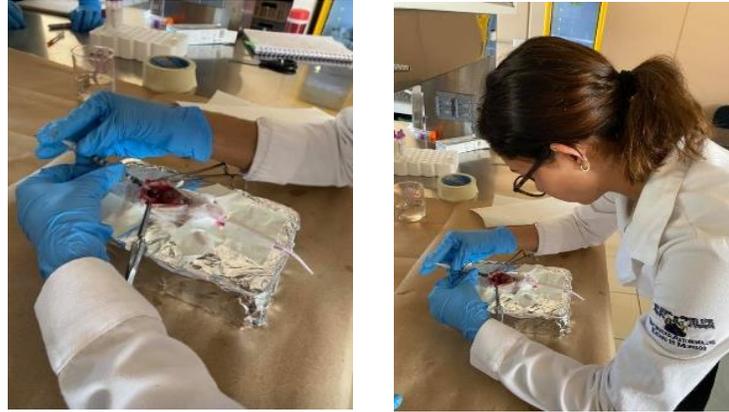


Figura 14. Extracción de sangre por punción cardiaca.

Extracción de ADN.

Los eritrocitos de la sangre extraída permiten obtener el ADN contenido dentro de los mismos; con base en la técnica descrita en la guía de procedimiento: extracción de ADN a partir de sangre periférica y médula ósea del INSN³⁴. La descripción del procedimiento fue la siguiente:

1. En un tubo de tipo falcon (ideal para la centrifugación de células), previamente rotulado se agregó 1.0 a 2.0 ml de sangre y 12 ml de buffer de lisis.
2. Se centrifugó a 6,000 rpm por minuto durante 30 minutos.
3. Se decantó el pellet y suspendió en 600 μ L de buffer de suspensión más 300 μ L de buffer de perclorato de sodio.
4. Se mezcló la muestra, oscilando a temperatura ambiente por 15 minutos. Se colocó parafilm para que la muestra esté segura de cualquier derrame.

5. Se programó la incubadora a 65 °C por 30 minutos, es necesario programarla 15 minutos antes para que comience a regular la temperatura mientras la muestra está oscilándose.
6. Se incubó la muestra por 30 minutos a 65 °C.
7. Se adicionaron 600 µL de cloroformo frío (-20 °C) y, posteriormente se mezcló por oscilación por 10 minutos.
8. Se centrifugó a 5,000 rpm por 20 minutos.
9. Se tomaron 400 o 600 µL de la fase acuosa de la muestra para la obtención del plasma y se transfirieron a un tubo eppendorf (ideal para el análisis de muestras de volumen pequeño), posteriormente se agregaron 400 o 600 µL de etanol al 100% (la proporción es 1:1). Este paso se repitió para obtener dos muestras.
10. En este paso las hebras de ADN visibles, por lo cual, se transfieren a un tubo eppendorf con 300 µL de etanol al 75% (Figura 15). De lo contrario se mantiene el ADN no visible en el mismo tubo y se congela para su posterior tratamiento.



Figura 15. ADN extraído.

Tratamiento del ADN con bisulfito.

Análisis de metilación del gen GLUT4 mediante la técnica de PCR (reacción de cadena en polimerasa) in vitro con el Kit EZ DNA Metilación TM. (Zymo Research, número de catálogo: D5001, número de lote: ZRC205288). El procedimiento se describe a continuación:

1. La muestra debió contener 500 pg - 2 μ L de ADN. El ADN de entrada debe ser de 200-500 μ l (previamente analizado en el Nanodrop)
2. Se realizó la preparación de los reactivos sólidos para el tratamiento como se describe en el anexo 1.
3. Se agregaron 5 μ l de buffer de dilución *M-Wash* a la muestra de ADN de 2 μ L con un ajuste de volumen de 50 μ l con agua. Se mezcló la muestra con movimiento de agitación rápidos o pipeteando de arriba hacia abajo.
4. Se incubó la muestra a 37 °C durante 15 minutos (precalentar la incubadora 20 minutos antes, para alcanzar la temperatura indicada).
5. Se agregaron 100 μ L del reactivo de conversión *CT- Conversion Reagent* ya preparado, a cada muestra y mezcló.
6. Se incubó la muestra en baño maría a 50 °C durante 12-16 horas.
7. Se incubó la muestra de 0-4 °C durante 10 minutos. Nota: Las muestras se pueden conservar hasta 4 °C durante 20 horas.
8. Se agregaron 400 μ L de *buffer de unión M* a una columna zymo spin y se colocó en un tubo de recolección provisto.
9. Se cargó la muestra (del paso 5) en la columna zymo spin, se cerró la muestra y se mezcló.

10. Se centrifugó a máxima velocidad 15,000 RPM por 30 segundos. Al salir de la centrifugadora, se decantó la muestra.
11. Se añadieron 100 μ L de *buffer de m-desulfonación*. Después de la incubación se centrifugó al máximo (15,000 RPM por 30 segundos), y se decantó la muestra.
12. Se añadieron 200 μ L de *buffer de m-desulfonación* a la columna y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.
13. Se añadieron 200 μ L de *buffer de m-desulfonación* a la columna. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Se agregaron otros 200 μ L de *buffer de m-desulfonación* y se centrifugó durante 30 segundos.
14. Se desechó la columna y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5ml. Se añadieron 10 μ L de *buffer de elución* y se centrifugó durante 30 segundos a 10,000 RPM.

Reacción de cadena en polimerasa (PCR) punto final.

Se diseñaron los *primers* para GLUT4 mediante el programa Methyl Primer Express Software V1.0. La presentación de los primers es en polvo, por lo que se preparará con una dilución de agua inyectable y se guarda como *stock* a -20°C en el ultra congelador para su posterior uso en la PCR. La dilución de los primers se realizó con el siguiente calculo: Se rotularon los tubos eppendorf de 1.5 ml con su respectivo nombre de muestra.

1. Se rotularon con el nombre de las muestras de ADN en tubos *eppendorf* de 0.2 ml antes de procesar la muestra.
2. Se preparó la mezcla master mix y se agregó la muestra de ADN a la mezcla la campana para PCR (Tabla 4 y 5).

3. Se procesaron las muestras en el termociclador descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de reactivos para la PCR punto final y temperaturas tratadas en el termociclador.

Condiciones Master Mix	Muestra 13 Junio 2021	Muestra 16 Junio 2021	Muestra 21 Julio 2021	Muestra 28 Julio 2021	Muestra 20 Agosto 2021	Muestra 02 Septiembre 2021	Muestra 27 Septiembre 2021	Muestra 09 Octubre 2021
Buffer 10x PCR	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
DNTP'S	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
Oligo FWR	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
Oligo RVS	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
MgCl2	0.4 µl	0.3 µl	0.6 µl	0.6 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.4 µl	0.4 µl
H2O	6.5 µl	6.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	4.5 µl	4.5 µl
Taq Pol	0.1 µl	0.1 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.1 µl	0.1 µl
DNA	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
Ciclos	40	42	42	42	42	42	42	42
Desnaturalización inicial	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C				
Desnaturalización	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C				
Alineamiento	40 segundos a 54°C	40 segundos a 51°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 51-53°C	40 segundos A) 53°C B) 56°C C) 58°C	40 segundos A) 53°C B) 56°C
Extensión	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C				
Extensión Final	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C				

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para GLUT4 de roedor.

GEN	PRIMER SECUENCIA 5'-3'
GEN	Methylated Forward
GLUT4	5' TCGATTTGTTGGAAATTCG 3'
	Methylated Reverse
	5' ATCTCGTACCGACCAAACC 3'
	Unmethylated Forward
	5' GAGTTGATTTGTTGGAAATTTG 3'
	Unmethylated Reverse
	5' AAATCTCATACCAACCAAACCC 3'

Electroforesis de gel de agarosa para GLUT4.

Se realizó la preparación de los geles de agarosa para procesar las muestras previamente realizadas en la PCR en el gel de agarosa. El procedimiento se describe a continuación:

1. La preparación del gel de agarosa al 3% consistió en una mezcla de 1.5 g de agarosa con 50 ml de TBE 1% en un matraz, posteriormente se metió al microondas 3 minutos aproximadamente para que la solución obtuviera una consistencia líquida, homogénea y cristalina.
2. La mezcla se vertió en la cámara para permitir la gelificación del gel; dejándola enfriar durante 5 minutos.
3. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis con solución de TBE 1% hasta llenar la cámara.
4. Se cargó 1 μ L de marcador invintrogen 100 pb en el pocillo del gel de agarosa.
5. Se cargaron las muestras de la PCR. La muestra de la PCR se mezcló con un 1 μ L aproximadamente de marcador de ADN de 2.5 μ L. El marcador se colocó sobre parafilm y se agregó la muestra de PCR, se tomó nuevamente con la micropipeta y se depositó sobre el pocillo del gel. Este paso se repitió con todas las muestras a procesar.
6. La cámara se cerró, y se conectaron los electrodos correctamente, se programó con los valores descritos en la tabla 7.
7. Al terminar el tiempo del proceso de la cámara se retiró la muestra, y se llevó a un recipiente con bromuro de etidio. Al finalizar el tiempo, se retiró la muestra para tomar

la fotografía de los geles. Se desecharon los geles tratados en una caja de tratamiento de residuos.

Tabla 6. Condiciones tratadas para electroforesis para gen GLUT4 de roedor.

<i>Electroforesis</i>	<i>Muestra 13 Junio 2021</i>	<i>Muestra 16 Junio 2021</i>	<i>Muestra 21 Julio 2021</i>	<i>Muestra 28 Julio 2021</i>	<i>Muestra 20 Agosto 2021</i>	<i>Muestra 02 Septiembre 2021</i>	<i>Muestra 27 Septiembre 2021</i>	<i>Muestra 09 Octubre 2021</i>
<i>Voltaje 1</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Voltaje 2</i>	400	400	400	400	400	400	400	400
<i>Tiempo</i>	20	20	25	20	20	25	25	25
<i>Tiempo en el bromuro (tinción del gel)</i>	30 minutos	30 minutos	40 minutos	50 minutos	35 minutos	30 minutos	45 minutos	40 minutos

D) DESARROLLO DEL PROYECTO

1. Se obtuvo un modelo murino para DMT2 con estado de la glucemia >200 mg/dl derivado de una inducción química mediante la administración del fármaco Aloxano (ALX).
2. Se administraron 200 mg/kg de peso de ALX a cada uno de los ratones.
3. Se monitoreo el estado de glucemia durante varias semanas, hasta tener el registro constante de una glucosa > 200mg/dl como indicador de diabetes.
4. Se realizaron agrupaciones de los roedores: grupos de controles (sanos) grupos de hiperglucemia.
5. Se sometieron a un tratamiento dietético que consto de: 1) dieta solida hipercalórica y agua azucarada; 2) dieta solida estándar y agua azucarada; 3) dieta solida estándar y agua azucarada; y 4) dieta estándar y agua purificada.

6. Se realizaron diferentes cruza: 1) hembra sana con macho diabético; 2) hembra sana con macho sano (no se logró la crusa de hembras diabéticas porque todas las hembras sometidas a DMT2 con ALX revirtieron sus estados de hiperglucemia a una glucemia normal)
7. Se realizaron nuevas agrupaciones de las crías con base en diferentes dietas: 1) dieta solida hipercalórica y agua azucarada; 2) dieta solida estándar y agua azucarada; 3) dieta solida estándar y agua azucarada; y 4) dieta estándar y agua purificada.
8. Al terminar el tratamiento dietético >3 meses, se realizó la extracción de sangre mediante la técnica de punción cardiaca. Las muestras se depositaron en tubos *ependorf* y se congelaron en el ultra congelador.
9. Se almacenaron órganos como el intestino delgado, músculo e hígado para su preservación en el ultra congelador; para su posterior análisis en nuevas investigaciones.
10. Se realizó la extracción del ADN mediante el protocolo de extracción del Kit EZ DNA Metilación TM. (Investigación Zymo). Las muestras de ADN tuvieron una verificación de pureza en un Nanodrop.
11. Se elaboraron geles de agarosa para la realización de electroforesis y PCR para cada una de las muestras. Se tomaron fotografías de los geles como evidencia.
12. Se registró el resultado del estado de metilación de cada una de las muestras obtenidas.

E) DISEÑO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis estadístico descriptivo a través del análisis de datos con respecto a su variabilidad (media de desviaciones al cuadrado). Técnicas utilizadas: análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y *pos hoc* de Tukey.

6. RESULTADOS.

Niveles de glucosa y cambio en el peso de los diferentes grupos para el análisis del efecto de la dieta.

La figura 16 presenta los niveles de glucosa sérica a través del tiempo para los diferentes tratamientos nutricionales. Se observa un incremento no significativo ($p < 0.2955$), por la prueba de ANOVA con un nivel de confianza 95%, para todos los grupos de tratamiento. Se destaca al inicio del tratamiento valores que oscilan entre 139 mg/dl y 143 mg/dl de glucosa sérica en los grupos de tratamiento hipercalórico; valores glucémicos por arriba de lo normal para roedores (91.88 mg/dl de glucosa sérica). Además, es importante mencionar que específicamente para los tratamientos hipercalóricos de dieta hipercalórica con agua normal (DH + AN) y dieta normal con agua azucarada (DN + AA) existen incrementos y descensos en los niveles de glucosa significativos y constantes, denotando vulnerabilidad en la variación de su regulación a través del tiempo.

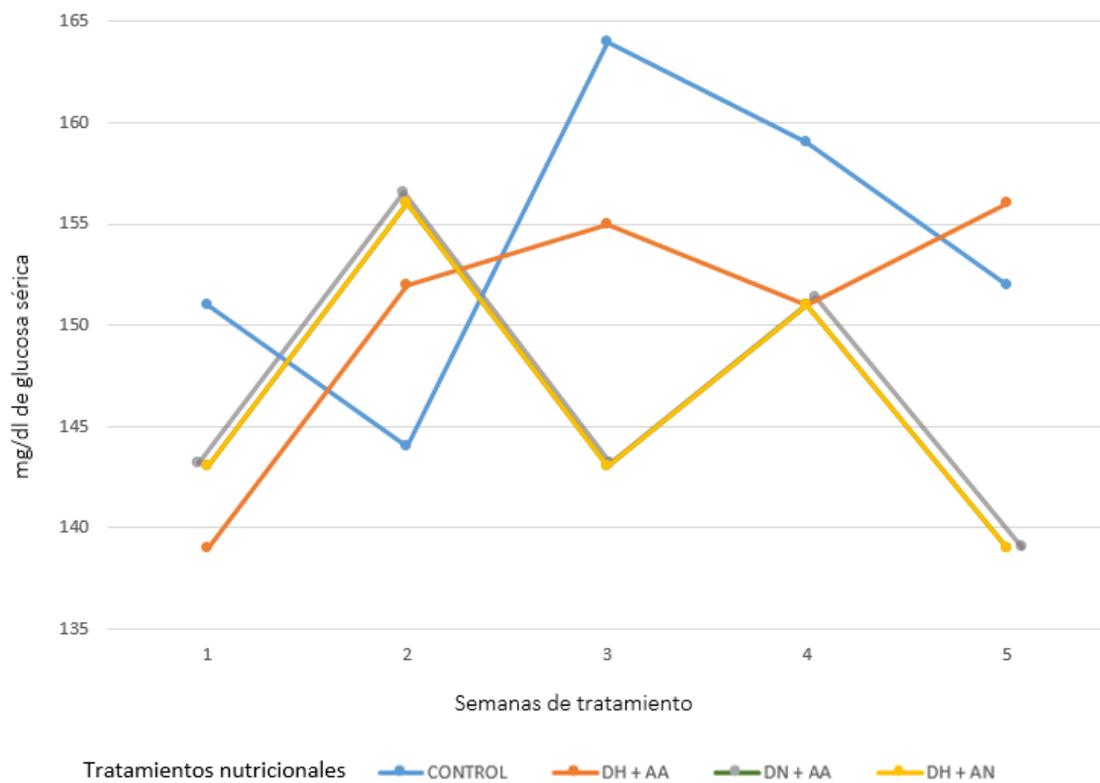


Figura 16. Mediciones de niveles de glucosa sérica durante el tratamiento dietético.

No se obtuvieron valores estadísticamente significativos para los niveles de glucosa con respecto a los diferentes tratamientos dietéticos por ANOVA y *pos hoc* de Tukey.

DH (Dieta hipercalórica), **AN** (Agua normal), **DN** (Dieta normal), y **AA** (Agua azucarada)

Por otro lado, el cambio de peso resulta significativo para todos los grupos de tratamiento nutricional hipercalórico a partir de la primera semana ($p < 0.0033$), el porcentaje de aumento de peso al final del tratamiento hipercalórico para cada grupo fue el siguiente: DN + AA aumento de 18.64%, el grupo DH + AA aumento de 31.4% y el grupo DH + AN aumento de 33.19%, mientras que grupo control obtuvo incremento final del 50%. Sin embargo, existe una diferencia mayor significativa del peso inicial de los grupos de progenie con padre con diabetes y madre sometida a dieta hipercalórica con respecto al grupo control como se muestra en las figuras 17 y 18.

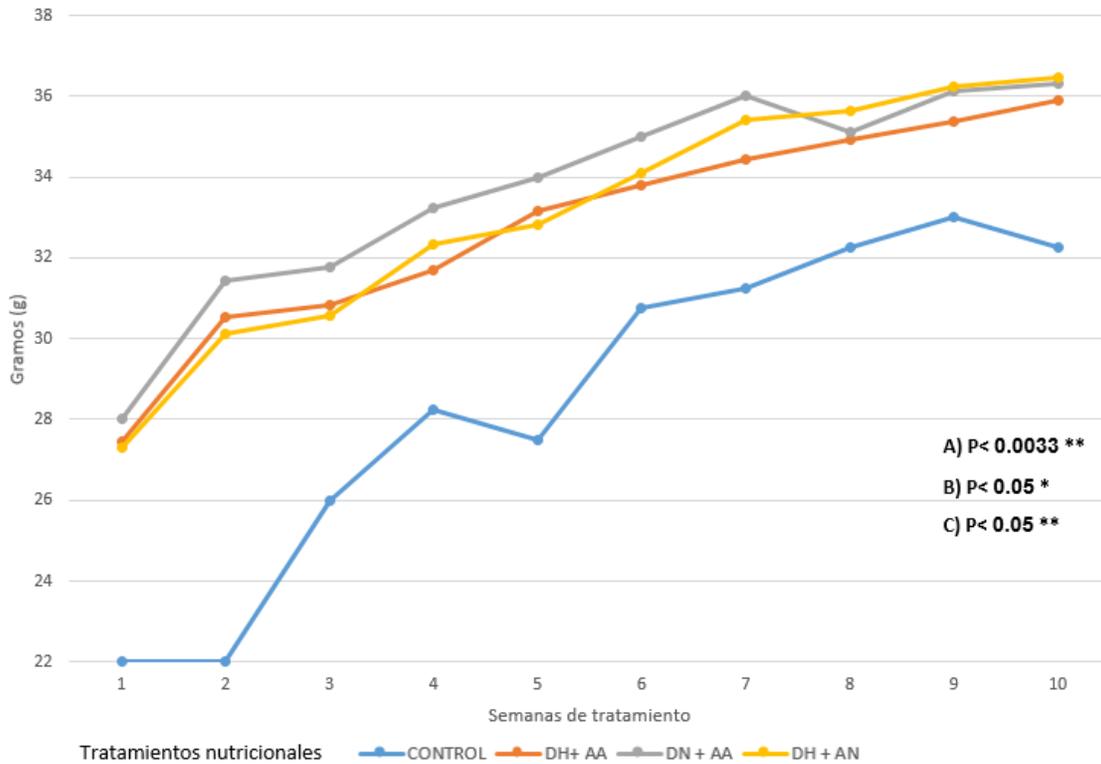


Figura 17. Cambio de peso corporal durante las semanas de estudio en ratones CD1.

El tratamiento dietético consistió en una dieta control (n=8), dieta hipercalórica con agua azucarada (DH + AA, n=19), dieta normal con agua azucarada (DN + AA, n= 18), dieta hipercalórica con agua normal (DN + AN, n= 17). El cálculo de ANOVA de una sola vía indicó que los cambios en el peso con respecto al tratamiento dietético, resultó estadísticamente significativo A) ($p < 0.003$) durante el transcurso de las semanas de tratamiento. El *post hoc* de Tukey resultó significativo para el contraste de los grupos B) **Control vs DH + AA** ($p < 0.05$), y C) **Control vs DN + AA** ($p < 0.05$). Los valores son medias con errores estándar del 5%

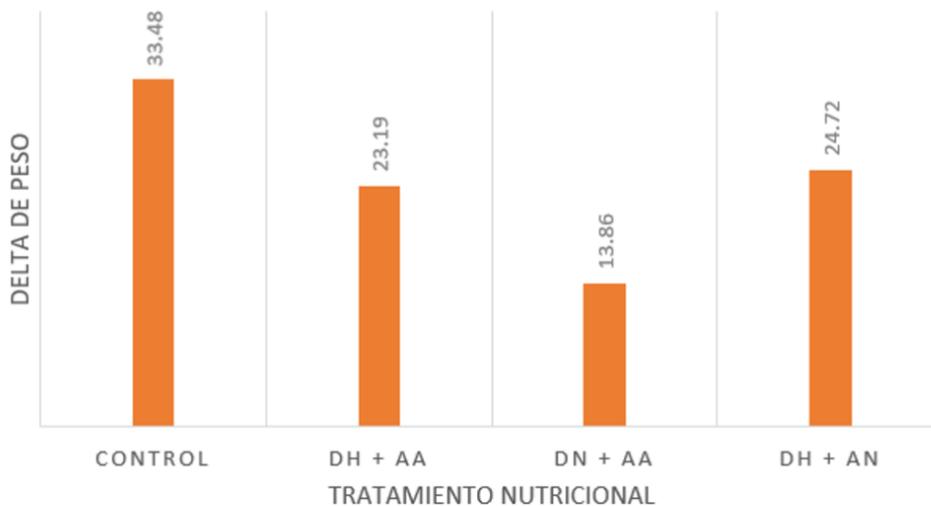


Figura 18. Delta de cambio de peso promedio final.

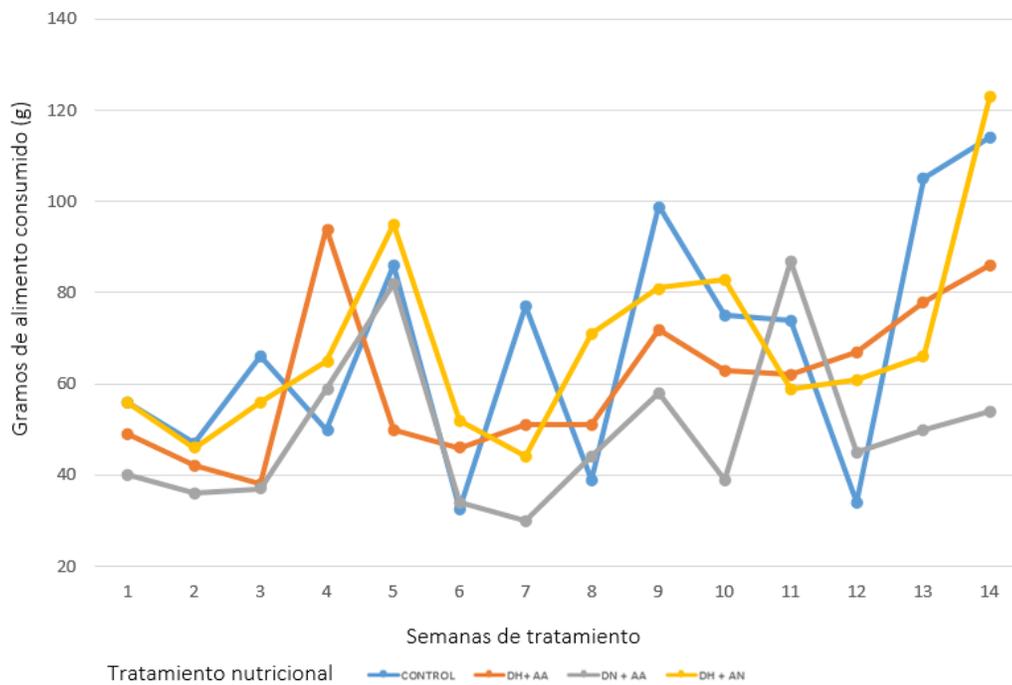
Los diferentes tratamientos dietéticos vs grupo control no indicaron ser estadísticamente significativos mediante la prueba del ANOVA de una sola vía ($p < 0.2955$), de igual manera el *post hoc* de Tukey no demostró ser significativo.

DH (Dieta hipercalórica), AN (Agua normal), DN (Dieta normal), y AA (Agua azucarada)

Evaluación del efecto del tratamiento nutricional hipercalórico.

El consumo de la dieta hipercalórica se cuantificó en gramos y mililitros. En la figura 19 se observa, la preferencia por el consumo de agua azucarada a diferencia del consumo del alimento sólido hipercalórico y control (dieta estándar). De igual manera, se destaca dentro de los tratamientos hipercalóricos, la preferencia del agua azucarada con respecto al alimento sólido; estadísticamente resulta mayormente significativo ($p < 0.0001$). Los resultados estadísticos muestran un valor significativo para el contraste entre todos los tratamientos hipercalóricos con agua azucarada por la prueba *post hoc* de Tukey, los resultados se muestran en la figura 19, B).

A



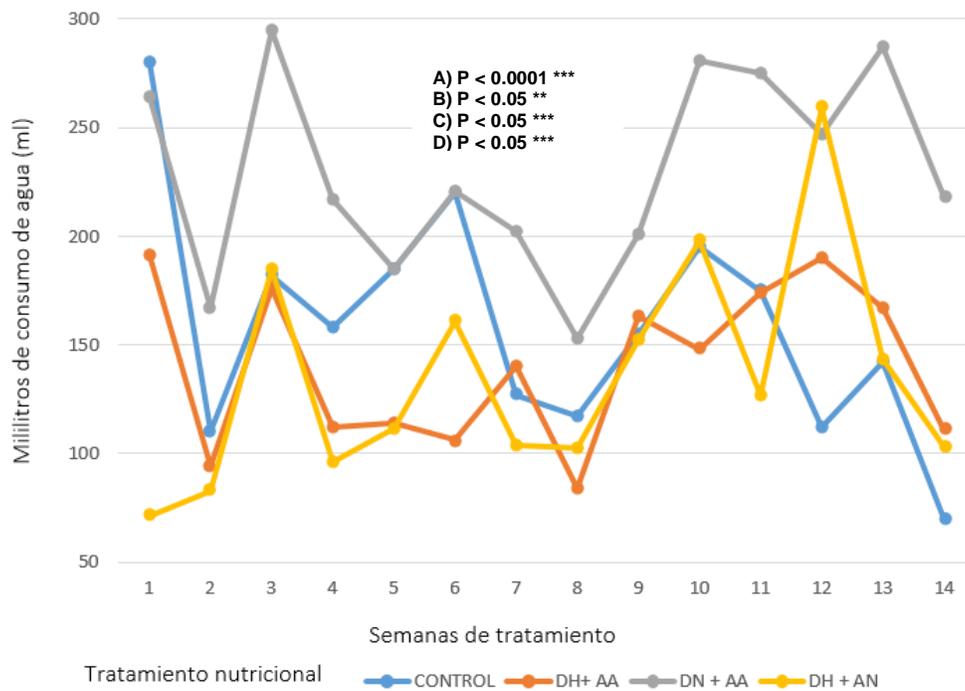
B

Figura 19. Medición del consumo de los diferentes tratamientos dietéticos por grupo.

A) El consumo del alimento sólido no demostró resultados estadísticamente significativos ($p < 0.2955$) por la prueba de ANOVA para todos los grupos. El consumo de agua azucarada resultó estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) por la prueba de ANOVA. El post hoc de Tukey resultó significativo para el contraste de los siguientes grupos: **B) Control vs DN + AA** ($p < 0.05$), **C) DH + AA vs DN + AA** ($p < 0.05$) y **D) DN + AA vs DH + AN** ($p < 0.05$). Los valores son medias con errores estándar del 5%
DH (Dieta hipercalórica), **AN** (Agua normal), **DN** (Dieta normal), y **AA** (Agua azucarada)

Determinación del estado metilado del gen GLUT4 de roedor en los grupos experimentales mediante PCR punto final.

El proceso de determinación del estado metilado del gen GLUT4 para roedor se realizó mediante el estudio de reacción en cadena de polimerasa convencional (punto final). Después de 5 meses de estandarización, la determinación de condiciones específicas para la PCR para el gen GLUT4 de roedor (no se encuentran descrita en la literatura), al igual, que su secuencia de oligonucleótidos, es decir, se trabajó en la estandarización de su diseño y condiciones. Finalmente, no se logró determinar las condiciones exactas

necesarias para lograr la evaluación del gen GLUT4. A continuación, en las tablas 6 y 7 se muestran las especificaciones para de las condiciones implementadas en el proyecto.

Tabla 7. Condiciones implementadas para la PCR del gen GLUT4 de roedor.

Condiciones Master Mix	Muestra 13 Junio 2021	Muestra 16 Junio 2021	Muestra 21 Julio 2021	Muestra 28 Julio 2021	Muestra 20 Agosto 2021	Muestra 02 Septiembre 2021	Muestra 27 Septiembre 2021	Muestra 09 Octubre 2021
<i>Buffer 10x PCR</i>	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>DNTP'S</i>	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>Oligo FWR</i>	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>Oligo RVS</i>	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>MgCl2</i>	0.4 µl	0.3 µl	0.6 µl	0.6 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.4 µl	0.4 µl
<i>H2O</i>	6.5 µl	6.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	4.5 µl	4.5 µl
<i>Taq Pol</i>	0.1 µl	0.1 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.1 µl	0.1 µl
<i>DNA</i>	1 µl	1 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
<i>Ciclos</i>	40	42	42	42	42	42	42	42
<i>Desnaturalización inicial</i>	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C	5 minutos a 95 °C				
<i>Desnaturalización</i>	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C	30 segundos a 95°C				
<i>Alineamiento</i>	40 segundos a 54°C	40 segundos a 51°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 53°C	40 segundos a 51-53°C	40 segundos A) 53°C B) 56°C C) 58°C	40 segundos A) 53°C B) 56°C
<i>Extensión</i>	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C	40 segundos a 72 °C				
<i>Extensión Final</i>	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C	10 minutos a 72°C				

Tabla 8. Condiciones implementadas para electroforesis del gen GLUT4 de roedor.

Electroforesis	Muestra 13 Junio 2021	Muestra 16 Junio 2021	Muestra 21 Julio 2021	Muestra 28 Julio 2021	Muestra 20 Agosto 2021	Muestra 02 Septiembre 2021	Muestra 27 Septiembre 2021	Muestra 09 Octubre 2021
Voltaje 1	100	100	100	100	100	100	100	100
Voltaje 2	400	400	400	400	400	400	400	400
Tiempo	20	20	25	20	20	25	25	25
Tiempo en el bromuro (tinción del gel)	30 minutos	30 minutos	40 minutos	50 minutos	35 minutos	30 minutos	45 minutos	40 minutos

Evaluación del estado epigenético del gen GLUT4 de un modelo murino de DMT2 transgeneracional con dieta hipercalórica.

La siguiente tabla presenta la descripción de las condiciones de amplificación y secuencia de oligonucleótidos para las muestras obtenidas (Figura 20 y 21):

Tabla 9. Secuencias de los oligonucleótidos metilados y sus condiciones de amplificación para la PCR del gen GLUT4 de roedor para los geles amplificadas.

GEN GLUT4	Methylated Forward			Inicio: 5 minutos a 95 °C	
	5' TCGATTGTTGGAAATTCG 3'				
	Methylated Reverse		299 pb	Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C	42
1AM	5' ATCTCGTACCGACCAAACC 3'			Alineamiento: 40 segundos a 58 °C	
	Metilado	Unmethylated Forward			
	5' GAGTTGATTGTTGGAAATTTG 3'			Extensión: 40 segundos a 72 °C	
	Unmethylated Reverse			Elongación final: 10 minutos a 72 °C	
	5' AAATCTCATACCAACCAAACCC 3'				

GEN Y MUESTRA	ESTADO	PRIMER SECUENCIA 5'-3'	LONGITUD PB	CONDICIONES DEL PCR	CICLOS
GEN GLUT4		Methylated Forward		Inicio: 5 minutos a 95 °C	
		5' TCGATTGTTGGAAATTCG 3'			
		Methylated Reverse		Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C	
4VAM	Metilado	5' ATCTCGTACCGACCAAACC 3'	132 pb	Alineamiento: 40 segundos a 56 °C	42
		Unmethylated Forward			
		5' GAGTTGATTGTTGGAAATTTG 3'		Extensión: 40 segundos a 72 °C	
		Unmethylated Reverse			
		5' AAATCTCATACCAACCAAACCC 3'		Elongación final: 10 minutos a 72 °C	

Se presentan los resultados obtenidos de los geles de agarosa para las muestras:

En la figura 20, se observa una muestra obtenida de una cría hembra con progenitores control e inducción a dieta normal con agua azucarada; en el gel se observa la corrida electroforética en el carril 6, en la región del gel que corresponde a 132 pb de acuerdo al marcador usado (carril M), esto para *el estado metilado* como se muestra a continuación. Este resultado podría indicar la presencia del estado metilado del gen en esta muestra, sin embargo, no se alcanzaron las condiciones ideales para poder determinarlo.

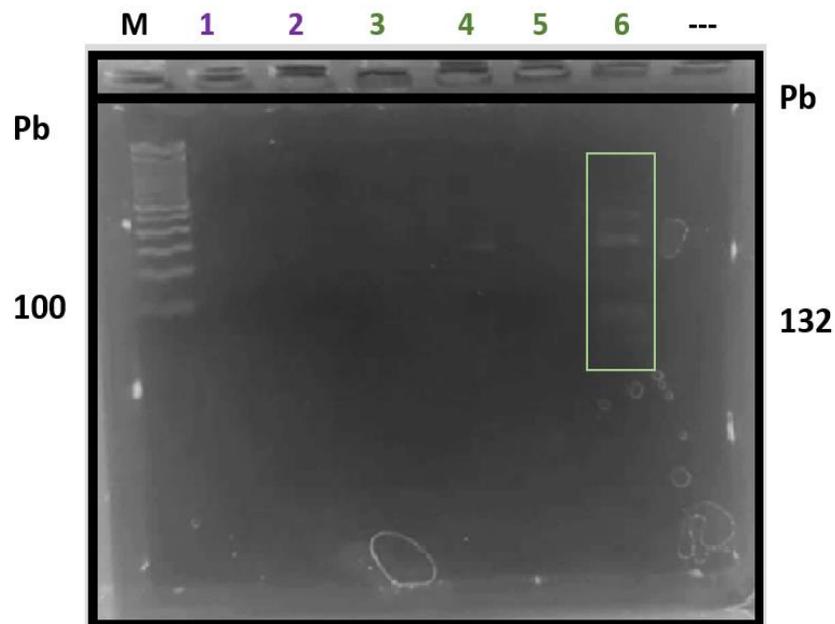


Figura 20. Amplificación de la muestra 4AM estado metilado.

Muestras de los tratamientos: Dieta normal + agua azucarada (**DN + AA**) y control no metilado y metilado.

Pocillos: 1. Marcador (M) 100 pb; 2. Control no metilado; 3. Control metilado. 3. Muestras del tratamiento **DN + AA**, no metilado; 4. Muestra del tratamiento **DN + AA**, metilado; 5. Muestra del tratamiento **DN + AA**, no metilado y 6. Muestra del tratamiento **DN + AA**, metilado.

Condiciones para la PCR y electroforesis descritas en la tabla 8.

Al realizar diferentes modificaciones en las condiciones de procesamiento de las muestras (tabla 8 y 9), cuando se procesaron muestras de manera aleatoria, se pudo observar por ejemplo en el carril 3 (cría macho con progenitores control e inducción a una dieta normal con agua azucarada); que la tinción se muestra en 299 pb para el estado metilado. Resultado que es diferente al previamente obtenido y que fue indicativo de que aun no se conseguían las condiciones específicas para procesar el resto de las muestras.



Figura 21. Amplificación de la muestra 1AM estado metilado.

Muestras de los tratamientos: Dieta normal + agua azucarada (**DN + AA**), dieta hipercalórica + agua azucarada (**DH + AA**) y control no metilado y metilado.

Pocillos: 1. Marcador (**M**) 100 pb; 2. Control no metilado; 3. Control metilado. 3. Muestras del tratamiento **DN + AA**, metilado; 4. Muestra del tratamiento **DN + AA**, no metilado; 5. Muestra del tratamiento **DH + AA**, metilado y 6. Muestra del tratamiento **DH + AA**, no metilado.

Condiciones para la PCR y electroforesis descritas en la tabla 8.

Debido al tiempo transcurrido y las problemáticas derivadas de la pandemia ocasionada por COVID-19 no fue posible continuar con la estandarización de las condiciones para la determinación del estado metilado del gen en este proyecto.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Modelo murino de DMT2 transgeneracional.

Se realizó un modelo murino transgeneracional de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), en dos fases. La primera fase consistió en la inducción química de DMT2 a los progenitores, mediante la administración del agente químico aloxano conocido por ejercer un efecto citotóxico en las células β pancreáticas, provocando el aumento de la concentración de Ca^{++} y ROS en las células, generando una lesión pancreática y condiciones de hiperglucemia²³. Se monitorearon los signos semejantes a los que ocurren en el paciente con diabetes durante su etapa crónica; como la hiperglucemia, para el caso de roedores se debe obtener un valor de > 200 mg/dl de glucosa sérica^{10, 23}. La tendencia del comportamiento de la glucosa sérica a través del tiempo puede ser reversible, regresando a los valores normales, como mecanismo de autorregulación metabólica²³, en el caso de la progenitora (ratón hembra) se realizaron reinducciones durante tres semanas; en todas las reinducciones hubo reversión del estado hiperglicémico a valores normales. Se reportan mejores resultados en un estudio de modelo de síndrome metabólico en ratones CD1 inducido a dieta hipercalórica, para el género masculino en cuanto a la inducción de diabetes con ALX a diferencia del género femenino por cambios hormonales³⁴. Posteriormente se implementó la inducción a los diferentes tratamientos dietéticos hipercalóricos en los progenitores, y a su vez, se realizó la cruce de los mismos.

El modelo dietético hipercalórico fue empleado como análogo para el desarrollo de signos y/o síntomas característicos de la DMT2 como la obesidad y el síndrome metabólico, procesos que ocurren previo a la expresión de la enfermedad^{28,31}, mismos que lograron obtenerse en este estudio y por primera vez en este grupo de trabajo. La obesidad

materna afecta y la sobrenutrición gestacional de los roedores ejerce un efecto negativo sobre el peso de descendencia, aumentando la proporción de grasa corporal, aumentando el riesgo de obesidad durante las primeras etapas de la vida²³.

Los mecanismos anormales asociados a los efectos de la dieta hipercalórica de la madre se desarrollan durante la programación fetal como por ejemplo perfil metabólico periférico y/o central y mecanismos epigenéticos alterados en la descendencia²³.

La segunda fase consistió en la inducción de los diferentes tratamientos nutricionales hipercalóricos en las crías de acuerdo a su agrupación durante un periodo de 14 semanas, con un monitoreo semanal el consumo de alimento sólido y líquido hipercalórico (*ab libitum*), cambio de peso y niveles de glucosa sérica. La propuesta del modelo desarrollado en el presente trabajo reproduce dichos criterios reportados en los diferentes estudios de modelos experimentales como lo reporta Bake *et. al*; en su estudio de ratas wistar alimentadas con una dieta alta en grasa a, con régimen *ad libitum*. Criterios que imitan el comportamiento alimentario humano, una dieta más palatable y apetitosa sin restricciones y como resultado, una mayor ganancia de peso, mayor proporción de tejido adiposo y el desarrollo del sobrepeso y/o obesidad ²⁸. La implementación exitosa de ambas fases, nos llevaron a estandarizar un modelo de diabetes transgeneracional de manera exitosa y combinando 2 metodologías complementarias.

Otro estudio de Cruz *et al.*, 2022 reporta el uso de ratones CD1 para un modelo de síndrome metabólico en ratones inducido con una dieta hipercalórica, la dieta hipercalórica implementada contiene una densidad energética de 4.81 kcal/g,

correspondientes a 17.3 % de proteína, 21.2 % de grasas y 48.5 % de hidratos de carbono, se le adicionaron vitaminas y minerales para complementar la dieta³⁴. Valores nutricionales similares a la dieta hipercalórica del presente estudio: densidad energética de 4.09 Kcal/g, correspondientes a 15.63 % de proteína, 37.55 % de grasas y 48.62 % de hidratos de carbono. Además, se menciona que cepas como rata Sprawe Dawly, ratón C56BL6/J más susceptibles a la inducción de obesidad y síndrome metabólico, sin embargo, la elección de la cepa de ratones CD1 al igual que en el presente estudio fue tomada con base en el modelo de menor costo,²³ es decir se maximizaron los beneficios de usar este modelo.

Los ingredientes para el diseño de la dieta hipercalórica: mantequilla sin sal, azúcar refinada y alimento estándar (pellet), más el agua azucarada; se asemeja al diseño de uno de los tratamientos implementados en el estudio de Grzęda *et al.*, 2022, donde la dieta HFHSD (dieta alta en azúcar y grasas), aunado al uso del fármaco estreptozotocina (STZ) resultan como factores estresantes que imitan la patología de DMT2²³. La ventaja de la preparación realizada en este estudio es que se usó como base alimento estándar pulverizado e ingredientes de bajo costo, que fueron reintegrados en un pellet que los ratones aceptaron consumir.

Por lo tanto, el modelo de diabetes transgeneracional contempla la inducción a DMT2 a través del fármaco ALX, primera etapa que a su vez conlleva una dieta hipercalórica para los progenitores. La inducción positiva a DMT2 del padre y la sobrenutrición materna resulta en un ambiente intrauterino negativo para la progenie, variables que promueven la alteración de mecanismo epigenéticos relacionados el metabolismo de glucosa y el

desarrollo de obesidad, síndrome metabólico y posteriormente el desarrollo de DMT2 para la progenie. Destacando que en la segunda fase; desde los primeros días de vida de la progenie (una etapa crucial para el correcto desarrollo), se promovió una dieta hipercalórica, asemejando un mal hábito nutricional y el posterior desarrollo de un aumento de peso, lo que promueve la alteración metabólica de la glucosa y el desajuste de la cascada de señalización para la misma. Afectando el estado de salud de la progenie y la susceptibilidad de desarrollar enfermedades crónico degenerativas como la DMT2.

Cambio en el peso y medición de glucosa de los diferentes grupos con respecto al efecto de la dieta.

El cambio de peso a través del tiempo se consideró estadísticamente significativo ($P < 0,0033$) mediante la prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%, para todos los grupos. El *post-hoc* mostró significancia estadística para los siguientes grupos: Control vs DN + AA ($p < 0.05$); DH + AA vs DN + AA ($p < 0.05$), y DN + AA vs DH + AN ($p < 0.05$). Por lo tanto, el agua azucarada es la variable que ejerce un mayor impacto en el aumento de peso con respecto al tiempo. La adición de azúcar refinada (sacarosa) en el agua de consumo otorga la simulación a la tendencia del consumo de bebidas azucarada en la población, destacando la elección de la forma de consumo de un tipo de carbohidrato en específico^{28,31}. A su vez, prolongando el desarrollo de un aumento de peso y con ello, el desarrollo del síndrome metabólico a través del tiempo^{28,30}.

La solución de sacarosa promueve un balance energético positivo; mientras que el consumo de los carbohidratos de forma sólida tiene la posibilidad de una compensación

metabólica, manteniendo la correcta respuesta secretora del páncreas (sensibilidad a la insulina), como una acción homeostática del cuerpo. Otra característica importante a destacar entre la diferencia de la ingesta de un alimento sólido con respecto a un alimento líquido es un factor hormonal como una respuesta de acción de la hormona leptina que desencadena una señal de saciedad evitando el posible consumo excesivo del alimento sólido^{28,29}.

La DM2 se diagnostica por la presencia de los signos y síntomas clásicos, glucemia elevada en ayunas y/o curva de tolerancia a la glucosa alterada. En pacientes con sintomatología de diabetes la ADA especifica que sólo se necesita una glicemia mayor a 126 mg/dl en ayuno de 8 horas, o > 200 mg/dl de forma aleatoria para su confirmación.

La hiperglucemia se genera porque el hígado aumenta la producción de glucosa, y las células β del páncreas incrementan la producción de insulina para regular la glucemia introduciéndola a los tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo, sin embargo, al presentarse la resistencia a la hormona persiste la hiperglucemia y la hiperinsulinemia (Cruz et al., 2022)³⁴. De acuerdo con los resultados obtenidos los niveles de glucosa sérica en el presente estudio, no se presenta significancia estadística (**P < 0.2955**), mediante del análisis de varianza de una sola vía. En animales neonatos el páncreas tiene la capacidad de regenerar y/o diferenciar parcialmente la población celular lo que resulta en homeorresis (tendencia a la estabilidad), sin embargo, la glucotoxicidad y lipotoxicidad siguen presentes causando daño¹⁵.

Sin embargo, se destaca la importancia de mantener la toma de mediciones por un tiempo más prolongado, mayor a 10 semanas como lo reporta Escalona *et al.*, 2021 en donde encontraron alteraciones metabólicas con dietas hipercalóricas en modelos experimentales ²⁸. También se puede prolongar el tratamiento hasta las 16 semanas como lo reporta en el artículo de Wong, 2016, modelos animales experimentales: una revisión, en la sección dietas enriquecidas en sacarosa y grasa ³¹.

Análisis del estado metilado del gen GLUT4.

El análisis epigenético se realizó mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional. Hasta el momento no se encuentra reportado el análisis y/o diseño de primers para el gen GLUT4 (*Slc2a4*) para la cepa CD1 en la literatura. Por lo cual, se realizó el diseño de los primers específicos para este gen. El genoma de ratón para GLUT4 fue identificado en el programa Genome Browser de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se introdujo la secuencia obtenida en el programa Methyl Primer Express Software V1.0 de este modo se obtuvo la región con más sitios de CpG y se codificó la secuencia de los cebadores para GLUT4. Los resultados de la PCR no arrojaron el estado de metilación para la sección estudiada de la isla CpG para la mayoría de las muestras. Se encontró una amplificación del gen GLUT4 para dos muestras únicamente. Las muestras observadas en la figura 20 y 21, se tiñeron para el estado no metilado del gen. Por lo que se concluye un avance en las posibles condiciones de la PCR para las muestras reportadas, del 27 de septiembre del 2021. Se destaca que en análisis y diseño de primers para el gen GLUT4 en roedor fueron

diseñados por primera vez, ya que no se encuentra información para ratón al respecto en la literatura. El diseño tomó en cuenta los siguientes criterios:

1. Longitud mayor a 100 (por cuestiones de visualización en el fotodocumentador).
2. Tm mayor a 60 °C con una diferencia no mayor a 3 °C entre los primers forward y reverse
3. Buscar obtener el mayor número de sitios CpG dentro de la región.
4. Buscar evidencia acerca de una región diferente de la isla para su análisis (se seleccionó la secuencia de la región central para el proyecto transgeneracional).

Tratamiento dietético administrado en la descendencia y su relación con el estado metilado/ no metilado del gen GLUT4.

La susceptibilidad a la dieta hipercalórica (sólida), es decir, el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 inducido por la respectiva dieta (tratamientos hipercalóricos que incluyen alimento sólido), depende más de la cepa específica de roedores y del régimen dietético empleado (combinación de ambas) que de la especie misma³⁴.

La administración de dietas modificadas en la cepa CD1 ha logrado reproducir una alteración presente en el síndrome metabólico (aumento de peso/obesidad), sin embargo, se sugiere hacer otro tipo de mediciones que contemplen el resto de signos y síntomas del síndrome metabólico como la hiperlipidemia, hipertensión, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. La propuesta del modelo desarrollado en el presente trabajo reproduce al menos 2 de los criterios emitidos en la ADA, 2023 (sobrepeso/obesidad e hiperglucemia) para el desarrollo de DMT2.

La asociación entre el tipo de tratamiento dietético de la descendencia de progenitores diabéticos y su estado epigenético no se logró establecer por completo. El desarrollo del tratamiento dietético requiere de una administración más prolongada para evidenciar los cambios metabólicos relacionados con el balance energético positivo con respecto a la dieta hipercalórica, por al menos un periodo de 16 semanas como lo reporta Grzęda *et al.*, 2022²³.

El alimento modificado hipercalórico consta de la correcta densidad energética de los diferentes macronutrientes, es importante hacer una correcta distribución de los macronutrientes y proporciones de acuerdo al objeto de estudio. Se sugiere establecer diferentes tratamientos hipercalóricos con base en un solo macronutriente con mayor aporte calórico, ya sea el caso de una dieta alta en carbohidratos, una dieta alta en grasas, y una dieta con ambos macronutrientes como se reporta en literatura de modelos experimentales para el desarrollo del síndrome metabólico, condición previa al desarrollo de la DMT2 ^{28, 30,31}.

La relación del estado metilado/ no metilado del gen GLUT4 (*Slc2a4*) no se logró obtener para todos los tratamientos hipercalóricos. Se obtuvo un resultado del estado metilado únicamente para dos muestras lo que corresponde al gen GLUT4 metilado, sin expresión para DMT2. Se sugiere contemplar variables importantes como la cepa de roedor indicada, los tratamientos hipercalóricos con diferentes combinaciones de macronutrientes y también con base un solo macronutriente con mayor densidad energética, un diseño de los primers con base en un fragmento y/o región diferente (de extremos o central) de la isla CpG analizada con más sitios CpG.

9. CONCLUSIONES.

- Se generó un modelo murino de diabetes transgeneracional en dos fases; los cambios de peso relacionado al tratamiento de peso demostraron mayor influencia al tratamiento dietético con agua azucarada, se encontraron factores que influyen en la preferencia de consumo con agua azucarada. Los cambios metabólicos relacionados con el consumo de agua azucarada se asemejan al consumo de bebidas azucaradas en humanos y predisponen al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus tipo 2.
- Se obtuvo una dieta hipercalórica estandarizada que es funcional para el estudio de los cambios en la degradación de la glucosa y el peso en el modelo murino.
- Se inició la estandarización de las condiciones para el análisis de la condición de metilación del gen GLUT4, sentando las bases para su estudio.

10. PERSPECTIVAS.

Diseño de alimento sólido modificado con una proporción mayor en fructosa o sacarosa para dieta hipercalórica, como segunda opción diseño de alimento sólido modificado con una proporción mayor en grasas de tipo saturada. A su vez, monitorear los horarios de ingesta como lo reporta la literatura en un horario nocturno para promover un mayor consumo en los roedores, y no optar por el método *ad libitum*. También se sugiere agregar marcadores como HOMA-IR, perfil hormonal y técnicas inmunohistoquímicas. En cuanto al diseño de cebadores se sugiere hacer un análisis y diseño en la zona central de las islas CpG existentes en el gen GLUT4, seleccionando el mayor número de sitios CpG.

REFERENCIAS:

1. Barrera-Reyes, Fernández-Carrocera. Programación metabólica fetal. *Perinatol Reprod Hum* [Internet]. 2015 [citado 2021 enero 20]; 29(3): 99-105. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2015.12.003>
2. Carrillo C, Panduro-Cerda A. Genética de la diabetes mellitus tipo 2. *Investigación en Salud* [Internet]. 2001 [citado 2021 enero 20]; III (99): 27-34. Disponible de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14239905>
3. Pantoja-Ludueña M. Los primeros 1000 días de la vida. *Rev. bol. ped.* [Internet]. 2015 [citado 2021 enero 20]; 54(2): 60-61. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102406752015000200001&lng=es.
4. Sanhueza C, Valenzuela B. Nutrigenómica: revelando los aspectos moleculares de la nutrición personalizada. *Rdo. chile nutrir* [Internet]. 2012 [citado 2021 enero 21]; 39(1): 71-85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000100008>
5. García-Robles, Ayala-Ramírez, Perdomo-Velásquez B. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud* [Internet]. abril [citado el 2021 de enero de 20]; 10(1): 59-71. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169272732012000100006&lng=en.
6. Casanello P, Krause BJ, Castro-Rodríguez JA, Uauy R. Epigenética y obesidad. *Rev. chil. pediatr.* [Internet]. 2016 [citado 2021 abril 26]; 87(5): 335-342. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rchipe.2016.08.009>
7. Perna-Chaux A. Análisis de los cambios epigenéticos en la metilación del DNA inducidos por la diabetes y sus posibles mecanismos. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nuestra Señora del Rosario; 2006. Disponible en: <https://repository.urosario.edu.co/server/api/core/bitstreams/2468cad4-6270-4d7c-b88f-36cb253304f6/content>
8. Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf
9. Rodríguez-Saldaña J, Mejía-Pedraza JB. Boletín de práctica médica efectiva, diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Cuernavaca, México. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), 2006. Disponible en: https://www.insp.mx/resources/images/stories/Centros/nucleo/docs/pme_08.pdf

10. Arias-Díaz J., Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2007 [citado 2021 enero 28]; 22(2): 160-168. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22n2/revision3.pdf>
11. Olivares RJA, Arellano PA. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev Educ Bioquímica.* [Internet]. 2008 [citado 2021 enero 29]; 27(1):9-18. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2008/reb081c.pdf>
12. Sociedad Americana de diabetes (ADA) [Internet]. Arlington, Texas; [1995-2023; citado 2021 enero 29], Disponible en: <https://www.diabetes.org/diagnostico>
13. Sandoval-Muñiz RJ, Vargas-Guerrero B, Flores-Alvarado LJ y Gurrola-Díaz CM. Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gac Med Mex.* [Internet], 2016 [citado 2021 febrero 02].; 152:547-57. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/n4/GMM_152_2016_4_547-557.pdf
14. UKEssays. Role of Exercise in Reducing Insulin Resistance [Internet]. 2018. [Citado 05 Febrero 2023]; Disponible en: <https://www.ukessays.com/essays/biology/overcoming-insulin-resistance-6581.php?vref=1>.
15. Bermúdez-Valmore, Bermúdez-Fernando, Arraiz-Naillet, Leal-Elliuz, Linares-Sergia, Mengual-Edgardo et al. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *AVFT* [Internet]. 2007 [citado 2021 febrero 10]; 26(2): 76-86. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642007000200002&lng=es.
16. Zheng S, Rollet M, Pan YX. Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4 expression in skeletal muscle of female rat offspring. *J Nutr Biochem.* [Internet]. 2012 [citado 2021 febrero 21]. (9):1064-71. DOI: [10.1016/j.jnutbio.2011.05.013](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.013).
17. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Rev Educ Bioquímica.* [Internet]. 2007 [citado 2021 febrero 20]; 26 (2):49-57. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=37697>
18. Ramírez-López MT, Vázquez-Berrios M, Arco-González R, Blanco-Velilla R, Decara del Olmo J, Suárez-Pérez J et al. El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual:

- revisión de los mecanismos biológicos implicados. *Nutr. Hosp.* [Internet]. 2015 [citado 2021 febrero 26]; 32(6): 2433-2445. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021216112015001200012&lng=es.
<https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.6.9716>.
19. Cordero-Sánchez P, Milagro-Yoldi FI, Campion-Zabalza J y Martínez-Hernández JA. Epigenética nutricional: una pieza clave en el rompecabezas de la obesidad. *Revista Española de Obesidad*. [Internet]. 2010 [citado 2021 febrero 27]. Vol. (8).10-20. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Paul-Cordero-3/publication/262565817_Epigenetica_nutricional_una_pieza_clave_en_el_rompecabezas_de_la_obesidad/links/0deec5381a71667498000000/Epigenetica-nutricional-una-pieza-clave-en-el-rompecabezas-de-la-obesidad.pdf
20. Laffita-Mesa JM y Bauer P. Herencia epigenética (metilación del ácido desoxirribonucleico): contexto clínico en neurodegeneraciones y gen ATXN2. *Med Clin*. [Internet]. 2014 [citado 2021 febrero 27]; Vol. (143), 360-365. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.11.025>
21. Corella D y Ordovas JM. Conceptos básicos en biología molecular relacionados con la genética y la epigenética. *Rev Esp Cardiol*. [Internet]. 2017 [citado 2021 febrero 28]; Vol. (70), 744-753, Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2017.02.034>.
22. Bansal A y Simmons R. Epigenetics and developmental origins of diabetes: ¿correlation or causation? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. [Internet]. 2018 [citado 2021 marzo 01]; Vol. 315 15–28. Disponible en: [doi:10.1152/ajpendo.00424.20172018](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00424.20172018).
23. Grzęda E, Matuszewska J, Ziarniak K, Gertig-Kolasa A, Krzyśko-Pieczka I, Skowrońska B, Sliwowska JH. Animal Foetal Models of Obesity and Diabetes. [Internet]. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [Internet]. 2022 [citado 2022 diciembre 10]; Vol. 13. 13:785674. Disponible en: [doi: 10.3389/fendo.2022.785674](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.785674). PMID: 35197931; PMCID: PMC8858803.
24. Martínez- López. Genómica nutricional: conceptos y expectativas. *Rev Endocrinol Nutr*. [Internet]. 2013 [citado 2022 diciembre 10]; Vol. (21),22-34. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2013/er131d.pdf>

25. Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Med Mex.* [Internet]. 2004 [citado 2022 diciembre 11]; Vol. 140(4):437-448. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gm044i.pdf>
26. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci.* [Internet]. 2018 [citado 2022 diciembre 11]; Vol. 6;14(11):1483-1496. Disponible en: [doi: 10.7150/ijbs.27173](https://doi.org/10.7150/ijbs.27173).
27. Torrades S. Diabetes tipo 2 cómo frenar la lipotoxicidad. *Offarm.* [Internet]. 2004 [citado 2022 diciembre 11]; Vol. 24. No. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-diabetes-tipo-2-13073449>
28. Escalona Mugica, J. R. et al.: Síndrome metabólico en modelos experimentales. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím.* [Internet]. 2021 [citado 2022 diciembre 11]; Vol. 24: 1-12. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2021/cqb211aj.pdf>
29. Bake T, Morgan DG, Mercer JG. Feeding and metabolic consequences of scheduled consumption of large, binge-type meals of high fat diet in the Sprague-Dawley rat. *Physiol Behav.* [Internet]. 2014 [citado 2023 enero 11]; Vol. 10;128(100):70-9. Disponible en: [doi: 10.1016/j.physbeh.2014.01.018](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.018)
30. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* [Internet]. 2006 [citado 2023 enero 11]; Vol. 36(3):485-501. Disponible en: [doi: 10.1677/jme.1.01909](https://doi.org/10.1677/jme.1.01909). PMID: 16720718
31. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond).* [Internet]. 2016 [citado 2023 enero 11]; Vol. 4; 13:65. Disponible en: [doi: 10.1186/s12986-016-0123-9](https://doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9)
32. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Internet]. 1999 [citado 2023 abril 10]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
33. Vargas B, Ambriz D, Navarro M, Trejo A, Rodríguez G, et al. *Manejo de animales del bioterio de la UAM-I*. 1.ª ed. Universidad Autónoma Metropolitana; [Internet]. 2018 [citado 2023 abril 10]

Disponible en: <https://casadelibrosabiertos.uam.mx/gpd-manejo-de-animales-del-bioterio-de-la-uam-i.html>

34. Sollano XC, Escalona GN, Cano E, et al., Propuesta de un modelo de síndrome metabólico en ratones CD1 inducido con una dieta hipercalórica. Revista de Ciencia Biológicas y de la salud. [Internet]. 2022 [citado 2023 mayo 22]; Vol. XXV, número 1. Disponible en: [DOI: 10.18633/biotecnia.v25i1.1744](https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1744)

ANEXOS

Anexo 1.

Reactivos	Preparación	Almacenamiento
Reactivo de conversión CT.	Agregue 750 µl de agua y 210 µl de M-Dilución Buffer a un tubo de CT (CT-Conversion Reagent) Mezcle a temperatura ambiente agitando o agitando frecuentemente durante 10 minutos	El reactivo de conversión CT es sensible a la luz, por lo tanto, se minimiza su exposición. a la luz. Para obtener los mejores resultados, el reactivo de conversión CT debe usarse inmediatamente, después de la preparación. Si no se usa inmediatamente, el reactivo de conversión CT la solución se puede almacenar durante la noche a temperatura ambiente, una semana a 4°C o hasta un mes a -20°C. La solución de reactivo de conversión CT almacenada debe calentarse a 37°C, luego agitar en vórtex antes de su uso.
Reactivo M-Wash Buffer.	Agregue 24 ml de etanol al 100 % a los 6 ml de tampón de lavado M concentrado.	Su preparación debe ser previa a su uso inmediato para su uso con la muestra de ADN.

Anexo 2.

PERCLORATO DE SODIO		
Reactivo	Molaridad	Dilución en 100ml
Perclorato de Na.	5 mM	61.22g

GEL DE AGAROSA AL 2.5%
2.5g agarosa --- 1000 ml TBE 1x

BUFFER DE LISIS			
Reactivo	Molaridad	Dilución en 1000ml	Dilución en 500ml
Sacarosa	320 mM	109.535g	54.767g
MgCl ₂	5 mM	0.476g	0.2385g
Tris HCL	10 mM	1.57g	0.605g
Tritón	1%	10ml	5ml

BUFFER DE SUSPENSIÓN		
Reactivo	Molaridad	Dilución en 200ml
NaCl	150 mM	1.75g
EDTA	60 mM	3.50g
SDS	1%	2g
Tris HCL	100 mM	2.4g



Cuernavaca, Morelos, a 23 de agosto del 2023

Asunto: Voto aprobatorio

**MTRA. ELIZABETH MARTINEZ CORONA.
EN SUPLENCIA DE LA ENCARGADA DE DESPECHO
DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Esmeralda Guizado Hernández, he leído y revisado la tesis titulada **ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TRANSGENERACIONAL**, que estuvo bajo la dirección de la DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional de licenciatura. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



M. en C. Diana Rivera Bahena



Cuernavaca, Morelos, a 23 de agosto del 2023

Asunto: Voto aprobatorio

**MTRA. ELIZABETH MARTINEZ CORONA.
EN SUPLENCIA DE LA ENCARGADA DE DESPECHO
DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Esmeralda Guizado Hernández, he leído y revisado la tesis titulada **ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TRANSGENERACIONAL**, que estuvo bajo la dirección de la DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional de licenciatura. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



DRA. DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO
Profesora Investigadora Tiempo Completo



Cuernavaca, Morelos, a 23 de agosto del 2023

Asunto: Voto aprobatorio

**MTRA. ELIZABETH MARTINEZ CORONA.
EN SUPLENCIA DE LA ENCARGADA DE DESPECHO
DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E**

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Esmeralda Guizado Hernández, he leído y revisado la tesis titulada **ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TRANSGENERACIONAL**, que estuvo bajo la dirección de la DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional de licenciatura. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



MTRA. ALMA MARGARITA VENOSA CASTAÑÓN



Cuernavaca, Morelos, a 23 de agosto del 2023

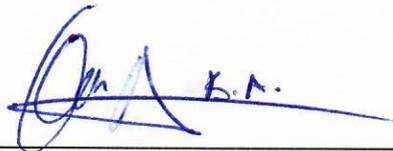
Asunto: Voto aprobatorio

MTRA. ELIZABETH MARTINEZ CORONA.
EN SUPLENCIA DE LA ENCARGADA DE DESPECHO
DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Esmeralda Guizado Hernández, he leído y revisado la tesis titulada **ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TRANSGENERACIONAL**, que estuvo bajo la dirección de la DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional de licenciatura. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE



DRA. CAROL ARELY BOTELLO AMARO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos, a 23 de agosto del 2023

Asunto: Voto aprobatorio

MTRA. ELIZABETH MARTINEZ CORONA.
EN SUPLENCIA DE LA ENCARGADA DE DESPECHO
DE LA DIRECCIÓN DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Licenciatura en Nutrición Esmeralda Guizado Hernández, he leído y revisado la tesis titulada **ASOCIACIÓN DE LA CALIDAD DE LA DIETA Y EL ESTADO METILADO DEL GEN GLUT4 EN UN MODELO MURINO DE DIABETES TRANSGENERACIONAL**, que estuvo bajo la dirección de la DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional de licenciatura. Por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DRA. MARIA ALEJANDRA TERRAZAS MERAZ
PROF. INV. DE TIEMPO COMPLETO