



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Cambios en el patrón de metilación del DMR del locus H19 e Igf2 en el
testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto lipídico de
*Lycopersicum esculentum***

Tesis que presenta:

Bióloga Iliana Bayarte Ruano

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis:

Dra. Guadalupe Bravo

Dr. Bladimir Roque Ramírez

Dedicada a mis padres, mi hermana a mi abuela
Lucina López Martínez y a todos aquellos
que se dedican a la ciencia

“No todo está en nuestros genes”

Agradecimientos Institucionales

Este trabajo se realizó en el laboratorio 3 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Sede Sur bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Bravo y en el laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética del Instituto Nacional de Medicina genómica (INMEGEN) bajo la dirección del Dr. Bladimir Roque Ramírez.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para estudiantes de maestría No. de becario 635528.

Agradecimientos académicos

Extiendo un agradecimiento a mis directores de tesis por ser mi guía y enseñarme todo lo necesario para formarme como científica.

A Dra. Elizabeth Tejero por ser una buena líder del laboratorio y por el apoyo en la realización de mi proyecto.

A la Dra. Carolina López Ruvalcaba y al Dr. Francisco Jiménez Trejo por formar parte de mi comité tutorial y aportarme valiosos consejos para culminar mi proyecto desde la perspectiva de su área y experiencia.

Al Dr. Hugo Villamil-Ramírez, técnico académico de la facultad de medicina de la U.N.A.M por su asesoramiento técnico.

Al Ingeniero Patrick Mailloux Salinas, Auxiliar de Investigación del laboratorio 3 del Cinvestav sede -Sur por su asesoramiento técnico.

Agradecimientos Personales

A mis padres por ser lo que me sostiene cada día e impulsarme siempre a ser mejor, sin ellos el culminar este proyecto no hubiera sido posible.

A mi familia primos, tíos y sobrinos quienes alegran mis días y me han dado grandes lecciones de vida. A mis abuelos Jaime Bayarte Hill, Irma Guerrero, Lucina López y Salvador Ruano.

A Jorge García Abellan por haber sido mi amigo y confidente y apoyarme incondicionalmente nunca me diste un NO como respuesta cuando necesite apoyo muchas gracias.

A Elsa Dosal por compartir momentos inolvidables conmigo en el laboratorio, ayudarme con experimentos y hacer cada uno de mis días increíbles.

A todos los integrantes del laboratorio de Nutrigenómica y Nutrigenética aprendí mucho de cada uno de ustedes Janine, Paco, Valentín, Miguel, Angelica, Cristal, Víctor, Italia, Pavel, Paloma, Héctor, biólogos, nutriólogos, químicos juntos trabajando por un mismo fin.

A todos los integrantes del Laboratorio 3 del CINVESTAV -Sede sur, de ustedes aprendí lo que es el trabajo en equipo. David de nuevo mi primer mejor amigo de la facultad y ahora nos reencontramos en el posgrado por segunda vez, fuiste de gran ayuda para mejorar cada uno de los detalles importantes de esta tesis.

Contenido	
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1.INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Infertilidad.....	6
1.2 Diagnóstico de infertilidad masculina.....	6
1.3 Causas de la infertilidad masculina.....	8
1.4 Obesidad.....	9
1.5 Impacto de la Obesidad sobre la infertilidad masculina y función espermática.....	10
1.5.1 Obesidad masculina y parámetros espermáticos.....	11
1.5.2 Desregulación del eje hipotálamo hipófisis gónadas por causa de la obesidad.....	13
1.5.3 Efecto de la obesidad sobre la integridad del ADN en células espermáticas....	14
1.6 Epigenética.....	15
1.6.1 Protaminas.....	17
1.7 Obesidad y epigenética asociada a infertilidad.....	17
1.7.1 Genes implicados en la espermatogénesis e infertilidad masculina.....	20
1.7.2 Genes H19 e Igf2.....	22
1.7.3 Regulación de la impronta del locus H19/Igf2.....	23
1.7.4 DMR del locus de H19 e Igf2 en infertilidad.....	24
1.8 Tratamiento para la infertilidad.....	25
1.8.1 Fitoterapia.....	27
1.8.2. <i>Lycopersicum esculentum</i>	29
3. OBJETIVO GENERAL	36
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES	36
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
5. METODO.....	41
5.1 Extracción de DNA.....	41
5.2 Extracción de RNA.....	42
5.3 Síntesis de cDNA.....	43
5.4 Metilación Global.....	44
5.5 Secuenciación por bisulfito.....	46
5.6 Mapeo de las islas CpGs del RMD del locus.....	46
5.7 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA JM109.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.2 Curvas estándar.....	50

6.3 Expresión de los genes H19 e Igf2.....	51
6.4 Metilación global.....	53
6.5 Correlación de metilación contra parámetros de estrés oxidativo en los testículos. 55	
6.6 Correlación de metilación contra Nivel de expresión de los genes.	57
6.7 Mapeo de los sitios CpG del DMR del locus H19 e Igf2 al primer mes de administración.....	57
7. DISCUSIÓN.....	60
8. CONCLUSIONES.....	65
9.PERSPECTIVAS.....	66
10. REFERENCIAS.....	67
11. ANEXOS.....	74

Abreviaturas

AND	Ácido desoxirribonucleico
ART	Tecnologías de reproducción asistida
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
CoQ10	Coenzima Q10
CTCF	Represor transcripcional también conocido como proteína de dedo de zinc
CI _s	Intervalos de confianza
DMR	Región de metilación diferencial
DNMT	DNA metil transferasa
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
F1	Filial 1; la primera generación filial
F2	Filial 2; la segunda generación filial
F3	Filial 3; la tercera generación filial
GSTP1	Glutación S transferasa P
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropina
Gx	Gravedades
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPG	Hipotálamo Hipófisis gónadas
Igf2	Factor de crecimiento similar a la insulina 2
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IVF	Fertilización in vitro
IMC	Índice de Masa Corporal
Islas CpG	Regiones de ADN con altas concentraciones de Citocinas y Guaninas enlazadas por un fosfato
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

MAR	Mezcla de reacción antiglobulina
MDA	Malondialdehído
miRNA	microRNA
NAC	N-acetil cisteína
NcRNA	RNA no codificante
NCBI	Centro nacional irlandés de bioinformática
NP	No progresivo
NSAIDS	Antiinflamatorios no esteroideos
OAT	Oligoateneratospermia
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pax6	Gen Homeótico de 22 Kb
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Progresivo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	PCR en Tiempo real
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
V.I.g	Vía intragástrica
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

FIGURAS

Figura 1. Anomalías que caracterizan a la infertilidad.....	7
Figura 2. Efecto de la obesidad masculina sobre el éxito en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistidas (IVF).....	11
Figura 3. Mecanismo por el cual se regula la impronta en el locus de Igf2 y H19.	24
Figura 4. Morfología del testículo	32
Figura 5. Variación en el porcentaje de viabilidad	32
Figura 6. Variación en el % de Movilidad total.....	33
Figura 7. Curso temporal de la variación en la concentración espermática.	34
Figura 8. Histología testicular	35
Figura 9. Línea del tiempo del diseño experimental	38
Figura 10. Diseño experimental derivado del trabajo general.	38
Figura 11. Tiempos en los que se evaluará la metilación y la expresión.....	39
Figura 12.	40
Figura 13. DNA genómico extraído del testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto 300ng.....	41
Figura 14. RNA total extraído de testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto 500 ng.....	42
Figura 15. Vector de clonación.....	47
Figura 16. Región del DMR de H19 que flanquean los primers de DNA convertido	48
Figura 17. Placa de bacterias e.coli cepa JM109	50
Figura 18. Curvas estándar para RT-PCR	51
Figura 19. Nivel de expresión de los genes de H19 e Igf2.	52
Figura 20. Resultados de metilación global.....	54
Figura 21. Correlaciones de metilación contra parámetros de estrés oxidativo en el primer mes y último mes de administración.	56
Figura 22. Correlación del porcentaje de metilación contra la expresión de los genes en el testículo al primer mes de administración.....	57
Figura 23. Metilación específica del DMR del locus de H19 e Igf2.....	59
Anexa 1. Búsqueda de los factores de transcripción que se unen a la secuencia específica del sitio CpG 13.....	74
Anexa 2. Posible mecanismo de expresión de genes con la participación de CTCF	75

TABLAS

Tabla 1 Valores de referencia de calidad seminal.....	6
Tabla 2. Estudios sobre obesidad paterna y su efecto sobre los parámetros básicos de espermatozoides	12
Tabla 3. Genes improntados con aberraciones en la metilación del ADN.....	21
Tabla 4 Tratamiento farmacológico de infertilidad.....	26
Tabla 5 Mecanismo de acción de los componentes antioxidantes de plantas medicinales.	28
Tabla 6. Mezcla 2	43
Tabla 7 Oligonucleotidos utilizados para el PCR en Tiempo Real	43
Tabla 8 Diseño experimental para la placa de PCR en tiempo real	44
<i>Tabla 9 Oligonucleotidos que flanquean regiones CpG de interés del DMR de H19 (GeneBank accession no.AF043428).....</i>	<i>48</i>
Tabla 10 . Condiciones de PCR para DNA convertido con Bisulfito.....	48

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto del extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum* (L. esc.) sobre las alteraciones en las metilaciones del ADN del testículo en un modelo experimental de obesidad. La idea de realizar un proyecto epigenético surgió al plantearnos la siguiente pregunta ¿Puede el extracto de jitomate fungir como un modulador epigenético?, es bien sabido que las marcas epigenéticas pueden ser heredadas, sin embargo, si las alteraciones epigenéticas causadas por el ambiente en este caso obesidad logran ser revertidas con un tratamiento eficaz en este caso el extracto, podría evitarse que se presentara un daño transgeneracional y que un fenotipo dañado se fijara en la población y de ahí la importancia de realizar este tipo de estudios. Para evaluar los daños a nivel epigenético en el tejido testicular se seleccionaron dos genes H19 e Igf2, los cuales se caracterizan por estar asociados con infertilidad y presentar hipometilaciones en sus regiones reguladoras DMR (del inglés región de metilación diferencial). Al tiempo cero, primer y tercer mes de tratamiento se evaluó la expresión de ambos genes, la metilación global del ADN testicular y finalmente debido al comportamiento de los datos se decidió evaluar en el primer mes de tratamiento el patrón de metilación de 15 islas CpG que se encontraban dentro del DMR del locus de H19 e Igf2 el cual se conoce por ser un sitio regulador de la impronta; esta regulación se da mediante la unión de CTCF al DMR cuando este está hipometilado. Se utilizaron 30 ratas Wistar macho que se dividieron en 4 grupos: control vehículo (CV); control extracto (CE); obeso vehículo (OV) y Obeso extracto (OE), se administró el extracto diariamente vía intragástrica durante tres meses.

Los resultados obtenidos mostraron, un aumento en la expresión de ambos genes en el grupo OV y este aumento de la expresión disminuyó en el grupo de animales OE al primer mes; al finalizar el tratamiento se encontró de manera particular que el grupo OV disminuyó la expresión de H19 y aquellos animales que fueron tratados con el extracto continuaron bajando la expresión de H19 siendo estadísticamente significativa la diferencia contra el grupo OV, esto sugiere una mejora en la espermatogénesis ya que H19 tiene un efecto de proliferación celular a la baja y al ser silenciado el gen podría estarse favoreciendo la espermatogénesis. En relación con los resultados de metilación global en el primer mes de administración se observó una hipometilación en OV lo cual ya se ha relacionado con infertilidad en estudios previos. Finalmente, en el mapeo de islas CpG el cuál únicamente se realizó en el primer mes se encontró una hipometilación del 18% en el sitio 12 y de un 50% en el sitio 13; esto fue revertido con el extracto. Los resultados de este trabajo sugieren que el extracto podría ser un posible modulador epigenético que ayuda a revertir alteraciones causadas por obesidad.

ABSTRACT

In the present work, the effect of lipid extract from *Lycopersicon esculentum* (L. esc.) on alterations in testicular DNA methylations was investigated in an experimental model of obesity.

The idea of carrying out now an epigenetic project arose when we asked ourselves the following question, Can tomato extract act as an epigenetic modulator?, it is well known that epigenetic marks can be inherited, however, if the epigenetic alterations caused by the environment in this case obesity can be reversed with an effective treatment in this case the extract, it could be avoided an transgenerational damage and the damaged phenotype will fixed in the population and hence the importance of carrying out this type of studies.

To evaluate the damage in an epigenetic level in testicular tissue, two genes were selected, H19 and IGF2, which are characterized by being associated with infertility and have hypomethylation in its regulatory regions DMR (differential methylation region) in pathological conditions.

The results obtained showed, an increase in the expression of both genes in the OV group, and decreased in the OE group of animals at the first month; At the end of the treatment it was found that the OV group decreased the expression of H19 and those animals that were treated with the extract continued to decrease the expression of H19 being statistically significant the difference against the OV group, this suggests an improvement in spermatogenesis since H19 has a downward cell proliferation effect and being silenced the gene could be favoring spermatogenesis. In relation to the results of global methylation in the first month of administration, hypomethylation in OV was observed, which has already been related to infertility in previous studies. Finally, in the mapping of CpG islands which was only done in the first month, a hypomethylation of 18% was found in site 12 and 50% in site 13; this was reversed with the extract. The results of this work suggest that the extract could be a possible epigenetic modulator that helps to revert alterations caused by obesity.

1.INTRODUCCIÓN.

La infertilidad es una enfermedad multifactorial que se define como la incapacidad de una pareja sexualmente activa de no lograr el embarazo en el plazo de un año (OMS). Esta patología afecta al 15% de las parejas a nivel mundial y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente el 15 y 20% de los casos de infertilidad se atribuyen al factor masculino y de un 30 a un 40% se desconoce la causa.

Dentro de los factores que permiten que la fertilidad pueda verse disminuida se encuentran anomalías genitourinarias congénitas o adquiridas, aumento en la temperatura escrotal, trastornos endocrinos, anomalías genéticas, factores del sistema inmune (Dohle, GR *et al*; 2010) y recientemente se ha tomado en cuenta la obesidad como un factor determinante que puede desencadenar alteraciones en los parámetros de viabilidad espermática establecidos por la OMS como viabilidad, morfología, movilidad y conteo espermático. (Dohle, GR *et al*; 2010).

La obesidad en los hombres de edad reproductiva casi se ha triplicado en los últimos 30 años en la sociedad occidentalizada, y existen evidencias que demuestran que la obesidad masculina impacta negativamente el potencial reproductor no solo reduciendo la calidad de los espermatozoides, también alterando la estructura física y molecular de las células germinales en los testículos y en última instancia en los espermatozoides maduros (Palmer NO *et al*; 2012). Además, en diversos estudios (Pathak, S *et al*; 2010; Boissonas E, *et al*; 2010; Doshi, T *et al*; 2013) en humanos y animales con infertilidad, se ha observado un cambio en el patrón de metilación principalmente en regiones reguladoras del locus H19 e IGF2 así como la pérdida de la impronta génica (proceso por el cual se determinara la expresión de un gen por alelo ya sea paterno o materno mediante marcas epigenéticas), es decir, una alteración en la metilación que se lleva a cabo principalmente en la células germinales, fenómeno que se presenta durante el desarrollo de las células espermáticas. Finalmente, es importante mencionar que las aberraciones en la metilación del ADN se encuentran asociadas a efectos

adversos en el desarrollo embrionario (Boissonas, CC *et al*; 2010; Pacheco, SE *et al*; 2011).

El tratamiento actual para la infertilidad no contempla personas obesas, además de que la infertilidad idiopática está asociada a muchos factores los cuales con un tratamiento específico para cada una aún no está disponible. En este sentido, la búsqueda de tratamientos de tipo fitoterapéutico, a base de plantas medicinales y sus derivados, es una buena alternativa para tratar y prevenir enfermedades diversas como la infertilidad asociada a la obesidad. Existen diversas plantas que han sido reportadas para tratar la infertilidad por ejemplo la administración oral del aceite esencial de *Satureja khuzestanica* en ratas macho mejora significativamente parámetros de fertilidad como fecundidad, índice de fertilidad y tamaño de camada (Haeri, S *et al*; 2006); en un meta-análisis para identificar las plantas que han sido estudiadas para tratamientos de infertilidad desde 1996 a Marzo del 2015, Tahvilzadeh *et al* (2016) reportan las siguientes plantas *Chlorophytum borivillianum*, *Crocus sativus*, *Nigella sativa*, *Sesamum indicum*, *Tribulus terrestres*; estas plantas presentan metabolitos secundarios y compuestos que en su mayoría son antioxidantes, un meta-análisis realizado recientemente (Majzoub, A y Agarwal, A; 2018) dio como resultado los siguientes compuestos antioxidantes con sus respectivas dosis: vitamina E (400 mg), vitamina C (500 – 1000 mg), carnitinas (500 – 1000 mg), N-acetil cisteína (NAC; 600 mg), coenzima Q10 (CoQ10; 100 – 300 mg), zinc (25 – 400 mg), selenio (se) (200 μ g), ácido fólico (0,5 mg) y licopeno (6 – 8 mg). Dentro de los diferentes frutos y plantas que se han reportado para tratar comorbilidades de la obesidad incluyendo cáncer de próstata, se encuentra *Lycopersicum esculentum*, mejor conocido como jitomate, ha sido ampliamente estudiado y se sabe que éste es una fuente importante de vitamina C, ácido fólico, potasio y carotenoides como el licopeno.; contiene, además, compuestos como neoxantina, luteína, α -criptoxantina, α -caroteno y β -caroteno. Estos compuestos proporcionan efectos principalmente antioxidantes que pueden ser eficaces para el tratamiento contra diversas patologías, y se ha reportado el potencial del jitomate en el síndrome metabólico, cabe mencionar que las últimas investigaciones resaltan la relación del consumo de este fruto y sus

derivados con un riesgo reducido a padecer enfermedades crónicas y cardiovasculares entre ellas, la obesidad (Perveen, R *et al*; 2015).

En cuanto al efecto del licopeno sobre cambios epigenéticos principalmente metilaciones, se ha visto que modula la expresión de DNMTs (DNA-metiltransferasas) y revierte el efecto de silenciamiento de GSTP1 en líneas celulares de cáncer de próstata y cáncer de mama sugiriendo que puede presentar un efecto potencialmente anticancerígeno (Li Juan Fu *et al*; 2014; King-Batoon, A *et al*; 2008). Ante la capacidad e inocuidad que ha mostrado dicho extracto, se planteó la evaluación de su efecto sobre las metilaciones del ADN del tejido testicular de ratas que presentan parámetros de viabilidad espermática disminuida, asociadas a la obesidad. En este sentido se evaluará el efecto del extracto en las metilaciones del DMR de los genes, H19 e Igf2, que se encuentran presentes en el mismo locus y se autorregulan por impronta. Este proceso de impronta se establece durante la gametogénesis (Xiang-Hong Ou *et al*; 2018; Oakes, CC 2007). Los genes Igf2 y H19 han sido previamente reportados por presentar hipometilación en el DMR en espermatozoides en condiciones de subfertilidad (Pacheco, SE *et al*; 2011). El factor de crecimiento similar a la insulina (Igf2) es un gen embrionario y un importante regulador de la expresión de este gen son las DMR en H19, ya se ha demostrado que existe una relación entre el estado de metilación del ADN del espermatozoide en el DMR de H19 y una disminución en el porcentaje de implantación (Pathak, S. *et al*, 2010). Por lo anterior, este estudio tiene como objetivo principal corroborar que las aberraciones epigenéticas inducidas por factores ambientales como la alimentación y la obesidad juegan un papel importante en el desarrollo de la infertilidad, y que estas aberraciones epigenéticas a diferencia de las genéticas pueden revertirse por efecto del ambiente en este caso el tratamiento con extracto lipídico del jitomate.

1.1 Infertilidad.

La OMS 2016 define clínicamente a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo definida por la imposibilidad de lograr un embarazo clínico después de doce meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (Jungwirth, A y Diemert, T 2015).

1.2 Diagnóstico de infertilidad masculina.

Para obtener un correcto diagnóstico sobre la infertilidad primero debe realizarse un análisis de calidad seminal, para el cual se deben utilizar ciertos valores de referencia (Tabla 1).

Tabla 1 Valores de referencia de calidad seminal

Parámetros	Valores Límites de referencia (Rango)
Volumen seminal (mL)	1.5 (1.4-1,7)
Número total de espermatozoides (10 ⁶ /eyaculados)	39 (33-46)
Concentración de espermatozoides (10 ⁶ mL)	15 (12-16)
Motilidad Total (PR+NP)	40 (38-42)
Motilidad progresiva (PR%)	32 (31-34)
Viabilidad (espermatozoides vivos %)	58 (55-63)
Morfología espermática	4 (3.0-4.0)
Otros valores del umbral de consenso	
pH	>7.2
Leucocitos peroxidasa-positivos (10 ⁶ /mL)	<1.0
Investigaciones opcionales	

MAR test (Espermatozoides móviles con partículas unidas %)	< 50
Inmunobead test (espermatozoides móviles con partículas unidas %)	< 50
Zinc seminal (μM eyaculados)	≥ 2.4
Fructuosa seminal (μM eyaculados)	≥ 13
Glucosidasa neutral seminal (mU/eyaculados)	≤ 20

Nota. CIs= Intervalos de confianza; MAR = mezcla de reacción antiglobulina NP = No progresivo, PR= Progresivo. Tomado de Jungwirth, A y Diemert, T, 2016.

Aunado a esto se deben tomar en cuenta las tres anomalías que caracterizan la infertilidad.

-Oligospermia: Espermatozoides < 15 millones/mL;

-Asthenozoospermia: < 32% movilidad progresiva

-Teratozoospermia: < 4% forma normal



Figura 1 Anomalías que caracterizan a la infertilidad. <https://www.invitro.com/index.html>

Estas tres anomalías usualmente ocurren de manera simultánea, y se define como síndrome oligo-asteno-teratozoospermia (OAT). Al igual que la azoospermia,

en casos extremos de oligozoospermia (espermatozoides < 1 millón/ml), hay una mayor incidencia de obstrucción del tracto genital masculino y anomalías genéticas (Jungwirth, A y Diemert, T; 2016).

1.3 Causas de la infertilidad masculina.

Las causas de la infertilidad masculina son variables; algunas pueden ser identificadas y tratadas como el hipogonadismo hipogonadotrofo, otras, aunque pueda identificarse la causa, el tratamiento aun no es preciso como alteraciones genéticas o atrofia testicular. Aproximadamente en un 30 y un 40 % de los pacientes que presentan alteraciones espermáticas no se tienen identificadas las causas por las cuales se desarrollan este tipo de problemas, a esto se le conoce como infertilidad idiopática (Palma C.V y Vinay JI.; 2014).

Dentro de las múltiples causas por las que se desarrolla la infertilidad masculina Stahl P, Stember D, Goldstein M., en el 2012 las clasifican de la siguiente manera:

- Congénitas o adquiridas
- Secundaria a patología pre-testicular (eje-hipotalamo-hipofisis-gónadas)
- Testicular o posttesticular (desde testículo a conductos ayaculatorios)

En cuanto a la infertilidad idiopática, se asume que esta es causada por diversos factores como alteraciones endocrinas, estrés oxidativo, alteraciones genéticas y epigenéticas. Estos factores también se presentan en la obesidad y tienen un impacto negativo directo en los órganos reproductores masculinos y por consiguiente sobre los parámetros de viabilidad espermática (Dupont, C *et al*; 2013); (Du plessis, *et al*; 2010).

La obesidad puede afectar a la fertilidad masculina, en estado adulto e incluso en la adolescencia, sin embargo, aún hay interrogantes sobre a qué nivel o niveles actúa; si solo es la espermatogénesis o la maduración espermática

epididimaria, o ambas, y con qué aspectos se relaciona el efecto negativo de la obesidad sobre la fertilidad.

1.4 Obesidad.

De acuerdo con la OMS la Obesidad y el sobrepeso pueden ser definidos como: Acumulación anormal o excesiva de grasa causada por un desequilibrio energético entre las calorías ingeridas y gastadas que puede ser perjudicial para la salud. (OMS 2018). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 la prevalencia de Sobrepeso y Obesidad en hombres adultos aumentó en zonas rurales de 61.1% en el 2012 a 67.5 % en el 2016, mientras que en zonas urbanas se ha mantenido estable, manteniendo un nivel elevado de 69.9 %. En cuanto a la prevalencia de adolescentes en un rango de 12-19 años casi 4 de cada 10 adolescentes presentan sobrepeso y obesidad (prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad de 36.3%). En hombres adolescentes se presenta una reducción, de 34.1% a 33.5% en prevalencia combinada.

En cuanto a los adultos jóvenes de 20 años, 7 de cada 10 adultos (prevalencia combinada de 72.5%) continúa padeciendo exceso de peso (sobrepeso u obesidad) respecto a la cifra de 2012 de 71.2%.

En hombres adultos (prevalencia combinada de 69.4%) se observa un incremento continuo en zonas rurales, en el que la prevalencia de sobrepeso y obesidad (67.5%) aumentó 10.5% respecto a 2012 (ENSANUT, 2016).

Una forma entre varias de medir la obesidad es el índice de masa corporal (IMC), que se define como el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de su altura en metros (kg / m^2) (OMS, 2020).

1.5 Impacto de la Obesidad sobre la infertilidad masculina y función espermática.

En los últimos 17 años se demostró el impacto de la obesidad sobre la fertilidad femenina y el desarrollo embrionario, sin embargo, posteriormente se evaluó el factor masculino tanto en infertilidad como en el desarrollo embrionario. Se ha demostrado que el exceso de peso en los hombres está relacionado con alteraciones de la testosterona, niveles de estradiol, mala calidad del semen e infertilidad (Nguyen, RH *et al*; 2007). Actualmente existe evidencia sobre la cual la obesidad tiene un impacto negativo sobre la fertilidad y la salud embrionaria. Bakos HW *et al* en el 2011 realizaron un estudio donde observaron que parejas conformadas hombres que presenta obesidad o sobrepeso y mujeres con un IMC normal, aumentó el tiempo que tardan en concebir, en comparación con parejas donde el varón tiene peso normal. En un número limitado de estudios clínicos han demostrado resultados similares, donde la obesidad masculina se encuentra asociada a un decremento en la tasa de embarazos exitosos y aumento en la pérdida de embarazos (Fig. 2), (Bakos HW *et al*; 2011).

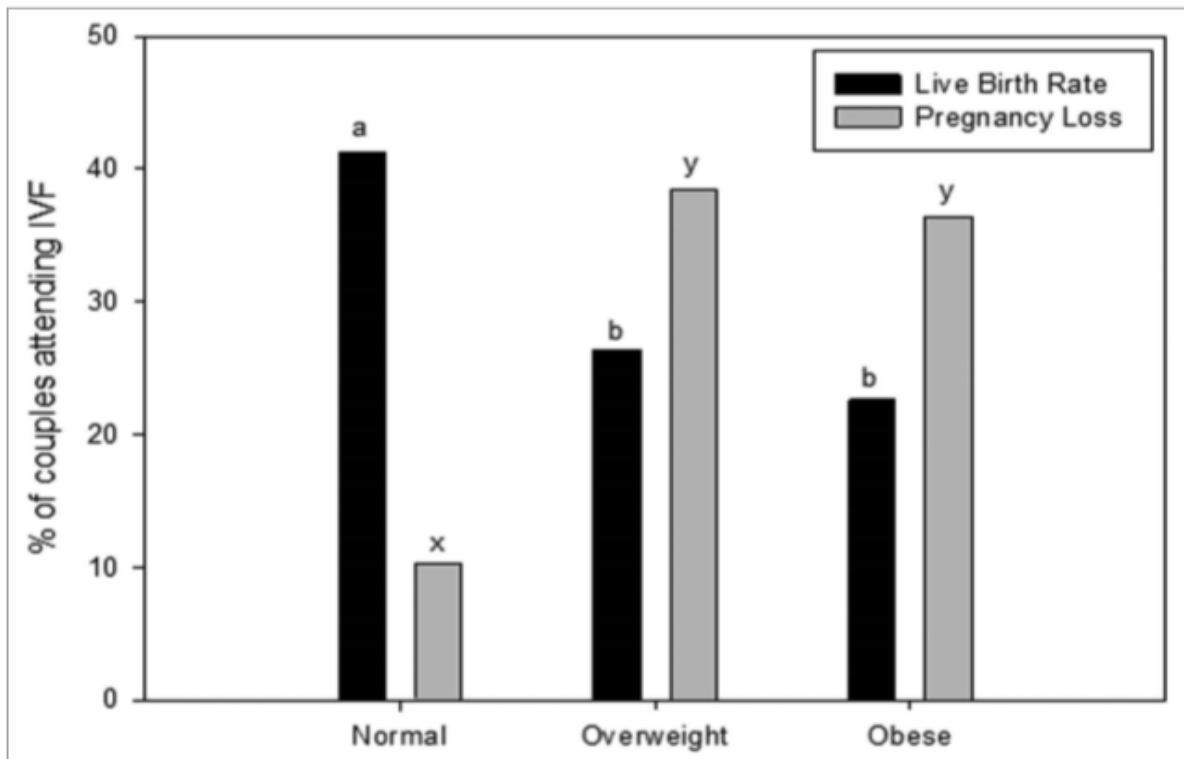


Figura 2 Efecto de la obesidad masculina sobre el éxito en parejas sometidas a técnicas de reproducción asistidas (IVF). 305 parejas tomado de Bakos H.W *et al*; 2011.

1.5.1 Obesidad masculina y parámetros espermáticos.

En diversos estudios se ha demostrado la relación entre la obesidad masculina y los parámetros de viabilidad espermática (Tabla 2) aquí se puede observar que la obesidad reduce significativamente la concentración espermática y altera la morfología y movilidad. Sin embargo, existe discrepancia sobre estas observaciones ya que las alteraciones pueden ser resultado del estilo de vida del paciente, por ejemplo, el consumo de drogas, tabaco, alcohol y co-patologías que pueden perjudicar la función espermática (Palmer, NO y Bakos. WH *et al*; 2012).

Tabla 2. Estudios sobre obesidad paterna y su efecto sobre los parámetros básicos de espermatozoides

	Concentración	Motilidad	Morfología
Jensen <i>et al.</i> (2004)	Disminuido	Ningún cambio	Disminuido
Magnus <i>et al.</i> (2005)	Disminuido	Disminuido	n/A
Fejes <i>et al.</i> (2005)	Disminuido	Ningún cambio	Ningún cambio
Koloszar <i>et al.</i> (2005)	Disminuido	n/A	n/A
Kort <i>et al.</i> (2006)	Disminuido *	Disminuido *	Disminuido
Quin <i>et al.</i> (2007)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Hammoud <i>et al.</i> (2008)	Disminuido	Disminuido	Disminuido
Pauli <i>et al.</i> (2008)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Aggerholm <i>et al.</i> (2008)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Nicopoulou <i>et al.</i> (2009)	Disminuido	Disminuido	Disminuido
Hofny <i>et al.</i> (2010)	Disminuido	Disminuido	Disminuido
Stewart <i>et al.</i> (2009)	Disminuido	n/A	n/A
Chavarro <i>et al.</i> (2010)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Shayeb <i>et al.</i> (2011)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Sekhavat <i>et al.</i> (2010)	Disminuido	Disminuido	n/A
Paasch <i>et al.</i> (2010)	Disminuido	Ningún cambio	Disminuido
Tunc <i>et al.</i> (2011)	Disminuido	Ningún cambio	Ningún cambio
Rybar <i>et al.</i> (2011)	Ningún cambio	Ningún cambio	Ningún cambio
Bakos <i>et al.</i> (2011)	Disminuido	Disminuido	Ningún cambio
Kriegel <i>et al.</i> (2009)	Ningún cambio	Ningún cambio	Disminuido
Fariello <i>et al.</i> (2012)	Ningún cambio	Disminuido	Ningún cambio

Debido a las limitaciones que tienen los estudios clínicos se han desarrollado modelos animales de obesidad que ayuden a dilucidar los procesos genéticos, epigenéticos y la influencia del ambiente. En estos modelos experimentales se ha demostrado que la obesidad causa una disminución en el porcentaje de

espermatozoides con morfología normal. Niveles de testosterona disminuidos y una alteración en la homeostasis de la glucosa (Palmer, NO y Bakos WH *et al*; 2012). Verderrame M, *et al*, en el 2018) demostraron en ratas macho inducidas a obesidad con una dieta alta en grasas daño en la histología testicular, así como un aumento en la expresión de receptores de estrógenos.

1.5.2 Desregulación del eje hipotálamo hipófisis gónadas por causa de la obesidad.

La espermatogénesis es un proceso altamente complejo regulado por el control de esteroides sexuales que a su vez se encuentra regulado por el hipotálamo, la hipófisis y las células de Leydig y de Sertoli de los testículos. Una deficiencia de testosterona involucra desarrollo de hipogonadismo ya que en estadios tempranos la testosterona es esencial para la formación gonadal y diferenciación testicular (Sofikitis, N *et al*; 2008); (Ruwanpura, SM *et al*; 2010). En sujetos obesos la disminución de testosterona es una característica evidente, lo cual refleja, una desregulación en el eje hipotálamo, hipófisis gónadas. En 1993 Jarow, JP *et al* reportaron que la proteína transportadora de esteroides SHBG (del inglés Sex Hormone Binding Globulin) disminuía importantemente en presencia de obesidad y como consecuencia se atenuaba la unión a esteroides y de testosterona libre, es decir, al bajar la SHBG aumenta la testosterona y está es convertida a estradiol en el tejido adiposo.

Cuando se presenta estado de obesidad mórbida disminuyen las concentraciones de testosterona y aumenta la concentración plasmática de estrógenos. Estas alteraciones se han asociado con la sub-fertilidad y la reducción del conteo espermático por interferir con el proceso de retroalimentación del eje HPG (Hipotálamo-hipófisis-gónadas), por lo tanto, los niveles hormonales se pueden utilizar como marcadores de fertilidad. Cabe mencionar que la célula de Sertoli es la única célula somática en contacto directo con el desarrollo de las células

germinales contribuyendo en su estado nutricional, de ahí su relevancia en el tema de infertilidad. (Handelsman, DJ y Swerdolff 1985).

Se ha propuesto que el aumento en la cantidad de estrógenos en hombres obesos se debe en parte al aumento tejido adiposo blanco, este es responsable de la actividad de la aromatasa y también del incremento de diversas adipocinas. La aromatasa citocromo p450 es producida por muchos tejidos incluyendo el tejido adiposo y las células de Leydig en los testículos. Otra hormona importante en este proceso es la Leptina, que en estas condiciones incrementa y los niveles de testosterona disminuyen las células de Leydig (Palmer, NO *et al*; 2012).

1.5.3 Efecto de la obesidad sobre la integridad del ADN en células espermáticas.

De acuerdo con la evidencia existente la integridad pobre del ADN de los espermatozoides esta negativamente correlacionada con embarazos no exitosos.

Un aumento del estrés oxidativo se correlaciona con una disminución de la motilidad espermática, aumento del daño en el ADN de los espermatozoides y una disminución en la reacción acrosomal, además de presentarse una menor tasa de implantación de los embriones después de la fertilización *in vitro*. Diversos estudios clínicos han confirmado la relación entre la obesidad y la disminución en la integridad del ADN espermático (Dupont, C *et al*; 2013).

La membrana espermática se caracteriza por presentar un alto contenido de fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados, lo cual la hace vulnerable a cambios peroxidativos. La acción de las ROS (del inglés; especies reactivas de oxígeno) involucra la peroxidación de los ácidos grasos no saturados de la membrana plasmática, produciendo alteraciones importantes sobre la fluidez de la membrana y esto influye en el comportamiento espermático, resultando en problemas de migración, capacitación, unión y fusión de los gametos (Peris, S *et al*; 2007; Aitken *et al*; 1989)

Otro daño producido por las ROS es la fragmentación del ADN, la cual consiste en interrupciones de cadenas simples o dobles, esta fragmentación es inducida por el radical -OH la cual resulta en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2 deoxiguanosina en un primer estadio, seguido de la fragmentación del ADN de cadena doble. El daño en el ADN que se da en el primer estadio aún puede ser reparado por el ovocito al momento de la fecundación, sin embargo, la fragmentación de doble cadena que se da en el segundo estadio de daño es prácticamente irreversible, lo cual impide que se logre un desarrollo normal del embarazo. Es importante mencionar que la magnitud de este daño producido por ROS depende mucho de la cantidad de estas producidas por el espermatozoide inmaduro, así como de la presencia de células epiteliales o de leucocitos activados por el epidídimo y de los niveles de enzimas antioxidantes presentes en la luz del epidídimo (Paparella, V *et al*: 2015)

Durante la espermatogénesis las histonas, proteínas clásicas de empaquetamiento del ADN, son reemplazadas por proteínas de transición y posteriormente por proteínas más básicas ricas en residuos de arginina y cisteína denominadas protaminas. Durante la maduración epididimaria del gameto masculino las protaminas participan en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares, lo cual proporciona una mayor estabilidad, compactación y protección a la cromatina, proporcionando una estructura mecánicamente resistente y transcripcionalmente inactiva. Estas fallas en los procesos de protaminación se relacionan con apoptosis espermática, fragmentación de las cadenas del ADN y anomalías cromosómicas (Paparella, V *et al*; 2015).

1.6 Epigenética.

La epigenética es una ciencia definida como “el estudio de los cambios de expresión génica que son potencialmente heredables y no implican cambios en la secuencia de ADN” (Waddington, CH; 1942).

Dentro de los procesos epigenéticos conocidos podemos encontrar mecanismos como: la metilación del ADN, modificación de histonas postraduccionales y remodelación de la cromatina, estos cambios pueden representar efectos a corto o largo plazo y pueden pasar de generación en generación, procesos heredables. Los procesos que determinan si un gen está disponible para la transcripción están relacionados con la compactación del ADN en forma de histonas y nucleosomas. Aquellas regiones de ADN que están supercompactadas denominadas heterocromatina son transcripcionalmente inactivas, contrariamente a aquellas regiones presentes cerca de las histonas que son más laxas son transcripcionalmente activas. Los procesos epigenéticos van a representar un papel crucial para determinar la expresión de un gen y cuando, en células específicas. Aunque el código genético se ha considerado como inalterable en cada célula y organismo, el código epigenético se considera un proceso dinámico a través del tiempo y específico del tejido (Rajender, S *et al*; 2011).

En un estudio realizado por Oakes CC; *et al* en el 2007 se demostró que los patrones de metilación de las células espermáticas se dan de manera diferente a los que se forman en las células somáticas, durante la espermatogénesis, en fases tempranas antes de la meiosis, pueden ocurrir eventos de metilación y desmetilación de novo. Estos cambios en el patrón de metilación se presentan, elementos no repetitivos, en regiones específicas de genes o intergénicas, y la desmetilación ocurrirá únicamente en células que van a replicar su ADN. Es importante tomar en cuenta que los cambios en la metilación se modifican durante la espermatogénesis y más adelante cuando la célula germinal ya es un espermatozoide maduro y está casi listo para la fecundación este va a tener un proceso mucho menos dinámico sufriendo supercompactación en el cual el patrón de metilación va a tener un comportamiento específico.

1.6.1 Protaminas.

Las células espermáticas muestran muchos mecanismos epigenéticos característicos. Un fenómeno importante en las espermatidas haploides es el reemplazo de la mayoría de las histonas de unión a ADN por protaminas, este proceso puede considerarse un mecanismo epigenético específico del espermatozoide, ya que el empaquetamiento de cromatina de alto orden inducido por protaminas produce una parada global de la transcripción. Por lo tanto, el espermatozoide se basa en su regulación epigenética más que cualquier otra célula (Schagdasurengin, U y Steger, G 2016).

Un metaanálisis publicado en 2016 demostró que el intercambio anormal de histona-protamina seguido de la deficiencia de protamina está relacionado tanto con el aumento del daño del ADN espermático como con la subfertilidad masculina. El análisis de los datos de 9 estudios diferentes encontró una asociación significativa entre la deficiencia de protaminas y el daño al ADN (Ni, K *et al*; 2016).

Existen 7 genes impronta

dos (KCNQ1OT1, MEST, SNRPN, PLAGL1, PEG3, H19, IGF2) que han sido identificados, los cuales presentan un patrón de metilación alterado. Esto se ha correlacionado con niveles aberrantes de protaminas en hombres oligospermicos; es probable que el proceso de sustitución de histonas por protaminas puede estar afectando el epigenoma de las células espermáticas (Schagdasurengin, U y Steger, G 2016).

1.7 Obesidad y epigenética asociada a infertilidad.

Como se mencionó anteriormente la obesidad es una enfermedad que conlleva a la acumulación excesiva de grasa, resultado de la combinación entre factores genéticos y el medio ambiente.

Dentro de las diversas alteraciones producidas por esta patología como las cardiovasculares, también está demostrado que la obesidad causa desordenes reproductivos y específicamente en el caso de los varones se ha reportado una fertilidad disminuida causada por un daño importante en los órganos reproductivos.

La obesidad masculina puede afectar la calidad espermática y el potencial reproductivo alterando la estructura molecular en las células testiculares, esto a causa de un aumento en las citocinas proinflamatorias que dañan directamente el epitelio seminífero (Liu, Y *et al*; 2017) (Xiang-Hong Ou *et al*; 2018). Debido al daño que se produce por la obesidad a los órganos reproductivos masculinos, las células espermáticas se ven afectadas transmitiendo así estos daños a las siguientes generaciones dando como resultado diversos problemas de salud, y dentro de estos problemas los más importantes se relacionan con el metabolismo y la reproducción; por ejemplo en la primera y segunda generación la calidad espermática disminuye por un incremento en las ROS y daño al ADN, alteraciones que se presentan por el estado de obesidad de los padres (Du Plessis, *et al*; 2010).

El daño que se genera en la descendencia por padres que fueron expuestos a presiones del ambiente en este caso la obesidad, se le conoce como herencia epigenética transgeneracional, es decir que los factores ambientales y genéticos de los padres van a afectar el fenotipo de la descendencia como el peso y el proceso de desarrollo del organismo.

Los estudios sobre la herencia transgeneracional indican que la obesidad masculina causa modificaciones epigenéticas en el espermatozoide a través de sus efectos sobre la expresión de ncRNA con la metilación de ADN global reducida (Daxinger & Whitelaw, 2012); (Xiang-Hong Ou *et al*; 2017). La baja fertilidad que se presenta en la primera y segunda generación de padres obesos puede explicarse por medio de la herencia epigenética transgeneracional.

Existen diversos estudios que apoyan y explican el hecho de que la herencia transgeneracional es el mecanismo por el cual existe una baja fertilidad en descendientes de padres obesos dentro de estos uno en particular demostró que la

metilación del ADN global en células germinales disminuye en la descendencia de ratones inducidos obesos con una dieta alta en grasas (Fullston *et al*; 2012, Fullston. *et al*; 2013). Los procesos de metilación del ADN y de histonas son críticos para la formación de los espermatozoides y de estos depende su éxito reproductivo, aunado a esto es importante destacar que durante la meiosis se producirá un mecanismo por el cual se establece la impronta génica (Goto & Monk, 1998; Ooi & Henikoff, 2007).

El mecanismo por el cual se producen cambios en la composición molecular del espermatozoide en individuos obesos aun es desconocido. Sin embargo, en diversos estudios donde se han examinado los efectos transgeneracionales, proponen cambios epigenéticos en el espermatozoide a través de cambios en el contenido del RNA no codificante, la metilación y el estado de acetilación que se modifican en individuos obesos (Youngson, NA *et al*; 2011); (Daxinger, L *et al*; 2012).

Se ha visto que las proteínas ADN-metil transferasas (DNMT 1, 3A, 3B) están presentes durante el ciclo espermatogénico, cuando estas enzimas no están presentes se producen alteraciones en la función espermática y en su metilación. Los cambios específicos de estas tres proteínas durante la espermatogénesis coinciden con el establecimiento de improntas de metilación en espermatogonias. (Pacheco, SE; 2012).

Existe evidencia que varones que han sido sometidos a un tratamiento de infertilidad la hipometilación de los genes improntados y elementos repetidos en los espermatozoides está relacionado con un embarazo no exitoso además esta correlacionado con un mayor daño en el ADN espermático. Por ejemplo, el gen MTHR presenta niveles alterados de metilación (Pacheco SE *et al*, 2011) en su región promotora lo cual se ha asociado con una función espermática disminuida, también en las regiones improntadas de H19 y elementos repetitivos ALU es decir fragmentos de ADN de 300pb aproximadamente que se encuentran distribuidos en el genoma de primates tienen más probabilidades de hipometilarse en hombres que son subfértiles. (Pacheco, SE *et al*; 2011).

1.7.1 Genes implicados en la espermatogénesis e infertilidad masculina.

En el 2011 Pacheco SE *et al* realizaron un estudio en el cual se utilizaron genes asociados a baja fertilidad, caracterizados por presentar un contenido alterado de ARNm y metilación en genes improntados y no improntados, para la recopilación de los genes se utilizaron diversas bases de datos las cuales se mencionan más adelante: 187 genes improntados fueron identificados mediante HumanMethylation27_270596_v.1.2, www.Illumina.com.

Se compiló una lista de 187 genes improntados en el genoma humano con base en la información de tres fuentes: (1) genes improntados determinados experimentalmente enumerados en dos bases de datos (<http://www.genimprint.com/databases/> y <http://igc.otago.ac.nz/home.html>) con una n = 62; (2) genes improntados identificados utilizando el método CHIP-SNP (n=27); y (3) genes codificantes de proteínas de las 156 secuencias putativamente impresas que corresponden a genes conocidos enumerados por NCBI (n = 106). En conjunto, se identifica una lista final de 187 genes improntados a partir de estas tres fuentes.

Los genes reportados en este estudio se presentan a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Genes improntados con aberraciones en la metilación del ADN

Known Imprinted				Predicted Imprinted											
Gene	E	#	MS	Gene	E	#	MS	Gene	E	#	MS	Gene	E	#	MS
<i>BMPR2</i>	N	1	-	<i>MAPK12</i>	N	2	-	<i>ALDH1L1</i>	M	1	-	<i>LMX1B</i>	M	1	-
<i>CCNE1</i>	N	1	-	<i>MEG3*</i>	M	3	+	<i>ANKRD11</i>	M	2	-	<i>LY6D</i>	P	2	+
<i>CD44</i>	N	2	-	<i>MEST*</i>	P	3	-/+	<i>APBA1</i>	P	2	-	<i>MYEOV2</i>	P	1	-
<i>CDKN1C</i>	M	3	-	<i>MKRN3</i>	P	1	+	<i>BRP44L</i>	P	1	-	<i>OTX1</i>	M	2	-
<i>COPG2</i>	P	2	-	<i>NDN</i>	P	3	+	<i>COL9A3</i>	M	2	-/+	<i>PEX10</i>	M	2	-/+
<i>CTAG2</i>	N	2	+	<i>NEDD9</i>	N	1	-	<i>DVL1</i>	M	1	-	<i>PHPT1</i>	M	1	-
<i>CTNND2</i>	N	1	-	<i>NGFB</i>	N	1	-	<i>EGFL7</i>	P	2	-	<i>PPAP2C</i>	M	2	+
<i>CYR61</i>	N	1	-	<i>NNAT</i>	P	5	+	<i>FAM59A</i>	P	2	-	<i>PRDM16</i>	P	1	-
<i>DIRAS3*</i>	P	11	+	<i>PCNA</i>	N	2	-	<i>FAM70B</i>	M	1	-	<i>PTPN14</i>	M	1	-
<i>DLK1</i>	P	1	+	<i>PEG10</i>	P	8	-/+	<i>FASTK</i>	M	1	-	<i>PURG</i>	P	2	-
<i>DLX5</i>	M	3	-/+	<i>PHLDA2</i>	M	4	-	<i>FOXF1</i>	M	1	-	<i>PYY2</i>	P	2	+
<i>GABRA5</i>	P	1	-	<i>PLAGL1*</i>	P	5	+	<i>GATA3</i>	P	1	-	<i>RPL22</i>	P	1	-
<i>GF11</i>	P	1	-	<i>SDHD</i>	P	1	+	<i>HES1</i>	P	1	-	<i>SALL1</i>	M	1	-
<i>GRB10</i>	N	5	-/+	<i>SGCE</i>	P	2	+	<i>HIST3H2BB</i>	M	1	-	<i>SLC4A2</i>	P	2	-
<i>H19*</i>	M	4	-/+	<i>SHANK2</i>	M	1	-	<i>HOXA11</i>	M	1	-	<i>SOX8</i>	P	1	-
<i>HYMAI</i>	P	1	-	<i>SLC22A18</i>	M	7	-/+	<i>HOXA5</i>	M	1	+	<i>TIGD1</i>	P	1	-
<i>IGF2*</i>	P	1	-	<i>SNRPN*</i>	P	6	+	<i>HOXB2</i>	M	1	-	<i>TMEM60</i>	P	2	-
<i>IGF2AS</i>	P	4	-	<i>TCEB3C</i>	M	3	+	<i>HOXB3</i>	M	1	+	<i>VAX2</i>	M	1	-
<i>IL1B</i>	N	2	-	<i>TP73</i>	M	2	-/+	<i>HOXC4</i>	M	1	-	<i>WDR8</i>	M	1	-
<i>ILK</i>	N	2	-	<i>UBE3A</i>	M	1	-	<i>HSPA6</i>	M	1	+	<i>ZFP36L2</i>	M	1	-
<i>KCNQ1DN</i>	M	2	+	<i>WT1</i>	P	9	-/+	<i>IFITM1</i>	M	1	-	<i>ZNF550</i>	P	1	-
<i>L3MBTL</i>	P	2	+	<i>ZIM2</i>	P	5	+	<i>LDB1</i>	M	1	-				

Nota: E= alelo con expresión parental; #= número de loci alterado significativamente en muestras con baja motilidad; MS =Estado de metilación del loci; M= Expresado maternalmente; P= Expresado paternalmente; N= origen parental no determinado; - = loci hipometilado en muestras con baja motilidad; + = loci hipermetilado en muestras con baja motilidad; -/+ = más de dos loci fueron alterados y algunos de los loci fueron hipometilados en muestras con baja motilidad. Genes con * han sido previamente reportados con metilación diferencial en espermatozoides. **Tomado de Pacheco SE, et al/2011**

Estos genes han sido previamente reportados con metilación diferencial en espermatozoides y ambos genes van a presentar condiciones de hipometilación en sus regiones reguladoras en muestras de espermatozoides con baja motilidad.

De manera general los resultados obtenidos en este estudio mostraron una asociación entre el porcentaje de motilidad y el grado de metilación. Se sugiere que los espermatozoides de baja movilidad han aumentado la hipometilación. La alta prevalencia de CpGs aberrantes metiladas sugiere un defecto de la metilación del ADN en todo el genoma.

Se ha hipotetizado que la causa de esta metilación aberrante puede deberse a una mala compactación de la cromatina, a una DNA metil transferasa ineficaz, o a la falta de marcas de metilación correctas durante la espermatogénesis (Pacheco, SE *et al*;2011).

1.7.2 Genes H19 e Igf2.

Los genes H19 e Igf2 tienen el efecto opuesto sobre la proliferación celular; Igf2 codifica una hormona peptídica promotora del crecimiento y ubicado en el cromosoma 1q41 compuesto por 7 exones, mientras que el ARN no codificante de H19 da lugar a miRNAs represores de la proliferación (Cai y Cullen 2007; Gabory, A *et al*; 2010).

El H19 está altamente expresado en el embrión en desarrollo, principalmente en los tejidos derivados de mesodermo y endodermo. Su expresión es alta durante el desarrollo embrionario y disminuye después del nacimiento, excepto el músculo cardíaco y esquelético, lo que sugiere que puede desempeñar un papel durante la diferenciación muscular. El producto de este gen es un RNA no codificante (ncRNA) y no se ha encontrado ningún producto proteico hasta la fecha, el gen en ratas se encuentra ubicado en el cromosoma 1q41 incluye 5 exones separados por pequeños intrones produce un RNA empalmado y poliadenilado, este RNA está altamente transcrito principalmente por el alelo materno. Su localización es principalmente citoplasmática, aunque se ha descrito como citoplasmática y nuclear. Recientemente también se demostró que este gen codifica a micro RNAs (mir675) a partir del primer exón (Gabory, A *et al*; 2010); (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los genes H19 e Igf2, pertenecen al mismo locus y están separados solo por 90 kb. Ambos genes muestran patrones de expresión similares en los mismos tejidos y en las mismas etapas de desarrollo durante la embriogénesis. El patrón ortodoxo de expresión génica sugirió que estos dos genes estaban coregulados. H19 e Igf2 muestran una expresión monoalélica en la mayoría de los tejidos del embrión, con la excepción del plexo coroideo y leptomeninges, donde Igf2 se expresa bialélicamente. También se informó que Igf2 se expresó bialélicamente en células madre hematopoyéticas, lo que plantea la cuestión de la falta o el borrador de la impronta en las células madre, como se evidencia en las células germinales primordiales. (Gabory, A *et al*; 2010); ([www.ncbi.nlm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

1.7.3 Regulación de la impronta del locus H19/Igf2.

El genoma paterno expresa activamente el gen Igf2 por la acción de elementos aumentadores o enhancers (E) presentes río abajo del mismo. En tanto el gen H19, no es expresado debido a la metilación en DMR y en el promotor del gen. Por otro lado, en el genoma materno la ausencia de metilación en la región DMR provoca el reclutamiento de proteínas del tipo CTCF, las cuales bloquean la actividad de los enhancers sobre el gen Igf2. En consecuencia, la expresión del gen Igf2 se ve interrumpida y se favorece la actividad de los enhancers sobre la expresión del gen H19 (Fig. 3). (Reig, G y Concha, M 2012)

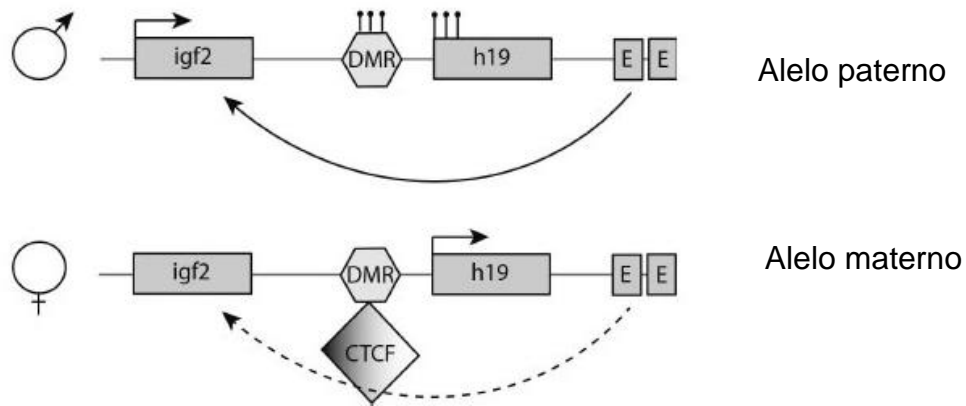


Figura 3 Mecanismo por el cual se regula la impronta en el locus de *Igf2* y *H19*. En el alelo paterno se observa que tanto DMR o sitio que está regulando la impronta como el promotor de H19 se encuentran metilados, esta metilación evita que CTCF se una al sitio regulador permitiendo que los enchancers pasen al promotor de *Igf2* dando como resultado la expresión de este y el silenciamiento de H19; de manera contraria en el alelo materno el DMR está hipometilado permitiendo que se una CTCF el cual actúa como barrera o insulador de los enchancers dando como resultado el silenciamiento de *Igf2* y la expresión de H19. Tomado de Reig, G y Concha, M 2012

1.7.4 DMR del locus de H19 e *Igf2* en infertilidad.

Como ya se mencionó *Igf2* es un gen improntado el cual se expresa recíprocamente con H19. La expresión parental de estos dos genes está regulada a través de un elemento regulador de la impronta; DMR; el cual está localizado 4Kb río arriba del promotor de H19, la metilación alelo específica de dinucleótidos CpG en este sitio constituye una marca de impronta que se adquiere durante la espermatogénesis en machos la cuál es exclusiva del alelo paterno y se mantiene durante el desarrollo.

Los síndromes de Silver y Beckwith Wiedeman presentan pérdida de impronta (desmetilación del DMR) y como consecuencia se ve alterada la expresión de H19 e *Igf2* (Weksberg *et al.* 2005; Bliet *et al.* 2006). Pathak, S *et al.* en el 2010 encontraron que las alteraciones en el estado de impronta del DMR están asociadas a embriones que no lograron su desarrollo con éxito y fueron reabsorbidos, esta aberración en el DMR también se encontró en espermatozoides de la ascendencia de estos embriones reabsorbidos, lo cual comprueba que los errores en la metilación del DMR se dan a través de la línea germinal masculina, que correlaciona

con la desregulación de la expresión de H19 e Igf2. Por otro lado, Song. Y y Jang L, 2018, demostraron que la exposición temprana a agentes tóxicos como p,p'-DDE (p,p-diclorodifenoxidicloroetileno) puede producir modificaciones epigenéticas del DMR en espermatozoides y estas también son heredables en la F1, F2 y F3, en este estudio se concluyó que el disruptor ambiental produce infertilidad, daños epigenéticos desde la espermatogénesis y estos daños son transgeneracionales. Aunado a esto el grupo de estudio de Pathak S. *et al*; en el 2009 encontraron un elemento de respuesta a estrógenos en el DMR de H19 entre los pb 2637 y 2655 en células germinales del testículo, lo cual quiere decir que esta región está estimulándose por estrógenos y que la expresión de los genes depende del nivel hormonal presente en las gónadas, recordemos que en condiciones de obesidad el hipotálamo hipófisis gónadas, se ve alterado por esta condición.

1.8 Tratamiento para la infertilidad.

La infertilidad masculina debe tratarse de acuerdo a las causas por las cuales se desarrolló el padecimiento y estas podemos clasificarlas en cuatro principales; trastorno hipotalámico o pituitaria (1-2%); trastornos en las gónadas (30-40%); trastorno de transporte de los espermatozoides (10-20%); causas desconocidas (40-50%)(<https://americanpregnancy.org/es/getting-pregnant/male-infertility/> consultada el 25 de Marzo del 2020). Existe una gran diversidad de tratamientos farmacológicos los cuales se describen en la tabla 4. (Hamada, A *et al*; 2012).

Tabla 4 Tratamiento farmacológico de infertilidad

Medicación	Indicación	Tasa de embarazo	Otros efectos	Vía de administración	Nivel de recomendación
Liberación de GnRH	HH	50-60%	-Tamaño testicular - Espermatogenesis	SubQ	B
Gonadotropinas	iOAT HH	- 38-51%	- -Tamaño testicular - Espermatogenesis	SubQ SUBQ	I B
Agonistas dopaminérgicos	iOAT HPRL	13.4% -	-PRL normalizado -Mejora de parámetros espermáticos -Función sexual	Oral	A
Anti.estrogenos Inhibidores de la Aromatasa	iOAT iOAT iOAT	0-5% 13-19%	-Mejora de parámetros espermáticos, -Testosterona	Oral	D I I
Contracorticoes- teroides NSAIDs	ASA Leucocitospermia	18-31% -	-Mejora de parámetros espermáticos; -Leucocitos	Oral	C B
Antibióticos Anti-oxidantes α- agonistas	Leucocitospermia iOAT RE AE	47% 17% 34% 2%	-Leucocitos -Mejora de parámetros espermáticos -Eyaculación anterógrada -Eyaculación anterógrada	Oral	B I A D
Parasimpatico- mimeticos	AE	2%	-Eyaculación anterógrada y retrograda	Oral	D
Bloqueadores de células de mastocito PDE5i PTX	iOAT iOAT iOAT	29% - 0%	-Mejora de parámetros espermáticos en los tres casos	Oral	I I I

Nota.Recomendaciones basadas en las pautas del grupo de trabajo de servicios preventivos de EE.UU. (USPSTF): **Nivel A** : Buena evidencia científica sugiere que los beneficios del servicio clínico superan sustancialmente los riesgos potenciales; **Nivel B**: Al menos la evidencia científica justa sugiere que los beneficios del servicio clínico superan los riesgos potenciales ;**Nivel C**: al menos la evidencia científica justa sugiere que el servicio clínico proporciona beneficios , pero el equilibrio entre beneficios y riesgos es demasiado cercano para hacer recomendaciones generales; **Nivel D** al menos la evidencia científica justa sugiere que los riesgos del servicio clínico superan los beneficios potenciales. **Nivel I** falta evidencia científica, de baja calidad o conflictiva de modo que no se puede evaluar el equilibrio riesgo vs beneficio. Los médicos deben ayudar a los pacientes a comprender la incertidumbre que rodea al servicio clínico. AE: Aneyaculación, ASA:anticuerpos antiespermatozoide; HH: Hipogonadismo Hipogonadotrópico; HPRL: hiperprolactinemia; IM: Intramuscular; iOAToligoathenoteratospermia idiopática; PTX: pentoxifilina; PDE5i. inhibidor de fosfodiesterasa-5; eyaculación retrograda; subQ: subcutáneo. Modificada de Hamada, A. *et al*; 2012.

En su mayoría la terapia farmacológica es está enfocada a varones que presentan infertilidad con causas específicas y conocidas. Esto es debido a que la etiología de esta enfermedad y su desarrollo aun no es comprendida en su totalidad; aunado a esto el tratamiento farmacológico existente también presenta efectos secundarios principalmente en aquellos que tienen como blanco terapéutico el factor hormonal. Dentro de estos efectos secundarios se encuentran reportados, para GnRH; dolor de cabeza, dolores abdominales, ginecomastia; temporal, Agonistas de la dopamina; somnolencia, náuseas, hormigueo en manos y pies, dolor de cabeza; inhibidores de la aromatasa provocan, osteoporosis, dolor articular, afecciones cardiacas. (Dabaja, A y Shlegel, P 2014, aspenmedgroup.org). Tomando en cuenta que los efectos adversos, en ocasiones incapacitantes, el individuo abandona el tratamiento, se ha ahondado en la investigación de la medicina alternativa (fitofármacos) y en un mínimo de efectos secundarios.

1.8.1 Fitoterapia.

La terapia con plantas medicinales es un tipo de medicina alternativa que va enfocada a tratar enfermedades con ayuda de plantas que están conformadas por componentes activos. En México alrededor de 4,000 especies de plantas con flores (15 % de la flora total aproximadamente) tiene atributos medicinales, es decir, que una de cada 7 especies posee propiedades curativas. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen, se ha llevado a cabo solo en el 5% de estas especies (Ocegueda *et al* 2005). En un estudio sobre medicina tradicional Persa para tratamiento de infertilidad se han reportado a: *Chlorophytum borivillianum*, *Crocus sativus*, *Nigella sativa*, *Sesamum indicum*, *Tribulus terrestris*, *Mucuna pruriens* and *Withania somnifera*; las cuales tienen propiedades como antioxidantes, antiinflamatorios, actividad endematosa y ventonica, precursores de producción de espermatozoides así como aumento de testosterona en sangre. (Thavilzadeh *et al*; 2015).

La terapia antioxidante es uno de los mecanismos de acción de la medicina tradicional, molecularmente hablado, el estrés oxidativo es un factor que actúa significativamente en el desarrollo de infertilidad, este se presenta, por un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes presentes en el organismo produciendo el estrés oxidativo que juega un rol importante tanto en la señalización celular como en la homeostasis del organismo. Estas plantas con poder antioxidante se caracterizan por presentar componentes particulares (Tabla 5) los cuales, equilibran los radicales libres.

Tabla 5 Mecanismo de acción de los componentes antioxidantes de plantas medicinales.

Componente antioxidante	Mecanismo de acción
Ácido ascórbico (vitamina C)	Neutraliza radicales libres
Tocopherol (Vitamina E)	Neutraliza radicales libres
Folato (Vitamina B9)	Elimina radicales libres
Selenio	Mejora la actividad enzimática de las enzimas
Zinc	Inhibe la NADPH Oxidasa
Carnitina	Neutraliza radicales libres y actúa como una fuente de energía
CoQ10	En su forma reducida, elimina radicales libres, en el sistema de transporte de electrones en la mitocondria
NAC	Mejora la actividad antioxidante enzimática
Licopeno	Restablece el equilibrio de radicales libres.
NADPH, Nicotinamida Adenin Dinucleotido Fosfato	

Modificada de Majzoub, A. y Agarwal, A., 2018

Entre estos componentes antioxidantes está el licopeno, este es un pigmento rojo, lipofílico (soluble en grasa), producido por plantas y algunos microorganismos. Es el principal carotenoide que deriva del tomate, un isómero acíclico del β -caroteno, su capacidad antioxidante excede la del β -caroteno y el α -tocoferol. Estudios han reportado niveles altos de licopeno en testículos y en plasma seminal (Kelkel, M *et al*; 2011).

La terapia con Licopeno fue evaluada en 30 hombres con infertilidad idiopática, a los cuales se les administró 2 mg del compuesto dos veces diarias por 30 días; finalizado el estudio los pacientes reportaron mejora en sus parámetros de concentración y motilidad espermática (Majzoub, A. y Agarwal, A; 2018). Si el efecto de este compuesto resulto benéfico para pacientes con infertilidad idiopática, es probable que el tratamiento con extracto de jitomate presente efectos similares o incluso mejores debido a la acción sinérgica con los otros metabolitos secundarios que presenta *Lycopersicum esculentum*.

1.8.2. *Lycopersicum esculentum*.

El jitomate es el fruto de la planta *Lycopersicum esculentum* también conocida como (*Solanum lycopersicum L.*) presenta un color rojo intenso a causa de su alto contenido de carotenoides (Zeb, A y Mehmood,S 2004). Es una planta perenne anual herbácea nativa del área entre México y Perú que a menudo crece en climas templados. El tomate es consumido en diversas formas incluyendo crudo, pure de tomate, sopas, salsas, etc (un importante componente de la dieta occidental). Este fruto contiene un 65% de licopeno del total de los carotenoides presentes como: fitoeno, fitofloeno, α -caroten, β -caroteno, gamma-caroteno (Story *et al* 2010). También contiene glicoalcaloides (α -tomatina), salicilatos, flavonas (apigenina y luteolina) y polifenoles (quercetina, miricetina, kampferol, naringenina y ácido clorogenico) (Ghavipour *et al*; 2013). Se ha considerado que la gran cantidad de carotenoides presentes en el tomate sirven entre otras cosas como precursores de la vitamina A.

Se ha demostrado que el consumo de tomatina en la dieta, un componente activo presente en el jitomate disminuye los niveles de colesterol de baja densidad “colesterol malo” LDL significativamente sin producir alteraciones en los niveles de colesterol de alta densidad HDL (Friedman, M; 2002).

Sin embargo, uno de los compuestos más estudiados presentes en este fruto y que ha despertado interés en el mundo científico es sin duda el licopeno (un carotenoide terpenoide) el cual se encuentra mayoritariamente en la planta, es un compuesto polinsaturado que contiene 11 dobles enlaces conjugados organizados en configuración trans, aunque ahora se sabe que la configuración -cis es la que se encuentra de manera frecuente en el organismo. Modula la expresión de numerosos genes relevantes en el ciclo celular, influye en la reparación del ADN y muerte celular (induciendo apoptosis) (Schnekenburger, M y Diederich, M *et al*; 2015).

Tanto los factores dietarios como nutricionales han demostrado jugar un papel fundamental en la modulación de la expresión de genes desencadenando efectos en el desarrollo y prevención de enfermedades en el caso específico del licopeno se encuentra reportado su capacidad de revertir el daño epigenético ocasionado en cáncer de próstata y cáncer de mama (Li-Juan Fu *et al*; 2014) y (King-Batoon, A *et al*; 2008). Debido a que el licopeno es un excelente antioxidante es probable que sus efectos sobre la expresión de genes estén dados principalmente por esta característica en particular, ya que se ha asociado el estrés oxidativo con el mantenimiento de las metilaciones en genes evaluados en espermatozoides humanos (Darbandi, M *et al*; 2019). Con base en estos antecedentes se planteó el objetivo de evaluar el efecto del extracto lipídico de *L. esculentum* sobre las alteraciones epigenéticas que pueden ser causadas por obesidad en la línea germinal masculina; tanto en la metilación global como en el patrón de metilación del DMR de genes asociados a infertilidad que son H19 e Igf2.

Nuestro equipo de trabajo (Laboratorio 3 del Cinvestav-Sede Sur) ha demostrado previamente que la administración oral del extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum* a ratas inducidas obesas revierte de manera importante las alteraciones producidas en los parámetros de viabilidad espermática, como

viabilidad, movilidad y conteo, así como de estrés oxidante desencadenados por obesidad (Fig.4,5,6,7 y 8). En la Figura 4. Se pueden observar las diferencias en el tejido testicular entre animales a los que se les administro una dieta alta en carbohidratos y los controles. Mientras que en el panel 4A el tejido testicular presenta una morfología normal, en el panel 4B el tejido se ve completamente atrofiado presentando hipogonadismo. En las figuras 5,6 y 7 se observan los cursos temporales donde se evaluó la viabilidad, movilidad y concentración, en el eje de las X se representa la variable del tiempo en meses, a partir de que se inició la inducción de la dieta por lo cual del mes 0 al 3 únicamente tenemos dos grupos de animales, obesos (Ob) y animales controles (CtNob), a partir del tercer mes cuando los animales ya habían desarrollado la obesidad, se inició con el tratamiento del extracto lipídico de *L. esc*; el cual duro otros tres meses por lo cual, los dos grupos iniciales se convirtieron en 4 ; Control + Vehículo (CtNob-V); Control + Tratamiento (CtNob+Ex), Obesas + vehículo (Ob+V) y Obesas + Tratamiento (Ob+Ex). En estos cursos temporales podemos ver que la obesidad afecta todos los parámetros de viabilidad espermática representados en el eje Y; y que esta alteración se ve disminuida con la administración del extracto lipídico. Cabe mencionar que el efecto de mejora en estos parámetros es significativo desde el primer mes de tratamiento y se mantiene hasta el tercer mes, basándonos en esta evidencia, probablemente encontraremos cambios epigenéticos si analizamos desde el primer mes de tratamiento.

En la figura 8, se observa la microarquitectura de los túbulos seminíferos, los animales obesos, desarrollaron atrofia testicular observando daños evidentes a través del túbulo y en la lámina basal. Este daño fue revertido en animales tratados con el extracto, de igual modo se observa el efecto del tratamiento desde el primer mes.

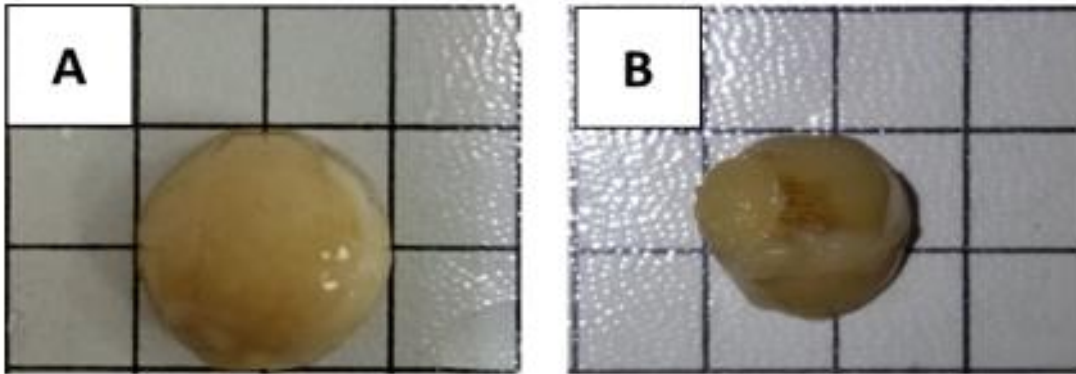


Figura 4 Morfología del testículo. Corte transversal. Animales controles contra animales inducidos obesos con dieta alta en carbohidratos durante tres meses. **A** CtNob, **B** Ob-V.

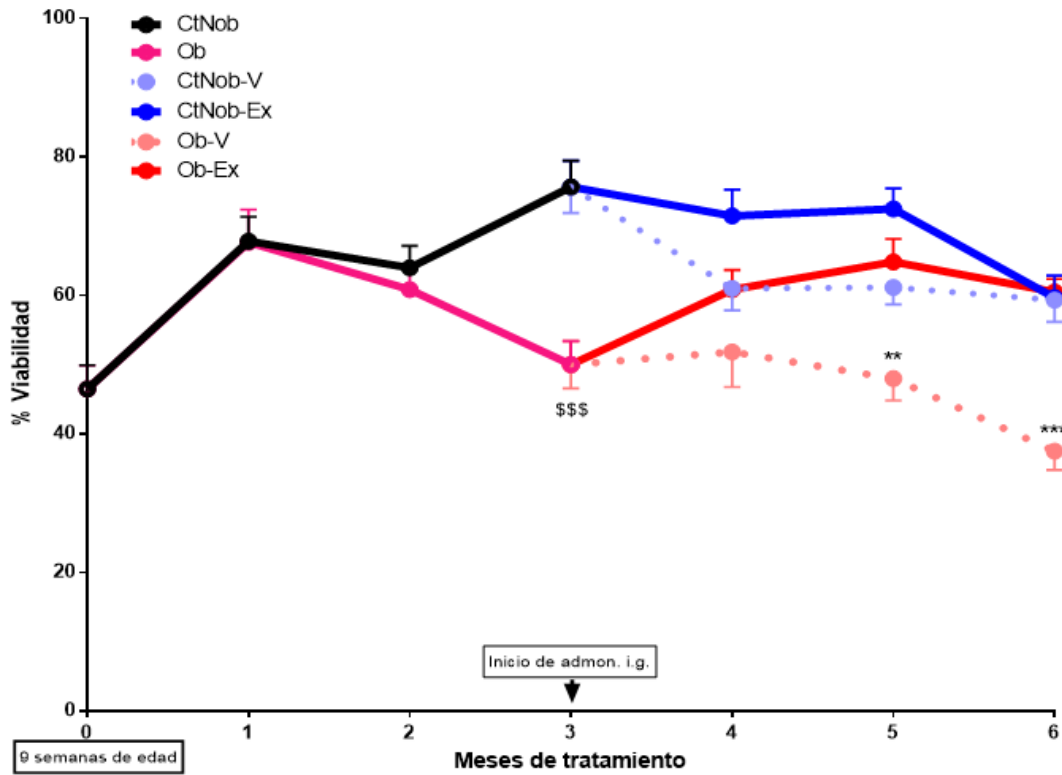


Figura 5 Variación en el porcentaje de viabilidad. Grupos: CtNob (●, n=6), Ob (●, n=6), CtNob-V (●, n=6), CtNob-Ex (●, n=6); Ob-V (●, n=6), Ob-Ex (●, n=6). Cada punto representa la media ± E.E.M. ANOVA multifactorial seguido de una prueba de Holm-Šídák. \$\$\$p<0.001 vs CtNob, **p<0.01 y ***p<0.001 vs Ob-Ex. (Tomado de Vázquez Mendoza 2018, tesis de licenciatura).

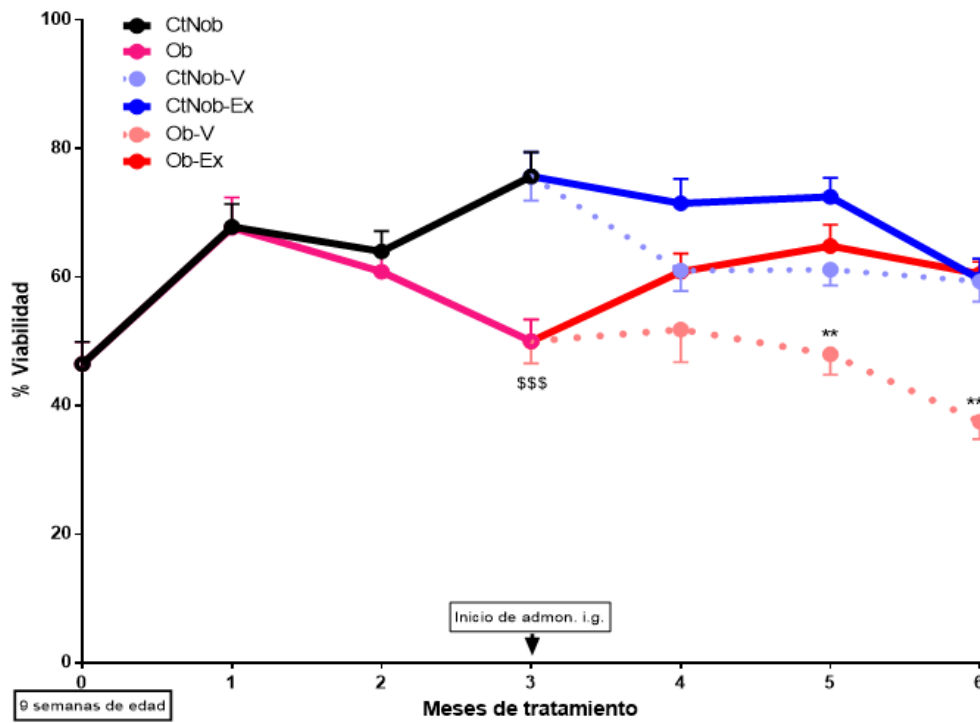


Figura 6 Variación en el % de Movilidad total. Grupos: CtNob (●, n=6), Ob (●, n=6) CtNob-V (●, n=6), CtNob-Ex (●, n=6); Ob-V (●, n=6), Ob-Ex (●, n=6). Cada punto representa la media ± E.E.M. ANOVA multifactorial seguido de una prueba de Holm-Šidák. *p<0.05 y ***p<0.001 vs CtNob-V, **p<0.01 vs Ob-V. (Tomado de Vázquez Mendoza 2018, tesis de licenciatura).

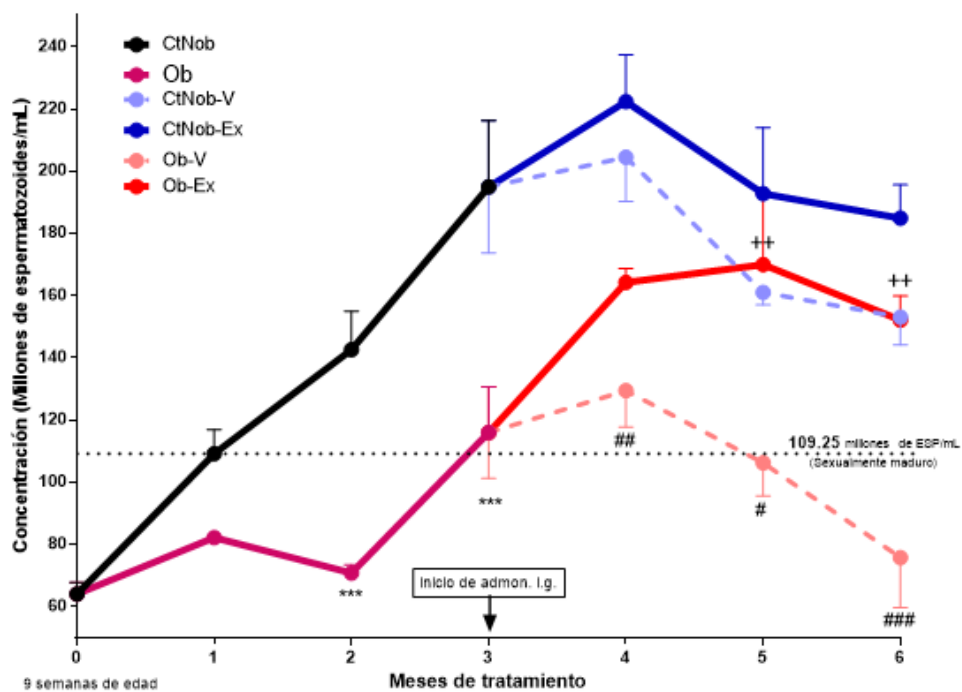


Figura 7 Curso temporal de la variación en la concentración espermática. Grupos: CtNob (●, n=6), Ob (●, n=6), CtNob-V (●, n=6), CtNob-Ex (●, n=6); Ob-V (●, n=6), Ob-Ex (●, n=6). Cada punto representa la media ± E.E.M. ANOVA multifactorial seguido de una prueba de Holm-Šidák. ***p<0.001 vs dieta estándar; #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001 vs CtNob-V, ++p<0.01 vs Ob-V. (Tomado de Vázquez Mendoza 201,8 tesis de licenciatura).

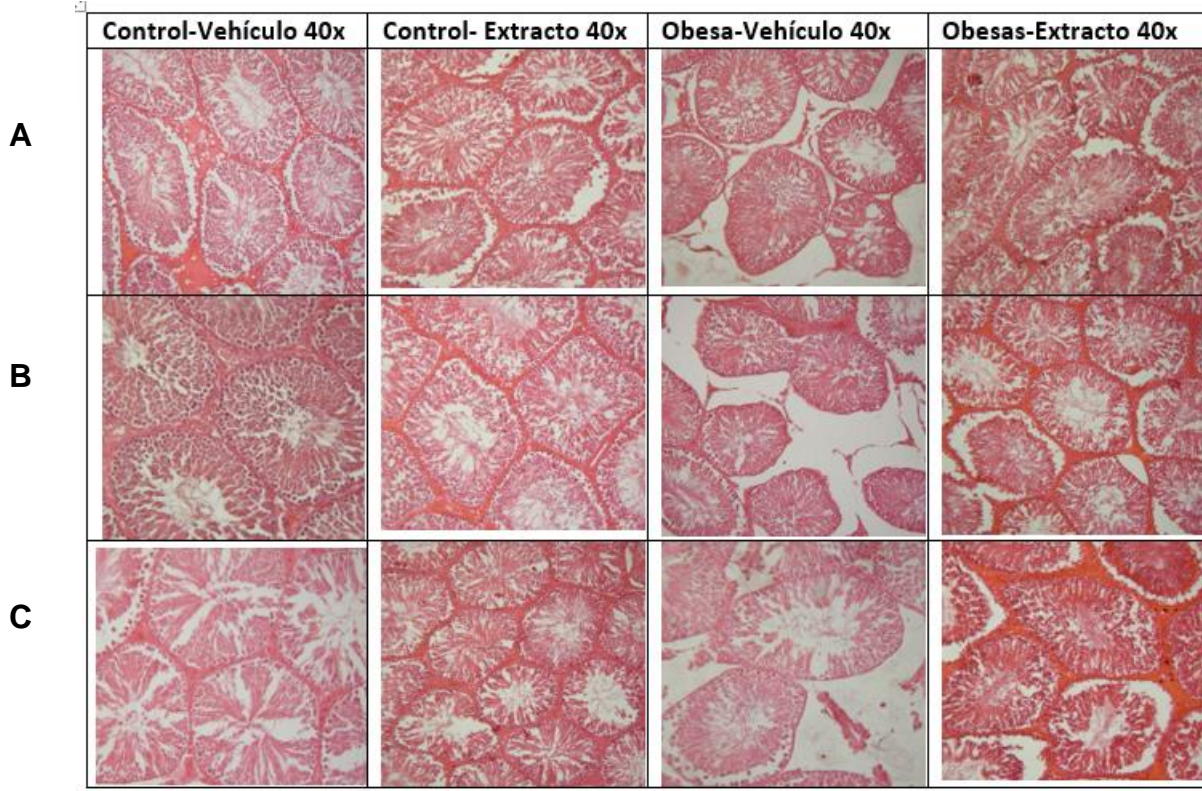


Figura 8 Histología testicular. Donde: A) Primer mes de tratamiento, B) Segundo mes de tratamiento C) Tercer mes de tratamiento. Laminillas tomadas del Laboratorio 3 del Cinvestav- Sede sur.

Los resultados obtenidos en este estudio han despertado el interés por investigar sobre los efectos del extracto lipídico del jitomate a nivel molecular, puesto que, si su administración ha logrado revertir daños causados por obesidad en los parámetros tanto de viabilidad espermática como de estrés oxidativo, es probable que tenga efecto sobre factores epigenéticos en genes específicos que regulan su expresión por medio de marcas epigenéticas específicamente metilaciones.

2.HIPÓTESIS

El grupo de ratas inducidas obesas desarrollará hipometilación en el DMR del locus H19 e Igf2 en el testículo; esta alteración se verá revertida en las ratas obesas administradas con el extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum*.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en el patrón de metilación del DMR del locus de H19/Igf2 en testículo de ratas obesas inducidas por una dieta alta en carbohidratos y tratadas con el extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum*.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar en el tejido testicular de animales controles con vehículo y extracto; y animales obesos con vehículo y extracto:

- 1). La expresión de los genes H19 e Igf2 en el tiempo basal, al primer mes de tratamiento con extracto y al tiempo final del tratamiento.
- 2). Los cambios en la metilación global del ADN, en el tiempo basal, al primer mes de tratamiento con el extracto y al tiempo final del tratamiento.
- 3). Los cambios en el patrón de metilación en islas CpGs del DMR del locus H19 e Igf2 al primer mes de administración con el extracto. Este experimento se realizará en el primer mes de tratamiento, debido a que a partir del primer mes ya se observa un efecto benéfico en los parámetros de viabilidad (Fig. 5,6,7 y 8) el cual es estadísticamente significativo contra el control.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para llevar a cabo el protocolo experimental se obtuvo el tejido testicular de ratas macho las cuales fueron sometidas a una dieta alta en carbohidratos, para generar un estado de obesidad. Esta dieta consistió en administrarle a los animales de 9 semanas de edad, una solución de sacarosa al 30% como agua de beber, la cual consumían *ad libitum* grupo obeso, a un segundo grupo de animales se les administró agua del filtro, grupo control. Ambos grupos recibieron dieta estándar. Después de tres meses de dieta se inició la administración del extracto de jitomate vía oral con ayuda de una cánula intragástrica diariamente durante tres meses (Fig.9). Inicialmente este proyectó fue pensado para evaluar entre; otras cosas; como la obesidad afectaba el desarrollo gonadal de los animales a través del tiempo, puesto que estos iniciaron la dieta en estadios juveniles (por lo cual se pudo observar el desarrollo de hipogonadismo) y aunado a esto evaluar el efecto del extracto sobre este daño ocasionado, el realizar un curso temporal de 3 meses nos permitió observar los cambios a través del tiempo lo cual nos dio un mejor panorama de cómo se fue desarrollando la infertilidad y como fue actuando el tratamiento, esto no hubiera sido posible si solo se hubiera evaluado con un mes de administración. Debido a que no existen estudios previos sobre cursos temporales en animales infértiles, llevar acabo el experimento de esta manera nos ha dado información valiosa para poder inferir ahora que podría pasar a nivel epigenético. Sin embargo, en este nuevo estudio epigenético se decidió realizar el mapeo locus específico al primer mes debido a que las diferencias se observan desde el primer mes y era muy probable debido a los antecedentes que en este tiempo ya encontráramos cambios en la metilación.

El volumen del extracto lipídico se calculó con base en la dosis de 0.0187 mg de licopeno/mL de extracto (0.0093mg/mL) obtenida a 503 nm en el espectrofotómetro, mientras que a los animales control se les administró el vehículo, aceite de maíz. Para fines de este estudio epigenético, se usaron muestras de animales con una n=12, por cada tiempo, controles (CV y CE) n= 6 y obesas (OV y

OE) n=6 y el tiempo 0 grupo Obeso basal OB n= 3 y Control basal n=3. (Figura 10 y 11).

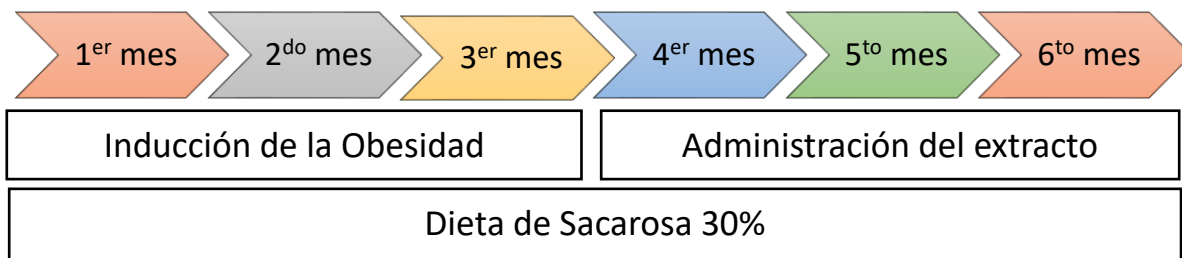


Figura 9 Línea del tiempo del diseño experimental. Donde se observa que la inducción de obesidad se realizó durante tres meses con una dieta al 30% de sacarosa en el agua de beber, pasados los primeros tres meses de inducción se inició con el tratamiento de extracto de jitomate el cual duro tres meses más, la dieta alta en carbohidratos se mantuvo durante todo el experimento.

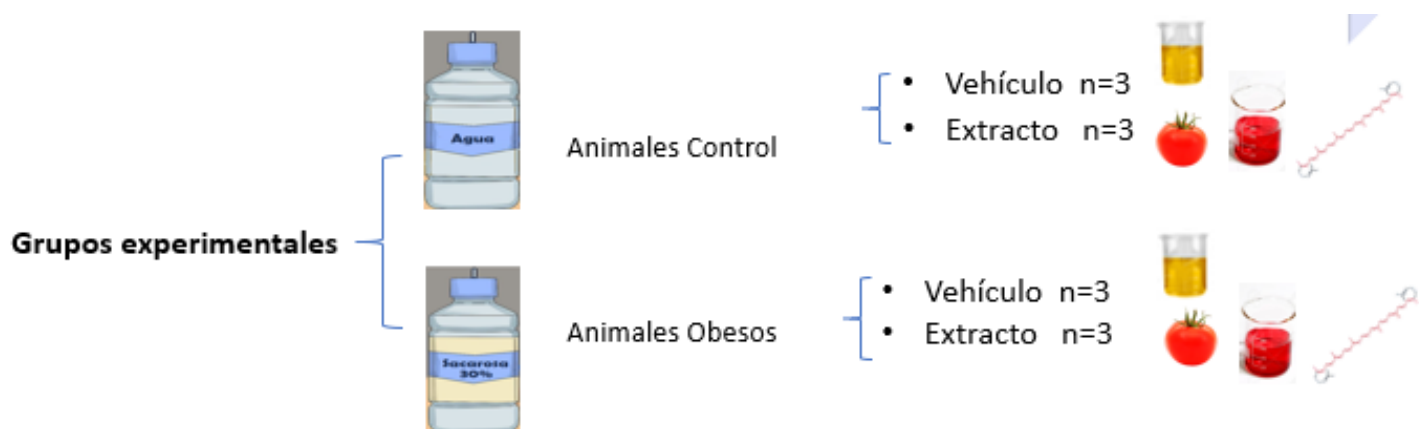


Figura 10 Diseño experimental derivado del trabajo general. En este esquema se puede visualizar los grupos experimentales así como la n de animales que se utilizó para realizar los ensayos de expresión de H19 e Igf2 así como la metilación global y locus específica del DMR. n total = 30

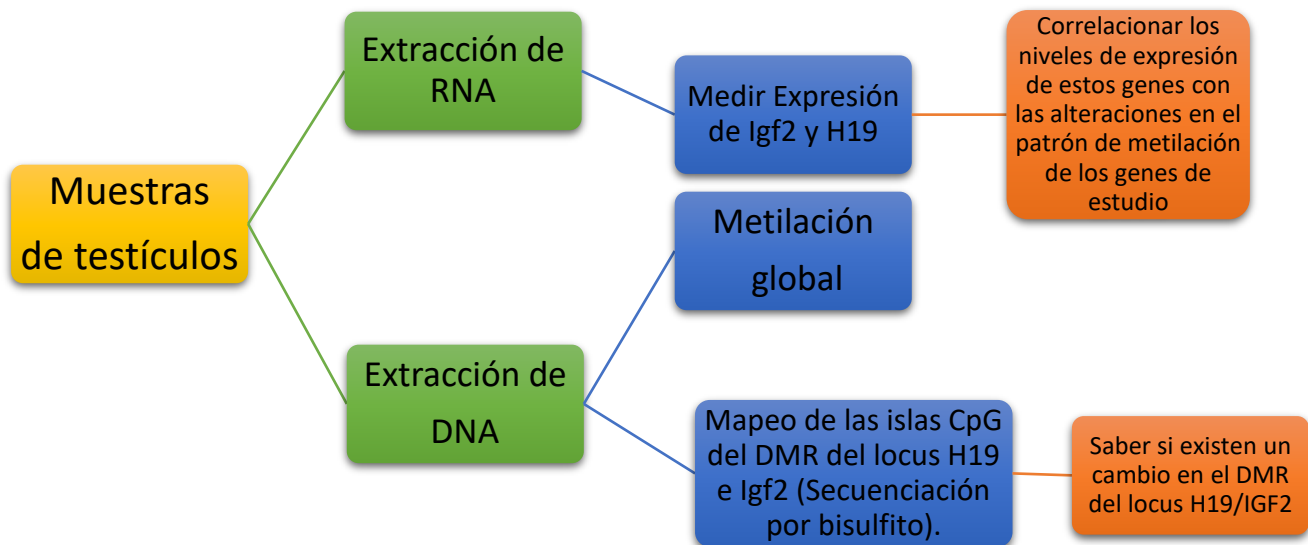
Los tiempos de estudio que se determinaron fueron: 1) tiempo basal, sin tratamiento, 2) primer mes de administración del extracto y 3) tercer mes de tratamiento (Fig. 11). En el tiempo basal únicamente se tenían grupos controles y obesos con una n= 3 por grupo, posteriormente al primer mes de administración del extracto y al último mes se contaban con 4 grupos, controles (vehículo y extracto), y los obesos (vehículo y extracto) con una n=3 por grupo experimental.



Figura 11 Tiempos en los que se evaluará la metilación y la expresión. Debido al comportamiento de los cursos temporales en el conteo y viabilidad espermáticos (Fig. 2,3 y 4) del trabajo inicial, se tomó la decisión de evaluar únicamente en estos tres meses del experimento

Al término de la administración los animales se sacrificaron y se extrajeron los testículos, se les congeló en nitrógeno líquido y fueron almacenados a -80 °C para ser utilizados posteriormente, siguiendo la secuencia que muestra la figura 12.

En la figura 12 se representa un esquema del protocolo experimental a rasgos generales, como primer paso se tomaron los tejidos testiculares de los animales los cuales fueron introducidos inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados en el REVCO a -80°C para preservar la integridad de las moléculas, posteriormente se procedió a obtener los ácidos nucleicos tanto de



ADN como de RNA, ya obtenidas las moléculas de todas las muestras se procedió a realizar los ensayos experimentales, con el RNA se realizó el ensayo de PCR en tiempo real para medir la expresión de los genes H19 e Igf2 y con las moléculas de ADN se realizaron los ensayos de metilación global y de metilación locus específica del DMR mediante Secuenciación por bisulfito.

Figura 12 Protocolo Experimental.

5. METODO.

5.1 Extracción de DNA.

Para realizar la extracción de DNA de tejido testicular primero se colocaron 0.01g de tejido en un tubo eppendorf con 0.5ml de PBS, se homogeneizo el tejido con un politron y a partir de este punto se inició con el protocolo del kit Promega Relia Prep™ siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalizando la extracción de DNA se cuantificó en un Nanodrop tomando en cuenta que las absorbancias de 290/280 y 260/230 se encontraran en los rangos establecidos para asegurar la pureza del DNA (Fig.13).

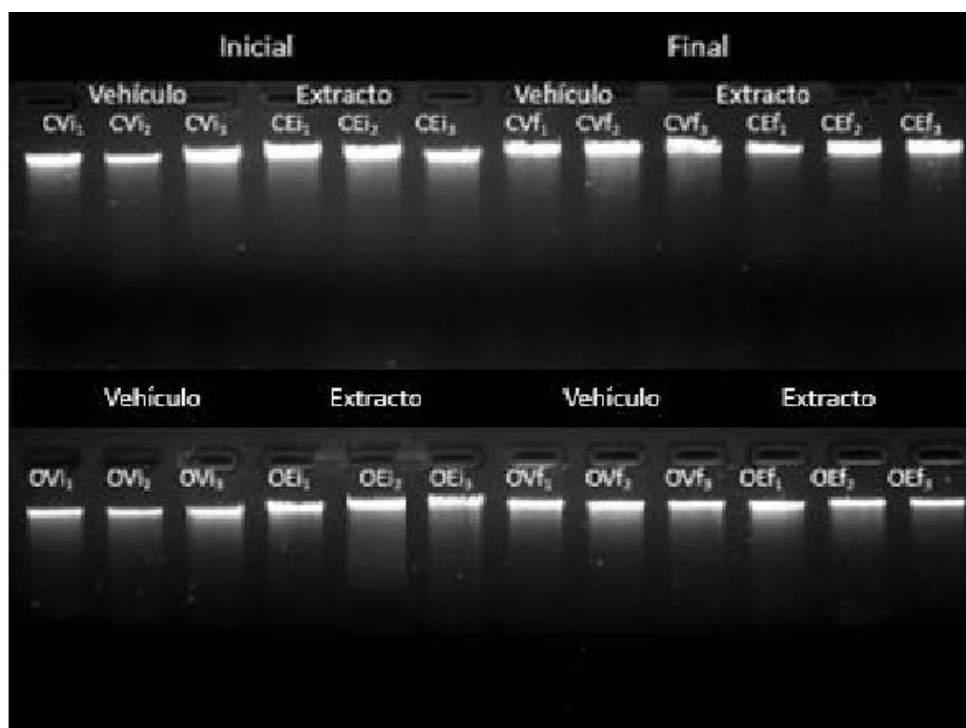


Figura 13. DNA genómico extraído del testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto 300ng. En esta imagen del gel de electroforesis se observa que todas las moléculas están intactas y sin contaminación, es decir, están en óptimas condiciones para los ensayos de metilación, **grupo control vehículo:** CV₁, CV₂ y CV₃; **control extracto:** CE₁, CE₂ y CE₃; **obeso vehículo:** OV₁, OV₂, OV₃; y **obeso extracto:** OE₁, OE₂, OE₃, n=3 por cada tratamiento en tiempos iniciales (primer mes de tratamiento) y finales (3er de tratamiento).

5.2 Extracción de RNA.

Se realizó la preparación de la muestra macerando 0.05 g de tejido congelado al cual se le agregó 1mL de Trizol. Posteriormente, se agregó 1mL de cloroformo, se agito vigorosamente y se procedió a centrifugar la muestra a 12,000 gx.

Después de la centrifugación, se observaron tres fases, únicamente se tomó la fase superior donde se encontraba el RNA. Teniendo la fase fenólica se agregó isopropanol para precipitar el RNA y se centrifugo nuevamente a 12,000 gx. Finalmente, al obtener el pellet de RNA se hicieron 3 lavados con etanol al 70 % centrifugando a 7500 gx y se eluyó con 100 µl de agua libre de nucleasas (Fig.14).

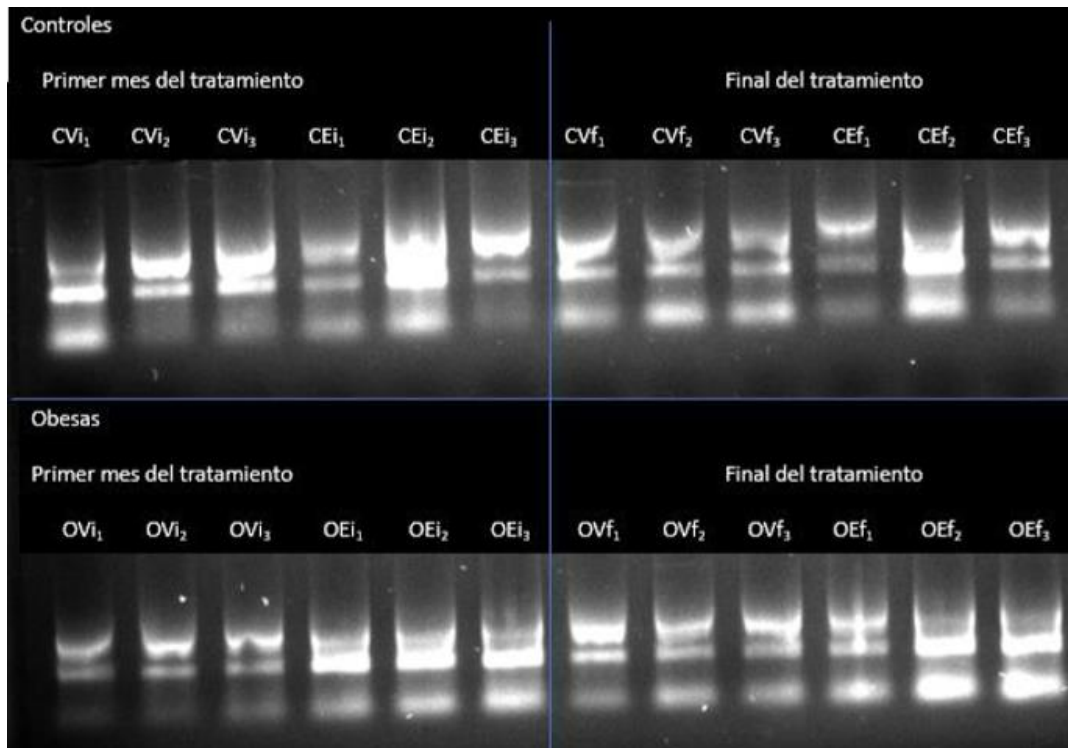


Figura 14. RNA total extraído de testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto 500 ng. Cada grupo representa un tratamiento con n=3; donde: grupo control vehículo: CV₁, CV₂ y CV₃; control extracto; CE₁, CE₂ y CE₃; obeso vehículo: OV₁, OV₂, OV₃; y obeso extracto: OE₁, OE₂, OE₃, por cada tratamiento en tiempos iniciales (primer mes de tratamiento) y finales (3er de tratamiento). En este gel de electroforesis se corrió RNA total por lo cual se deben visualizar tres bandas que corresponden a 2 subunidades de ARN ribosomal y ARN de transferencia las cuales tienen diferente peso molecular como bien se observa en la imagen.

5.3 Síntesis de cDNA.

Para realizar la síntesis de cDNA se procedió a cuantificar la concentración de ADN y se hicieron alícuotas de 3 µg de la muestra de ARN, inmediatamente se agregó 1µl de primers random o hexámicos y se llevó a un volumen de 11µl. Posteriormente, se incubó 5 minutos a 65°C y se procedió a realizar una segunda mezcla utilizando los reactivos presentes en el kit Thermo Scientific First Synthesis Kit #1612 (Tabla 6). La segunda mezcla se agregó a la primera después de 5 minutos de incubación teniendo un volumen final de 20 µl. Finalmente, se colocaron los tubos para PCR en un termociclador a las siguientes condiciones 5 minutos a 25°C, 60 a 37°C y 20 a 47°C.

Tabla 6. Mezcla 2

Reactivos	Volúmenes por reacción
Buffer 5X	4µl
Inhibidor de RNAsas	1µl
DNTPs	2µl
Enzima transcriptasa reversa	2µl

Los cDNAs obtenidos se utilizarán para amplificar por PCR en tiempo real.

Tabla 7 Oligonucleotidos utilizados para el PCR en Tiempo Real

Igf2-F: 5'TGGTGCTTCTCATCTCTTTGGCCT	Doshi, et al 2013
Igf2-R: 5'GCTTGAAGGCCTGCTGAAGTAGAA	Doshi, et al 2013
H19-F: 5'AAGACATGACATGGTCCGGTGTGA	Doshi, et al 2013
H19-R: 5'AGACATGAGCTGGGTAGCACCATT	Doshi, et al 2013
β-actin F: 5 'GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA3 '	Song, et al 2014
β-actin R:5 GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG3	Song, et al 2014

Tabla 8 Diseño experimental para la placa de PCR en tiempo real

Genes	Control-Vehículo			Control Extracto			Obeso Vehículo			Obeso Extracto			Negativos	
H19													-	-
H19													-	-
Igf2													-	-
Igf2													-	-
β -actina													-	-
β -actina													-	-

Nota. Se utilizaron 3 muestras de cDNA de individuos diferentes las cuales se cargaron por duplicado en la placa para cada uno de los genes de estudio H19 e Igf2 y se utilizó β actina como control endógeno, teniendo una n=6 por grupo de estudio. Se evaluó el nivel de expresión al tiempo basal, al primer mes de tratamiento y al final del tratamiento con licopeno.

5.4 Metilación Global.

Para el ensayo de metilación global se utilizó el kit Global DNA: Global DNA Methylation LINE-1 Kit de Active Motif, No. Catalogo 55017, primero se tomaron las muestras de DNA integras y a la misma concentración 1 μ g de DNA, el cual se procedió a digerir con la enzima MseI durante toda la noche y el ensayo se realizó por triplicado, después de dejar la digestión toda la noche se inactivo la enzima, sometiendo la muestra a 65°C por 20 minutos y se cuantifico cada una de las muestras. Para la realización del ensayo se utilizó, un DNA estándar metilado y un DNA estándar No metilado y se procedió a realizar los siguientes pasos;

- 1) Se agregaron 25 μ l de LINE-1 Probe Solution a todos los tubos de PCR con el DNA digerido, para realizar la hibridación de este con las muestras de estudio (LINE-1 sirve como un marcador de metilación de DNA global ya que está comprobado que más de la tercera parte de las metilaciones del DNA ocurren en estas regiones).
- 2) Se diluyen las muestras de DNA digerido hasta llevarlo a una concentración de 4ng/ μ l, para realizar el ensayo por triplicado se diluyeron 320 μ l de DNA en un volumen total de 80 μ l (se utilizaron 25 μ l por reacción).
- 3) El volumen final por tubo de PCR fue de 50 μ l y se utilizó:
 - Blanco** (sin DNA)
 - ADN estándar metilado y no metilado** (100ng DNA/ pozo)
 - Muestras digeridas con Msel** de las cuales se utilizaron 25 μ l de DNA (100 ng/pozo)
- 4) Después de someter las muestras a ciertas condiciones de temperatura, se pasaron a la placa de Streptavidin.coated, para inmovilizar el DNA en los pozos, se realizaron una serie de lavados, 2 con buffer W y 1 con Buffer 3 AM (conformados por sales hidrolíticas); y se procedió a hibridar con el anticuerpo primario el 5-Metilcitocina para identificar todas las citocinas metiladas, después se utilizó un anticuerpo secundario el HRP-conjugado, finalmente se visualizó la reacción mediante detección de agentes colorimétricos. Se procedió a leer con un espectrofotómetro a 450nm de longitud de onda.

Para el análisis no cuantitativo de estos datos los valores obtenidos se compararon con los ensayos control para determinar los niveles relativos de metilación del LINE-1 DNA, el blanco represento la línea de base para representar la ausencia de DNA, los DNA no metilados representaban un bajo porcentaje de metilación mientras que el DNA estándar metilado representaba un porcentaje del 100 % de metilación. A todos los grupos de les aplico una U de Mann-Whitney para buscar diferencias entre los grupos.

5. 5 Secuenciación por bisulfito.

Para detectar los cambios de metilación en regiones específicas del DNA se utilizó la técnica de conversión por bisulfito, para esto se utilizó el siguiente kit: **EZ DNA Methylation-Gold™ Kit**, esta técnica permite realizar un mapeo de la metilación en islas CpG añadiendo la posibilidad de conocer la metilación además de la secuencia específica. Las islas CpG son regiones del DNA ricas en citocinas y guaninas unidas por un enlace fosfodiéster, estas regiones se encuentran en mayor porcentaje en las regiones promotoras de los genes, las citocinas pueden metilarse y desmetilarse de manera constante por lo cual este mecanismo es un buen blanco de estudio para dilucidar la expresión de un gen. Para aplicar este método de secuenciación por bisulfito primero se extrajo el DNA como se describió previamente, el DNA se desnaturizó con calor para obtener así una cadena de DNA y dos hebras y se procedió a incubar la muestra en presencia de bisulfito (NaHSO_3). El bisulfito actuó desaminando la citosina del DNA convirtiendo estas en uracilo, debido a las propiedades físico-químicas del bisulfito, este fue incapaz de actuar sobre aquellas citocinas que se encontraban metiladas (5-metil citosina) y estas no se convirtieron a uracilo durante la reacción. Posteriormente se procedió a amplificar en DNA, clonar y secuenciar. Para mapear las metilaciones se comparó la secuencia obtenida contra la secuencia control, aquellas citocinas que estuvieron metiladas aparecieron en la secuenciación como citocinas, en cambio aquellas citocinas no metiladas y que reaccionaron al bisulfito fueron transformadas a uracilo y se observaron en el mapeo finalmente como timinas.

5.6 Mapeo de las islas CpGs del RMD del locus.

Para el ensayo de metilación específica se identificó la secuencia de DNA del DMR (Gen Bank no. AF043428) y se diseñaron primers que flanqueaban esta región, los primers fueron diseñados para ADN convertido especialmente con un programa llamado Methprimer. El DNA genómico se convirtió mediante el siguiente kit: EZ DNA Methylation-Gold™ Kit; ya teniendo el DNA convertido se procedió a amplificar la

región del DMR la cual se identificó mediante el peso molecular del amplicon (199pb) este fragmento se ligó a un plásmido de 3000pb (pGEM® – T Vector System I) (Fig. 15) en una reacción que duró toda la noche. Ya obtenido el plásmido con el inserto de DNA se procedió a seguir el protocolo de transformación bacteriana. Se clono el gen, se realizó una identificación de bacterias transformadas mediante el método de IPTG y X-Gal, y finalmente se purifico el DNA clonado de cultivos bacterianos con LB líquido. El DNA purificado se secuenció mediante el método Sangher y se analizó cada una de las secuencias para detectar los cambios de metilación específicos de cada una de las 15 islas que se encontraban en el DMR del locus (Fig. 16).

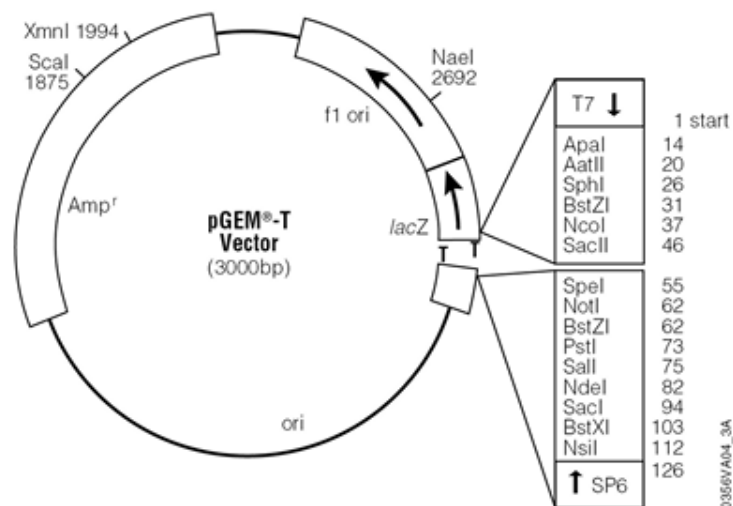
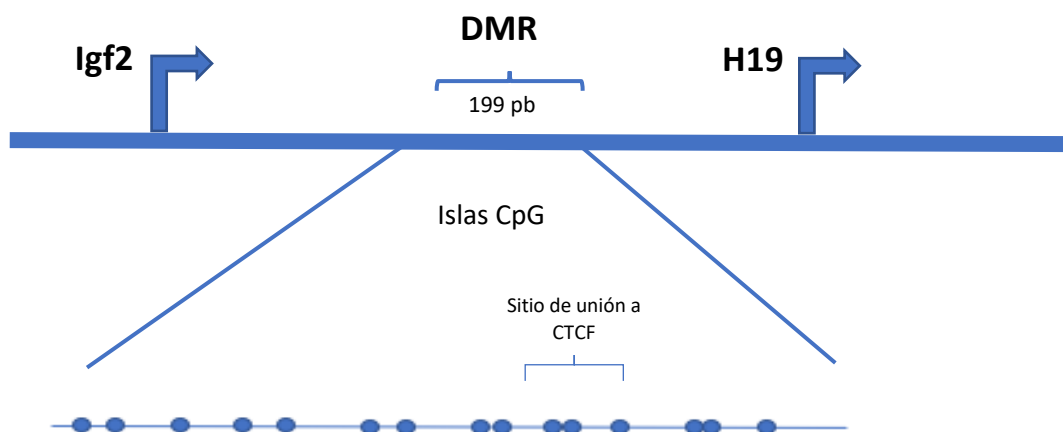


Figura 15. Vector de clonación. Caracterizado por presentar resistencia a la ampicilina y presentar una región codificante del péptido α para la β -Galactosidasa (Gen lac Z), Esta región se encuentra flanqueada por los promotores de RNA polimerasa T7 y Sp6 que también flanquean múltiples regiones de clonación, si se bloquea la expresión de este gen por efecto de un inserto esto nos permitirán identificar las colonias transformadas mediante colonias blancas y azules.



```

ccaagtcca gtacctcaga gggctc aaa cttcactagg agggcaggac acatgcattt 3181
ctaggctggt ccgtggcdgt ctcagacacc gaaatcaacg agttcdgcat actatcdgcd 3241
aagaatcctt tgcdcdtaaa aaccaggcct gccdcdtggc dgcagtgaag tcdcdtacat 3301
cdcatccctg ctgaaacaga ttgcaactga gattgaattt ttctcccat tactctcta 3361

```

Figura 16. Región del DMR de H19 que flanquean los primers de DNA convertido. Donde: **Primers** están representados en color azul y ; las **islas CpG** están en color verde dando un total de 15 islas que caen dentro de esta región en la cual está presente el sitio de unión a CTCF ; (Gen Bank no.AF043428).

Tabla 9 Oligonucleotidos que flanquean regiones CpG de interés del DMR de H19 (GeneBank accession no.AF043428)

Oligos para DNA Metilado	
DMR- F: 5'-agaggggttttaaattttattaggagg-	Pathak Shilpa <i>et al</i> 2010
DMR- R: 5'-ttacaatctatttcaacaaaaaac-	Pathak Shilpa <i>et al</i> 2010

Tabla 10 . Condiciones de PCR para DNA convertido con Bisulfito

94°C	94°C	56°C	72°C	72°C
5 min	1 min	1 min	1.5 min	7 min
38 ciclos				

Después de amplificar el DNA convertido, se realizó una reacción de ligación con el plásmido pGEM® – T Vector System I, la reacción de ligación se mantuvo toda la noche y ya obtenido el plásmido con el inserto se procedió a seguir el protocolo de transformación bacteriana.

5.7 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA JM109.

- 1) Primero se prepararon placas de LB con ampicilina al 0.01 % con IPTG y X-Gal
- 2) Se transfirieron 2 µl del vector a un tubo de 1.5 mL
- 3) Al tubo de 1.5 mL se le transfirieron 50 µl de bacterias competentes de la cepa JM109, se mezclaron suavemente y se incubaron en hielo durante 20 minutos.
- 4) Posteriormente se incubo en un termobloth a 42°C, 50 segundos
- 5) Seguido de esto se incubo en hielo 2 minutos
- 6) Pasados los dos minutos, se agregaron 600 µl de LB liquido sin ampicilina y se incubo 1:30 h a 37°C con agitación
- 7) Finalmente se plaquearon 100 µl de cada cultivo liquido de transformación en cajas de LB agar con ampicilina más IPTG y X-Gal. Y se incubo toda la noche aproximadamente 17 horas a 37°C
- 8) Al otro día al obtener las colonias de bacterias azules y blancas, se seleccionaron dos colonias blancas, las cuales se resembraron en medio LB liquido con ampicilina y se procedió a purificar el plásmido de estas células, el cual finalmente se utilizó para realizar la secuenciación del fragmento clonado (Fig. 17).

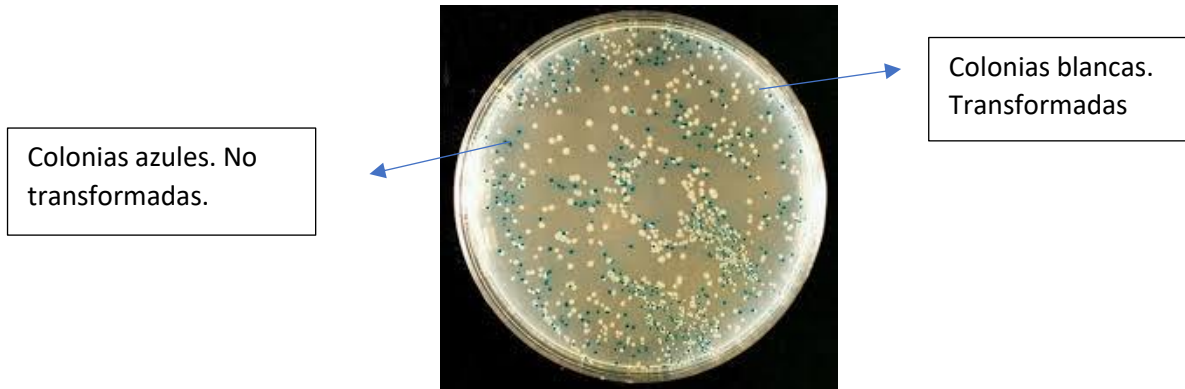


Figura 17 Placa de bacterias e.coli cepa JM109. En el medio de agar se disolvió X-Gal el cual al hidrolizar la β - Galactosidasa produce como residuo un compuesto azul insoluble e IPTG, que es un inductor de la enzima.

6. RESULTADOS.

6.2 Curvas estándar.

Para determinar la especificidad de los primers se realizaron curvas estándar de calibración a diferentes concentraciones de DNA junto con su curva melting para asegurarnos de obtener productos de PCR únicos y específicos. Con este experimento podemos saber las condiciones de PCR para obtener un producto específico de acuerdo con pico obtenido en el melting además de da la eficiencia de los primers, este valor de eficiencia debe ser cercano a 2.

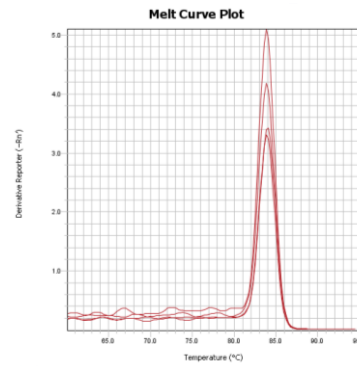
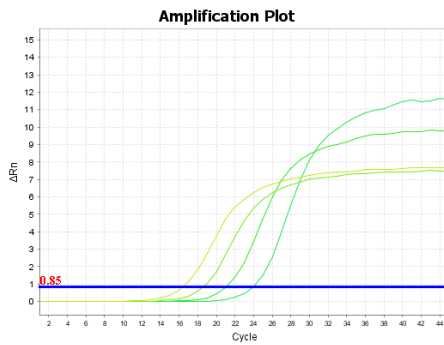
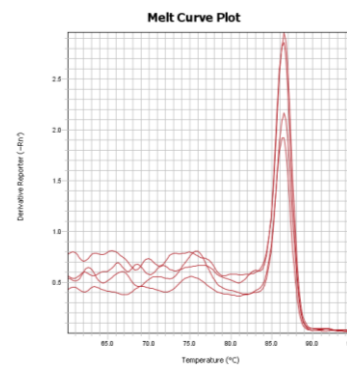
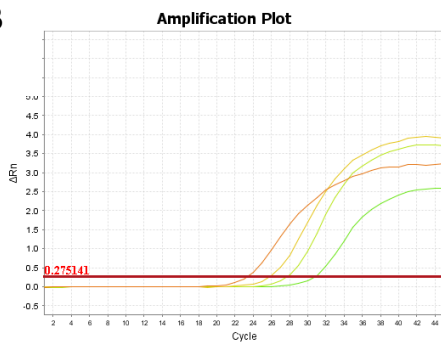
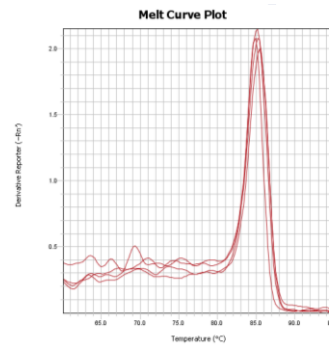
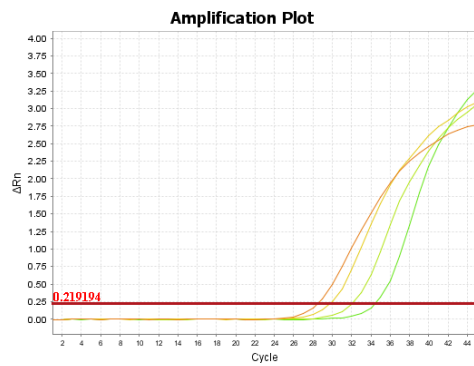
A**B****C**

Figura 18 Curvas estándar para RT-PCR. Donde A) β -actina con una eficiencia de 1.94 del lado izquierdo junto con su curva de melting del lado derecho; B) Igf2 con una eficiencia de 1.84 del lado izquierdo juntos con su curva melting del lado derecho y C) H19 con una eficiencia de 1.83 del lado izquierdo y su curva de melting al lado izquierdo, con la curva melting de cada gen se corrobora la especificidad de amplificación de los primers.

6.3 Expresión de los genes H19 e Igf2.

En la figura 19, se muestra el nivel de expresión de los genes de H19 e Igf2 experimento que nos permitirá saber si la obesidad está influyendo en la expresión

de ambos genes y si el extracto está revirtiendo estas alteraciones y como está influyendo el tiempo en los cambios de expresión.

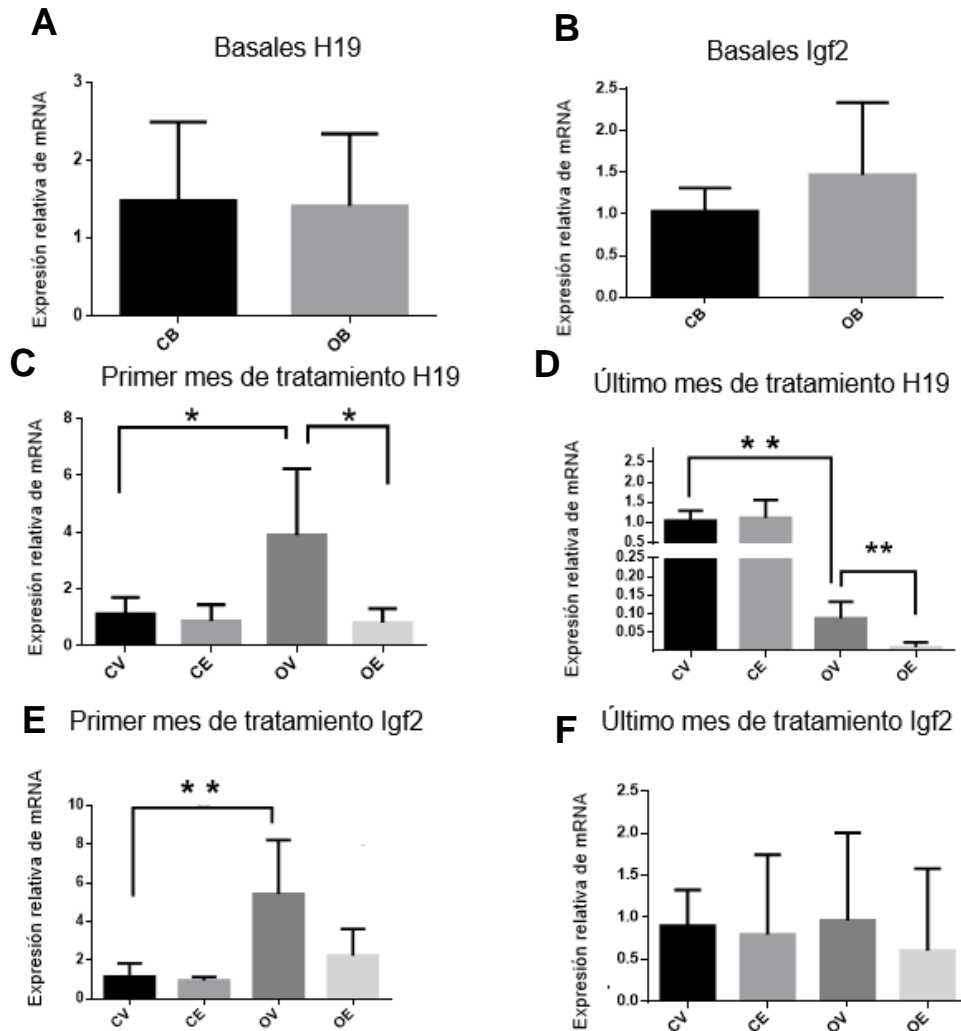


Figura 19. Nivel de expresión de los genes de H19 e Igf2. Donde: A) Tiempo basal del gen H19, B) Tiempo basal de gen Igf2, C) Expresión de H19 al primer mes de administración, D) Expresión de H19 al último mes de administración, E) Expresión de Igf2 al primer mes de administración, F) Último mes de administración de Igf2; donde CB=Control basal, OB=Obeso basal, CV=Control + vehículo, CE=Control +extracto OV=Obeso + vehículo, OE=Obeso+ extracto n=6 *p < 0.05

En la figura 19 se puede observar que en el primer mes de administración del extracto en condiciones de obesidad la expresión del gen H19 aumenta de manera

significativa a diferencia de su control y el efecto de la sobreexpresión del gen se ve revertido, presentándose una diferencia significativa entre los grupos OV y OE. Sin embargo, al último mes de tratamiento la expresión de H19 cambia y baja con respecto a su control y el efecto represor del extracto se mantiene. En cuanto a Igf2 los niveles de expresión tienen un comportamiento similar al de H19 en el cual la obesidad aumenta la expresión del gen y este efecto se ve revertido con el extracto en el primer mes. A diferencia del 3er mes de tratamiento donde no se observa este comportamiento.

6.4 Metilación global.

En la siguiente figura se muestran los cambios de metilación global en el DNA del tejido testicular. Lo que se pretendió hacer con este experimento era tratar de responder las siguientes preguntas ¿La obesidad está produciendo alteraciones en las metilaciones del DNA testicular?, si se dan estas alteraciones ¿Podría el extracto revertir este efecto en la metilación global?

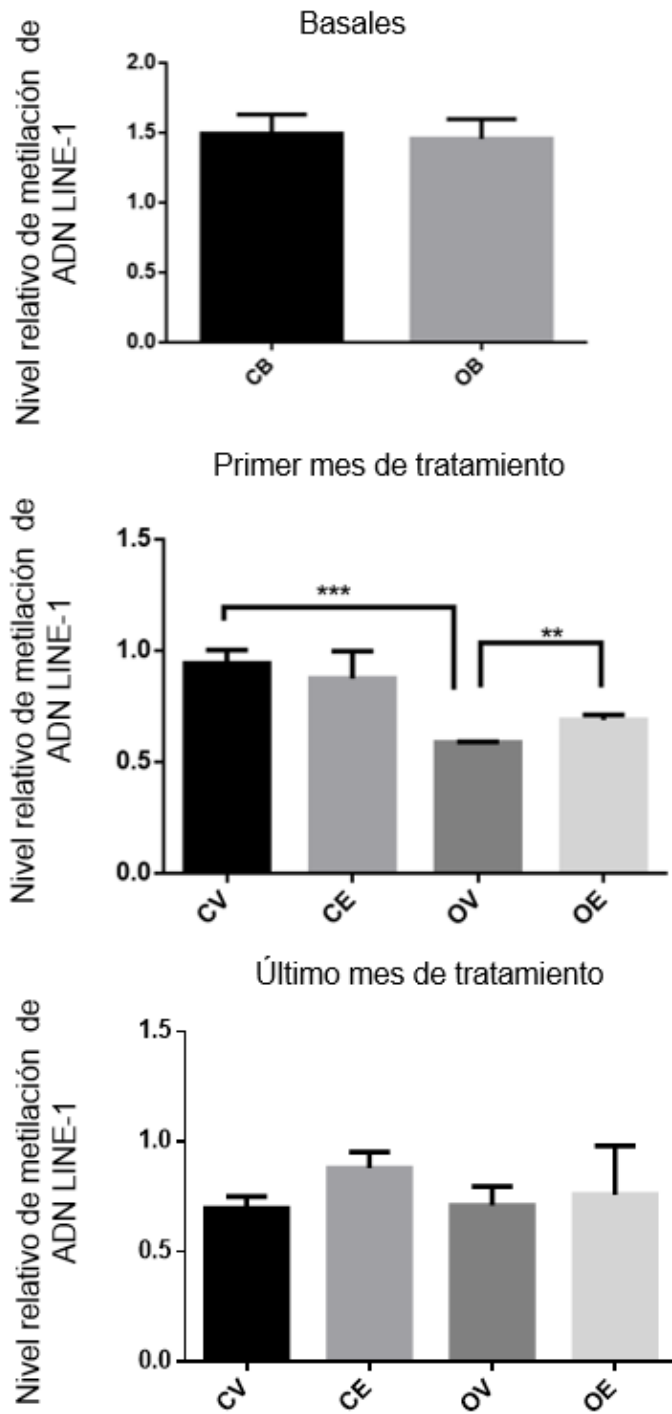


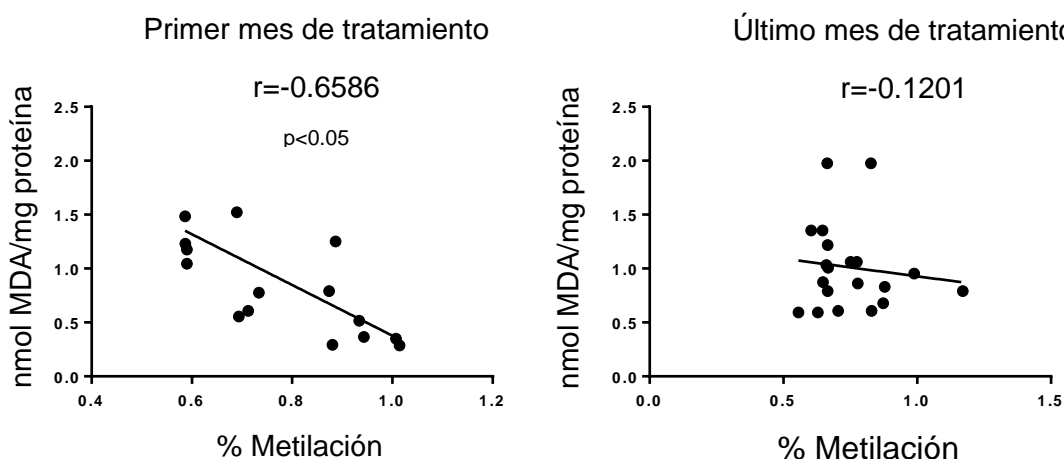
Figura 20. Resultados de metilación global. Donde: **A)** Metilación global al tiempo basal; **B)** Metilación global al primer mes de tratamiento con el extracto; **C)** Metilación global del último mes de tratamiento con el extracto. Donde CB: Control basal; OB: Obeso basal, CV: Control + vehículo, CE: Control + extracto, OV: Obeso + vehículo, OE: Obeso + Extracto. n=6, p < 0.05

De acuerdo con los resultados en la metilación global se puede inferir que en el tiempo basal no existen cambios en la metilación, y parece ser que el efecto de la obesidad al menos en las metilaciones está presentándose hasta el cuarto mes de dieta, donde ya se logra ver una diferencia significativa entre los grupos CV y OV.

Al primer mes de administración del extracto se puede observar que el grupo OV presenta hipometilación con una $p < 0.05$, lo cual esta correlacionando con el nivel de expresión de los genes en el primer mes, esta hipometilación se revierte con el extracto. Al 3er mes de tratamiento del extracto no se logra ver una diferencia significativa sin embargo los grupos CE y OE tienen una tendencia al alta mientras que los grupos vehículo presentan una tendencia en la metilación a la baja (Fig. 20).

6.5 Correlación de metilación contra parámetros de estrés oxidativo en los testículos.

Existe una correlación entre los niveles metilación global y los parámetros de estrés oxidativo que son malondialdehído (MDA) y Nitritos totales en el primer y último mes de tratamiento con el extracto. Este análisis se realizó con el fin de dilucidar si el estrés oxidativo está influyendo en los cambios de metilación que se produjeron a causa de la obesidad y también si el mecanismo terapéutico del extracto estaba influyendo en el estrés oxidativo.



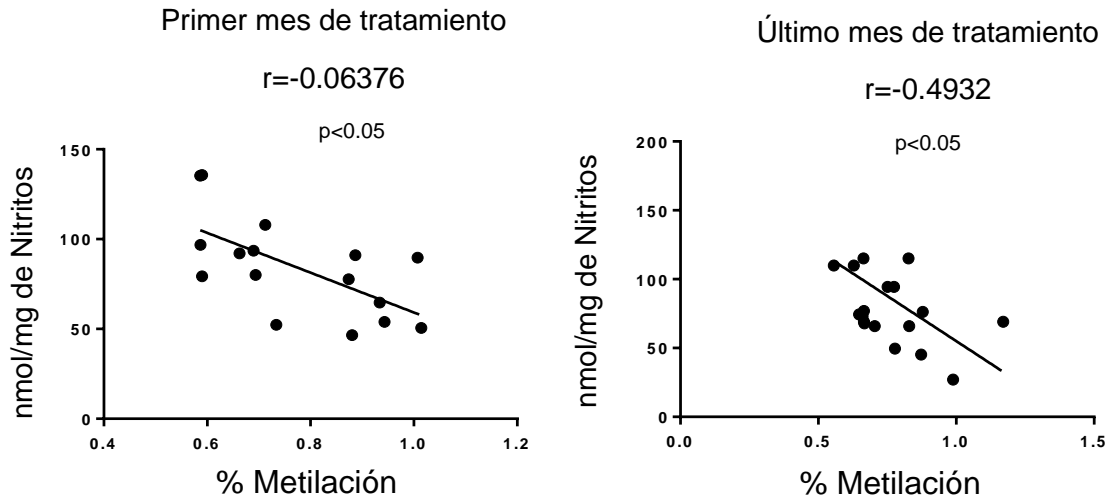


Figura 21. Correlaciones de metilación contra parámetros de estrés oxidativo en el primer mes y último mes de administración. Lo que se observa en esta figura es que existe una correlación negativa con respecto al estrés oxidativo y la metilación en el ADN del testículo, $p < 0.05$.

MDA: Malondialdehído; Nitritos totales.

La figura 21 ilustra una correlación inversa entre la metilación y los parámetros de estrés oxidativo como malondialdehído y Nitritos totales, es decir, que a mayor metilación menor estrés oxidativo y a menor metilación mayor estrés oxidativo. Lo que sugiere que el estrés oxidativo causado por obesidad está influyendo en la metilación y que el mecanismo terapéutico del extracto está correlacionado con estos parámetros.

La siguiente gráfica ilustra las correlaciones entre la expresión y las metilaciones, esta figura muestra, que la metilación global del DNA testicular podría estar relacionado con la expresión de ambos genes.

6.6 Correlación de metilación contra Nivel de expresión de los genes.

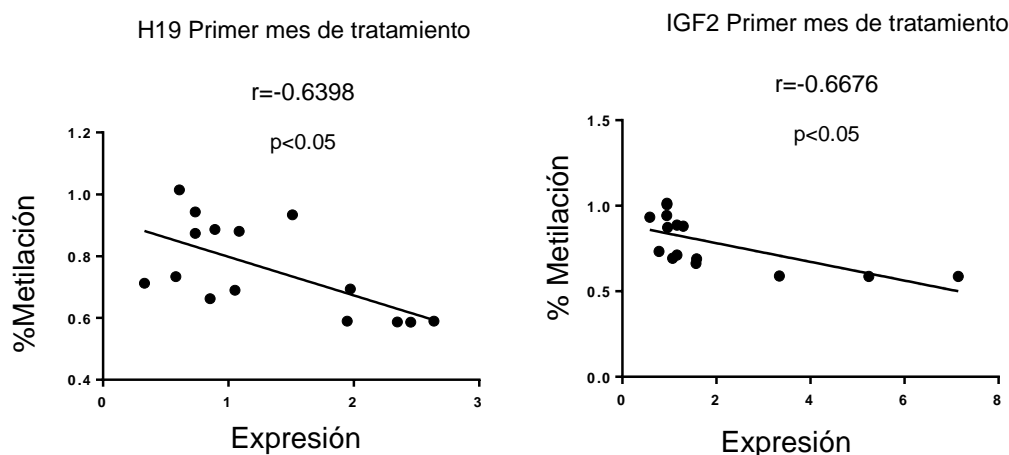


Figura 22. Correlación del porcentaje de metilación contra la expresión de los genes en el testículo al primer mes de administración. En el último mes no se encontró una correlación significativa por lo cual no se presenta en esta figura. $p < 0.05$

En la figura 22, se puede observar que si se encuentra una correlación inversa con una $p < 0.05$ en el primer mes, en el último tiempo ya no se alcanza significancia lo cual puede deberse a la inconsistencia de los datos, debido a que en la expresión de Igf2 como en la metilación global del último tiempo no existen diferencias significativas, únicamente nos centraremos en el primer mes del experimento.

6.7 Mapeo de los sitios CpG del DMR del locus H19 e Igf2 al primer mes de administración.

Debido a los resultados obtenidos en la expresión de los genes, se decidió realizar el análisis de metilación locus específica en el primer tiempo como un primer acercamiento, además de que el comportamiento de expresión en este tiempo correlaciona con la literatura. La expresión de H19 al último mes disminuyó aún más por causa de la obesidad y el extracto abolió la expresión de este, en cuanto a Igf2 ya no se observaron diferencias, esto es algo que no se esperaba sin embargo

debido a que no se han hecho cursos temporales para ver el cambio de expresión de estos genes y sus metilaciones con respecto al tiempo, no es posible hipotetizar que podría estar ocurriendo con la metilación específica. Por tal motivo y de acuerdo con lo que dejan ver nuestros datos hasta este punto el primer mes en el tiempo es clave para empezar a buscar información con respecto al efecto del extracto sobre metilaciones en la región específica del DMR de H19.

Los datos obtenidos del mapeo locus específico de 15 islas CpG que caen dentro del DMR de H19 e Igf2 pasado un mes de administración del extracto se observan a continuación (Fig. 23).

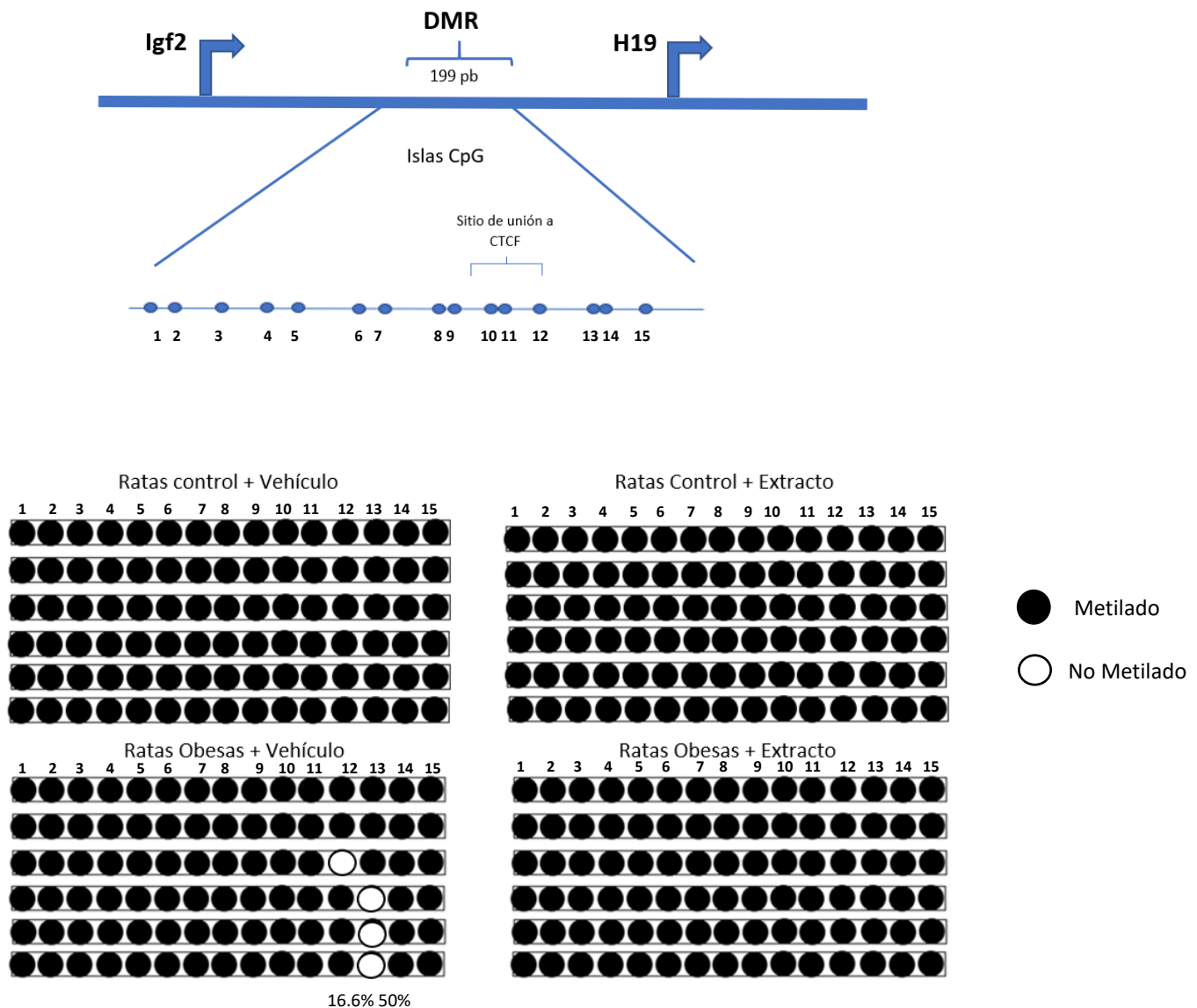


Figura 23. Metilación específica del DMR del locus de H19 e Igf2. Cada renglón representa un individuo con los 15 sitios CpG de estudio que caen en esta región del DMR; los círculos negros corresponden a las metilaciones y los blancos hipometilaciones.

Finalmente, en la figura 23 se observa que la obesidad está produciendo hipometilaciones en un 16.6 % en el sitio 12 del DMR del locus y un 50% de hipometilación en el sitio 13 del locus, cabe mencionar que este es un de zona donde se une CTCF el aislador que modula la expresión tanto de H19 como de Igf2 lo cual puede estar repercutiendo directamente con la expresión. El tratamiento con el extracto mantiene los niveles de metilación iguales a los del control.

7. DISCUSIÓN

Este estudio se centró en investigar la relación entre la infertilidad masculina causada por obesidad y el estado de metilación del DNA de la línea gonadal masculina, así como evaluar el efecto del extracto lipídico de *L. esculentum*. La hipometilación en el DMR del locus H19 e Igf2 se ha correlacionado con infertilidad masculina (Li, XP *et al*; 2012 (Marques, CJ *et al*; 2008). En este estudio se observó que el grupo de animales obesos, objeto de estudio, desarrollaron infertilidad y presentaron hipometilaciones en los sitios CpG 12 y 13 del DMR, con un 18% y un 50% de disminución respectivamente. Es probable que el aumento en la expresión en ambos genes, H19 e Igf2, en el primer mes se relacione con las hipometilaciones que se generaron en los animales obesos ya que este sitio tiene como principal función regular la expresión de estos genes, sin embargo estos datos sugieren que esta regulación se está perdiendo por efecto de la obesidad. En el 2017, Dong *et al*, demostraron que la metilación en el promotor de H19 correlacionaba positivamente con el aumento, en el número y en la motilidad de espermatozoides de paciente con infertilidad.

Las alteraciones tanto en la metilación del DMR como en la expresión de ambos genes fueron revertidas por efecto del extracto transcurrido un mes de administración. El extracto de jitomate tiene como carotenoide principal el licopeno, molécula caracterizada por presentar dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada lo cual le confieren un carácter antioxidante, en las gráficas de correlación de metilación global contra MDA y Nitritos totales (Fig. 21) hay una correlación inversa que fue estadísticamente significativa, lo que sugiere que a mayor metilación global menor estrés oxidativo y viceversa. Estos datos respaldan la hipótesis de que el estrés oxidativo tiene un efecto sobre las metilaciones y una participación en el desarrollo de infertilidad en un estado de obesidad. Un comportamiento similar se ha comprobado en un estudio de Masha Darbandi *et al* en el 2019, donde

demonstraron que un aumento en el estrés oxidativo tiene una correlación inversa con las metilaciones en el promotor de H19 es decir a mayor estrés oxidativo menor metilación, en presencia de un antioxidante como es el del licopeno, se puede estar ejerciendo un efecto indirecto sobre las metilaciones al momento de contrarrestar el daños causado por el estrés oxidativo presente en condiciones de obesidad.

Se observó que ambos genes se sobre-expresan al mismo tiempo probablemente por un mecanismo de autorregulación se esperaba que si uno aumentaba el otro debería bajar, sin embargo esto pasa en condiciones no patológicas, existe otro DMR, DMR1, el cual es más cercano a Igf2 y podría estar regulando la sobreexpresión de este gen de manera independiente del DMR que está regulando la impronta y que se encuentra más cercano a H19 (Christopher, R *et al*; 2001) .Constancia, M *et al* 2000, demostraron que puede presentarse la expresión bialélica de estos dos genes al deletar el DMR1 por lo cual este grupo de investigación ha sugerido que cuando el DMR1 se encuentra mutado en condiciones patológicas se puede presentar este comportamiento aberrante. Por otro lado, el nivel de expresión observado en estos experimentos es únicamente del mRNA y hace falta saber qué pasa con la traducción a proteína.

En los resultados de expresión de H19 se observa que, en el primer mes de administración del extracto, la expresión de H19 en el grupo OV aumenta de manera significativa con respecto a sus controles, y en el grupo OE disminuye la expresión; debido a que H19 tiene una función de proliferación celular a la baja esto podría estar favoreciendo la espermatogénesis. El aumento de expresión de H19 en obesos se podría correlacionar con los resultados histológicos (Fig.8) donde se observa que los túbulos seminíferos se encuentran dañados tanto en la luz del túbulo como en la lámina basal. Por otro lado, se ha reportado que en condiciones de obesidad en varones aumentan los estrógenos de manera importante lo cual puede estar estimulando la sobreexpresión del gen puesto que en el locus de H19 existe un elemento de respuesta a estrógenos, (Saunders *et al*; 1997; Shilpa, P *et al*; 2010).

En el último mes de administración el comportamiento de expresión de H19 disminuyó en el grupo OV y fue más significativo en presencia del extracto, OE. Es probable que este comportamiento sea por el tiempo transcurrido, no hay que olvidar que la dieta alta en carbohidratos se mantuvo hasta el final del experimento y las alteraciones producidas exceso de tejido adiposo continuaron en aumento, por ejemplo, los niveles hormonales. En un estudio realizado por Coolelouri G *et al* en el 2018, se reportó que en presencia de obesidad el receptor de estrógenos gonadal desarrolla resistencia a su ligando, comparando los resultados del presente trabajo es probable que la baja observada en la expresión de H19 sea causada por de la resistencia a estrógenos causada por hiperestrogenismo en condiciones de obesidad por lo cual deja de estimularse la expresión del gen por un aumento en el nivel de los estrógenos. En este experimento no se realizó un seguimiento del nivel de estrógenos con respecto al tiempo; sin embargo; debido a que los daños por obesidad aumentaron, sería conveniente que se analice en futuras investigaciones para poder dilucidar el papel que las hormonas. Cooleouri, G *et a 2018*, comprobó que la resistencia a estrógenos se presenta en individuos obesos que desarrollan hipogonadismo, la misma condición de nuestros animales de estudio al final del tratamiento. La única diferencia con este estudio es que este fue realizado en humanos, 105 hombres obesos con hipogonadismo que tenían como característica principal grasa visceral alta e hiperestrogenismo, se encontró que aquellos individuos con mayor IMC presentaban una baja en la expresión del receptor de estrógenos he incluso dejaban de responder a un tratamiento hormonal para hipogonadismo.

Los resultados obtenidos del ensayo de metilación global constituyen la evidencia de que la obesidad en machos esta desencadenando hipometilación en el ADN del tejido testicular de los animales que presentaron obesidad lo cual quiere decir que la obesidad está produciendo como consecuencias bajas en la metilación global la cual logra revertirse por efecto del tratamiento con el extracto de jitomate. Las hipometilaciones a nivel global en testículo a causa de obesidad ya se han reportado con anterioridad, por ejemplo, Fullstone, T *et al* (2013), realizaron un estudio en el cual se le indujo obesidad a un grupo de ratas con una dieta alta en

grasas durante 10 semanas, a estos animales se les realizó un ensayo de metilación global en el cual se encontró de igual manera hipometilación en el grupo de animales inducidos obesos tanto en el tejido testicular como en células espermáticas, la diferencia entre aquel estudio y el presente trabajo fue la dieta puesto que en este trabajo los animales fueron inducidos a ser obesos con una dieta alta en carbohidratos. Estas hipometilaciones ya se han asociado a problemas de infertilidad en estudios previos tanto en ensayos donde usan secuencias LINE 1 como en ensayos donde usan secuencias de ALU y el resultado es similar, hipometilación en células espermáticas de individuos infértiles o que han tenido embarazos no exitosos. (Benchaib, M *et al*; 2005; Hajj, E *et al*; 2011). Sin embargo, en este estudio además de corroborar el efecto hipometilante en individuos obesos por una dieta alta en carbohidratos se logró ver la disminución de este daño con un mes de tratamiento del extracto de jitomate, es decir, que en un estadio de obesidad determinado puede estarse revirtiendo al menos al primer mes de tratamiento, en cuanto al último mes de tratamiento no se encontró una diferencia significativa, pero la tendencia fue la misma y los animales que recibieron extracto tanto controles como obesos parecen estar teniendo una tendencia de metilación a la alta a diferencia de aquellos que únicamente recibieron vehículo por tal motivo se puede especular que el extracto está teniendo un posible efecto preventivo frente a los daños causados por la dieta que desencadenó obesidad a los animales de estudio.

Finalmente como se pudo observar en el mapeo de las islas CpG, se encontró hipometilación en los sitios específicos 12 y 13 del locus de estudio, en animales con obesidad, una característica importante de este sitio de cambio es la unión de CTCF principalmente a la región de la isla 12 y realizando una búsqueda de los factores de transcripción que se unen a la región de la isla CpG 13 (PROMO versión 8.3 de TRANSFEC.) se encontró que en esta se une Pax 6 (Fig.1 anexa) este es un factor que tiene como principal función promover la proliferación de células en diferenciación y se expresa en células germinales de testículo en roedores, principalmente en células en diferenciación como espermatogonia y espermatocito (Kimura, R *et al*; 2015). Por otro lado, se ha demostrado que existe una correulación entre la unión de CTCF a su DMR y la expresión de Pax 6, es

decir, cuando existe una mayor unión de CTCF a su región reguladora, Pax6 disminuye su expresión en el mismo tejido celular (Jao, J *et al*; 2011).

CTCF regula el acceso de los potenciadores a las regiones promotoras de ciertos genes, cuando se une a su sitio de unión ó al liberarse de este; dicho sitio, puede estar ocupado constitutivamente por metilaciones, es decir, CTCF está fungiendo como un regulador transcripcional de Igf2 y H19, pero también posiblemente de Pax6 (Li, T y col., 2004; 2005; 2006). Es posible que exista un tipo de interacción entre estos dos factores puesto que CTCF es un regulador multifuncional, además de fungir como insulador, produce formación de bucles de cromatina, tiene interacciones proteína-proteína, actúa en el posicionamiento de complejos de cohesina, entre otros (Nicolae, L *et al* 2009) (Fig. 2 anexa). Por tal motivo estos dos factores (CTCF- Pax-6) podrían interactuar de una manera particular, debido a que por sus sitios de unión al ADN en este locus sabemos que están cercanos espacialmente, esto sugiere que podrían estar compitiendo por la unión al ADN o tener una interacción proteína-proteína. El papel que tiene Pax-6 sobre la expresión de H19 aún no es claro, lo que sí se sabe es que este se expresa en el tejido testicular en condiciones no patológicas, y una baja en su expresión está influyendo en el desarrollo de la infertilidad masculina. Para futuras investigaciones es conveniente ver la expresión de Pax-6 en el testículo en condiciones de infertilidad causadas por obesidad, y aunado a esto realizar estudios funcionales que nos permitan dilucidar las diferentes interacciones entre CTCF y Pax6 que podrían desencadenarse por su cercanía en el locus.

8. CONCLUSIONES

- El extracto lipídico de *L. esculentum* revirtió las hipometilaciones causadas por obesidad en las islas específicas 12 y 13 del locus del DMR de H19 e Igf2 a un mes de administración, lo cual sugiere que el extracto está funcionando como un posible modulador epigenético.
- La sobreexpresión de ambos genes fue revertida por la administración del extracto después de un mes de tratamiento, sugiriendo que este está actuando sobre las alteraciones de estos genes que se están presentando a causa de la obesidad.

9.PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar cursos temporales de los niveles hormonales principalmente estrógenos y andrógenos para poder corroborar el importante papel que estos están teniendo en el desarrollo de la infertilidad por obesidad y su influencia sobre la expresión del gen H19.
- Debido a que se encontraron hipometilaciones en sitios específicos del DMR de H19, ahora sería importante medir las metilaciones del DNA en animales que presenten mayor daño por obesidad en el tejido testicular, es decir, animales expuestos a mayor tiempo de dieta y realizar mediciones ahora en células espermáticas maduras del epidídimo para ver si estos cambios se acentúan más en este tipo celular.
- Realizar un modelo de apareamiento entre animales por grupo para evaluar la fertilidad de campo es decir la eficacia reproductiva de estos individuos tratados. Esto nos ayudaría a ver el efecto transgeneracional.
- Finalmente es importante realizar un ensayo funcional que nos permita evidenciar el mecanismo por el cual CTCF y Pax 6 están interactuando. Así como evaluar la expresión de Pax 6 en tejido testicular de animales infértiles por obesidad; debido a que no existen estudios previos sobre la influencia de la obesidad en la expresión de Pax 6, este sería un campo nuevo de estudio.

10. REFERENCIAS

1. Aggerholm, AS; Thulstrup, AM; Toft, G *et al*; (2008). Is overweight o risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile. *Fertil Steril*, 90:619-26
2. Aitken, R; Clarkson, J y Fishel S; (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod*, 40: 183-197.
3. Bakos, HW; Henshaw, RC; Mitchell, M y Lane, M; (2011). Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertil Steril*, 95:1700-4.
4. Bell, AC y Felsenfeld, G (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 405.
5. Benchaib, M; Braun, V; Ressnikof, D *et al*; (2005): Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod*, 20: 768-775.
6. Blik, J; Terhal, P; van den Bogaard, MJ *et al*; (2006). Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet*, 78(4):604-14.
7. Boissonas, CC; Abdalaoui, HE; Haelewyn V *et al*; (2010). Specific Epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *European Journal of Human Genetics*, (18):73–80.
8. Cai, X and Cullenn, BR. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary micro RNA precursor. *RNA*, 13(3):313-6.
9. Chavarro, JE; Toth, TL; Wright, D.L; *et al* (2010). Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*, 93:2222-31.
10. Christopher, R; Kaffer, Alex Grinber, y Karl Pfeifer (2001). Regulatory Mechanisms at the Mouse Igf2/H19 Locus. *Molecular and cellular biology*, 21(23), p. 8189–8196.
11. Colleluori, G; Aguirre, LE; Qualls, C; *et al*; (2018). Adipocytes ESR1 Expression, Body Fat and Response to Testosterone Therapy in Hypogonadal Men Vary According to Estradiol Levels. *Nutrients*, 10, 1226.
12. Constancia, M; Dean, W y Lopes, S *et al*; (2000). Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19. *Nature Genetics*, 26, p. 203-206.
13. Dabaja, AA y Schlegel, PN (2014). Medical treatment of male infertility. *Transl Androl Urol*, 3 (1): 9-16.
14. Doshi, T; D'souza, G; y Vanage *et al* (2013). Aberrant DNA methylation at Igf2–H19 imprinting control region in spermatozoa upon neonatal exposure to

- bisphenol A and its association with post implantation loss. *Mol Biol Rep*, (40):4747–4757.
15. Darbandi, M; Darbandi, S; Agarwal, A; *et al* (2019). Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality. *J Assist Reprod Genet*, 36(2):241-253.
 16. Daxinger, L., y Whitelaw, E; (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet*, **13**, 153–162.
 17. Dong, H; Wang, Y; Zou, Z *et al*; (2017). Abnormal Methylation of Imprinted Genes and Cigarette Smoking: Assessment of Their Association with the Risk of Male Infertility. *Reprod Sci*, 24(1):114-123.
 18. Dohle GR; Diemer, T; Giwercman, A *et al*; (2010). Guía clínica sobre infertilidad masculina. © European Association of Urology.
 19. Du Plessis, SS; McAllister, DA; Luu A *et al*; (2010); Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels and nitric oxide levels. *Andrología*, 42(3):206-210.
 20. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, (2016). Cifras de sobrepeso y Obesidad en México, ENSANUT MC.
 21. Dupont, C; Faure, C; Sermondade, N *et al*; (2013). Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertility patients. *Asian J Androl*, 15(5):622-5.
 22. Fariello, RM; Pariz, JR; Spaine, DM *et al*; (2012). Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*.
 23. Fejes, I; Koloszar, S; Szöllosi, J *et al*; (2005). Is semen quality affected by male body fat distribution; *Andrologia*; 37:155-9.
 24. Fullston, T; Palmer, NO; Owens, JA *et al*; (2012). Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Human reproduct*, 27(5):1391-400.
 25. Fullston, T; E. Maria C. Ohlsson Teague *et al*; (2013) Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA. *The FASEB Journal • Research Communication*, (10):4226-43
 26. Friedman, M. (2002). Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21):5751–5780.
 27. Gabory, A; Jammes, H y Dandolo, L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *BioEssays*, 32(6), 473–480.
 28. Gao, J; Wang, J; Wang, Y *et al*; (2011). Regulation of Pax6 by CTCF during Induction of Mouse ES Cell Differentiation. *PLoS ONE*, 6(6).
 29. Goto, T y Monk, M. (1998). Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2):362-78.
 30. Haeri, S; Minaie, B; Amin, G *et al*; (2006). Effect of Satureja khuzestanica essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia*, 77:(7-8).

31. Hajj, El; N., Zechner, U., Schneider, E *et al*; (2011). Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev*, 5, 60–69.
32. Handelsman DJ y Swerdolff RS.(1985). Male gonadal dysfunction. *Clin Endocrinol Metab*, 14(1):89-124.
33. Hamada, A.J; Montgomery, B y Agarwal, A. (2012). Male infertility: a critical review of pharmacologic management. *Expert Opin. Pharmacother*,13(17).
34. Hammoud, AO; Wilde, N; Gibson, M *et al*; (2008). Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*, 2 (90) :2222-5.
35. Hofny, ER; Ali, ME; Abdel-Hafez, HZ *et al*; (2010). Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril*, 94:581-4.
36. Jarow, JP. (1993). Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil Steril*, 60(6):1035-9.
37. Jarow, JP; Kirkland, MD; Koritnik, DR *et al.*, (1993). Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology*, 42(2): p. 171-4.
38. Jensen, TK; Andersson, AM; Jørgensen, N *et al*; (2004). Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among, Danish men. *Fertil Steril*, 82:86370.
39. Jungwirth, A y Diemert, T *et al*; (2016). European Association of Urology Guidelines on Male Infertility; *Eur. Urol.*; p.8.
40. Kelkel, M; Schumacher, M; Dicato, M y Diederich, M. (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free radical research*, 45(8): 925–940.
41. Kimura,R; Yoshizaki, K; y Osumi, N. (2015). Dynamic expression patterns of Pax6 during spermatogenesis in the mouse. *J. Anat*, 227, pp1—9.
42. King Batoon, A; Leszczynska, JM y Klein, CB. (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cell. *Environ Mol Mutagen* 49(1):36-45.
43. Koloszar, S; Fejes, I, Závaczki, Z *et al*; (2005). Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males. *Arch Androl*, 51:299-304.
44. Kort, HI; Massey, JB; Elsner, CW *et al*; (2006). Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*; 27:450-2.
45. Kriegel, TM; Heidenreich, F; Kettner, K *et al*, (2009). Identification of diabetes- and obesity-associated proteomic changes in human spermatozoa by difference gel electrophoresis. *Reprod Biomed Online*, 19:660-70
46. Li Juan Fu; Wu LX; Wen CJ *et al*; (2014). The Effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP. *Int J Endocrinol*, 620 :165.
47. Li, T.; Lu, Z y Lu, L. (2004). Regulation of eye development by transcription control of CCCTC binding factor (CTCF). *J. Biol. Chem.*, 279, 27575-27583.

48. Li, T y Lu, L. (2005). Epidermal growth factor-induced proliferation requires down-regulation of Pax6 in corneal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 12988-12995.
49. Li, T.; Lu, Z y Lu, L. (2006). Pax6 regulation in retinal cells by CCCTC binding factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47: 5218-5226.
50. Liu, Y y Ding, Z. (2017). Obesity a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction*, 154(4): R123-R131.
51. Li, XP; Hao, CL; Wang, Q *et al*; (2016). H19 gene methylation status is associated with male infertility. *Exp Ther Med.* 12(1):451-456.
52. Majzoub, A; y Agarwal, A; (2018). Systemic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters advanced sperm function, assisted reproduction and live birth rate. *Arab journal of Urology*, 16: 113-124
53. Magnúsdóttir, EV; Thorsteinsson, T; Thorsteinsdóttir, S *et al*; (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod*; 20:208-15.
54. Marques, CJ; Costa, P; Vaz, B *et al*; (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*; 14(2):67–74.
55. Ni, K; Spiess, A; Schuppe, H y Steger, K. (2016); The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *ANDROLOGY-US*; 4(5):789-799.
56. Nicopoulou, SC; Alexiou, M; Michalakis, K *et al*; (2009). Body mass index vis-à-vis total sperm count in attendees of a single andrology clinic. *Fertil Steril*, 92:1016-7.
57. Nikolaev, LG; Akopov, SV; Didych, DA and Sverdlov, ED. (2009). Vertebrate Protein CTCF and its Multiple Roles in a Large-Scale Regulation of Genome Activity. *Current Genomics*, 10, 294-302
58. Nguyen, RH; Wilcox, AJ; Akjaerven, R y Baird, DD. (2007). Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod*, 22(9):2488-93.
59. Oakes, CC; La salle, S; Smiraglia, DJ *et al*; (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology*, 307 368–379.
60. Ocegueda, SE y Morenoy, PK. (2005). Plantas utilizadas en Medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, 62:12-15.
61. Ooi, SL y Henikoff, S. (2007). Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol*, 19(3):257-65.
62. Pacheco, SE; Ouseman, EA; Christensen, B.C *et al*, (2011). Integrative DNA Methylation and Gene Expression Analyses Identify DNA Packaging and Epigenetic Regulatory Genes Associated with Low Motility Sperm. *PLoS ONE* 6(6).

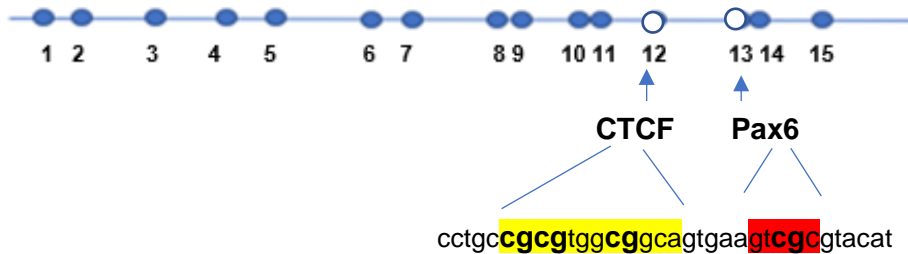
63. Palma, CV y Vinay, JI. (2014). Infertilidad Masculina. *Rev. Med. Clin. Condes*, 25(1) 122-128.
64. Palmer, NO; Bakos, WH; Fullstone T; Lane, M. (2012). Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*, 2(4), 253-263.
65. Paparella, V; Pavesi, R; Feldman, RN y Bouvet, BR. (2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Arch Med Interna*, 37(1):07-
66. Paasch, U; Grunewald, S; Kratzsch, J *et al* (2010). Obesity and age affect male fertility potential. *Fertil Steril*, 94:2898-901.
67. Pathak, S; Saxena, M; Souza RD *et al*; (2010). Disrupted imprinting status at the H19 differentially methylated region is associated with the resorbed embryo phenotype in rats. *Reproduction, Fertility and Development*, (22), 939–948.
68. Pauli, EM; Legro, RS; Demers, LM *et al* (2008). Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril*, 90:346-51.
69. Peris, S; Bilodeau, J; Dufour y M; Bailey, J. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev*, 74: 878-892.
70. Perveen, R; Suleria, HA; Anjum, FM *et al*; (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:7, 919-929.
71. Qin DD, Yuan W, Zhou WJ, *et al*; (2007). Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality Asian; *J Androl*; 9:827-34.
72. Rajender, S; Avery, K y Agarwal, A. (2011). Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res*, 727(3):62-71.
73. Reig, G ; Concha, M. (2012). Impronta Genómica y Desarrollo Embrionario, *Int. J. Morphol.*, 30(4):1453-1457.
74. Ruwanpura, SM; McLachlan, RI y Meachem, SJ. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*, 205:117-31.
75. Rybar, R; Kopecka, V; Prinosilova, P *et al*; (2011). Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia*; 43:286-91.
76. Schagdarsurengin, U; Western, P; Steger, K *et al*; (2016). Developmental origins of male subfertility: role of infection inflammation, and environmental factors. *Semin Immunopathol*, 38(6):765-781.
77. Sekhavat, L y Moein, MR. (2010). The effect of male body mass index on sperm parameters. *Aging Male*, 13:155-8; PMID:20059435.

78. Shayeb, AG; Harrild, K; Mathers, E *et al*; (2011). An exploration of the association between male body mass index and semen quality. *Reprod Biomed Online*, 23:717-23.
79. Shilpa, P; D' Souza, M; Ankolkar, M *et al*; (2010). Potential role of estrogen in regulation of the *Insulin-like growth factor2–H19* locus in the rat testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314 (1), p. 110-117
80. Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P *et al*; (2008). Hormonal Regulation of Spermatogenesis and Spermiogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 109, 323-330.
81. Stewart TM, Liu DY, Garrett C, *et al* (2009). Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile Australian men: inverse relationship between obesity and sperm output. *Hum Reprod*; 24:1561-8;
82. Story, EN, Kopec, RE, Schwartz, SJ, y Harris, G. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual review of food science and technology*, 1, 189–210.
83. Strain, GW; Zumoff, B; Kream, J *et al*. (1982). Mild Hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism*, 31:871-5.
84. Schnekenburger, M y Diederich, M. (2015). Epigenetic cancer therapy; Chapter 18 Nutritional Epigenetic Regulators in the Field of Cancer: New Avenues for Chemopreventive Approaches. *Academic Press*; p. 393-425.
85. Song, Y y Yang. L. (2018). Transgenerational impaired spermatogenesis with sperm H19 and Gtl2 hypomethylation induced by the endocrine disruptor p,p'-DDE. *Toxicology Letters*. S0378-4274(18)31813-7.
86. Stahl, PJ; Stember, DS, Goldstein, M. (2012). Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med*; 63:525-40.
87. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*; 43:121-8.
88. Tahvilzadeh, M; Hajimahmoodi, M; Toliyat *et al*. (2016); An evidence- based approach to medicinal plants for the treatment of sperm abnormalities in traditional Persian medicine. *Andrologia*, 48: 860–879.
89. Vazquez Mendoza, LE. (2018). Evaluación del efecto del extracto lipídico de *Lycopersicum esculentum* sobre las alteraciones espermáticas en ratas inducidas obesas con una dieta alta en carbohidratos (Tesis de licenciatura). CINVESTAV sede sur; CDMX.
90. Verderrame, M; *et al* (2018). Role of estrogen receptors, P450 aromatase, PCNA and p53 in high-fat-induced impairment of spermatogenesis in rats. *C.R Biologies*.
91. Waddington, CH. (1942). The epigenotype. *Int J Epidemiol*, 41(1):10-3.

92. Weksberg, R, Shuman, C, Y Smith, AC. (2005). Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 137(1), 12–23.
93. World Health Organization. (2020, April 1)
94. World Health Organization. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, Fertility and Infertility, 92 (5).
95. World Health Organization (2000). *Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple.*, Cambridge University Press: Cambridge.
96. Xiang-Hong Ou; Cheng-Cheng Zhu; Shao-Chen Sun, *et al*; (2018). Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *J Cell Physiol*; 1–9.
97. Youngson, NA y Whitelaw, E. (2011). The effects of acquired paternal obesity on the next generation. *Asian J Androl*; 13(2):195-6.
98. Zeb, A y Mehmood, S; (2004). Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications. Pakistan. *Journal of Nutrition*, 3(3), 199-204.

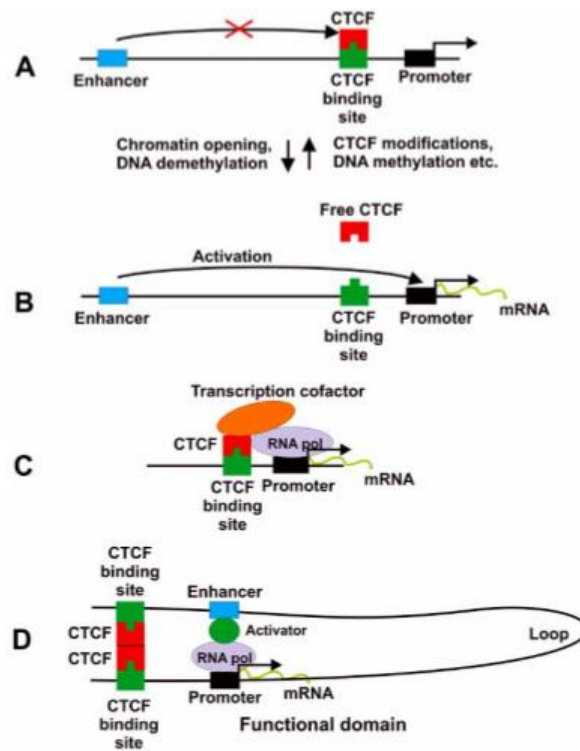
11. ANEXOS

Sequence; HOXA3 [T00378]; 35; 39; 3.363709; TACAT; 0.11719; 0.07916;
 Sequence; MATAalpha2 [T00487]; 34; 39; 0.372206; GTACAT; 0.02930; 0.00963;
 Sequence; Pax-5 [T00070]; 13; 19; 2.081721; GCGTGGC; 0.00732; 0.01269;
 Sequence; Pax-5 [T00070]; 32; 38; 10.501356; GCGTACA; 0.00977; 0.01902;
 Sequence; Pax-6 [T00682]; 29; 33; 1.871542; GTCGC; 0.31250; 0.36908
 Sequence; Msx-1 [T02072]; 15; 17; 0.000000; GTG; 0.62500; 0.72750;
 Sequence; Msx-1 [T02072]; 24; 26; 0.000000; GTG; 0.62500; 0.72750;
 Sequence; Pax-2a [T00678]; 21; 27; 4.007279; GCAGTGA; 0.02197; 0.02295;
 Sequence; DRF1.1 [T05835]; 17; 26; 11.599565; GGCGGCAGTG; 0.00198; 0.00832;
 Sequence; DRF1.3 [T05837]; 17; 26; 11.599565; GGCGGCAGTG; 0.00198; 0.00832;



Anexa 1 Búsqueda de los factores de transcripción que se unen al a la secuencia específica del sitio CpG 13.

http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3 y Bell, A *et al* 2000.



Anexa 2. Posible mecanismo de expresión de genes con la participación de CTCF

(Tomado de Nicolaev *et al*, 2009).

- A) Regulación de acceso de enhancers a las regiones promotoras, uniéndose a su sitio localizado entre enhancer y el promotor.
- B) Separarse de su sitio de unión ocupado generalmente por metilaciones
- C) CTCF funcionando como proteína de anclaje que recluta otros elementos reguladores
- D) Capacidad de CTCF de formar di o multimeros que interactúan con tres proteínas de unión al ADN



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Copia del Acta, inscrita a fojas treinta y dos del Libro Centésimo Quincuagésimo, del Examen Final presentado por la C. Iliana Bayarte Ruano para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental.

En la Ciudad de México, a los doce días del mes de agosto del año dos mil veinte, se reunieron, mediante videoconferencia, por el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional: la doctora Carolina López Rubalcava y la doctora Guadalupe Bravo, ambas investigadoras titulares del mencionado Departamento; y, como sinodales invitados por el Centro, el doctor Francisco Javier Jiménez Trejo, Investigador en Ciencias Médicas del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría; y el doctor Bladimir Roque Ramírez, Investigador en Ciencias Médicas del Laboratorio de Nutrigenética y Nutrigenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, a fin de efectuar el Examen Final que para obtener el grado de Maestra en Ciencias sustentó la C. Iliana Bayarte Ruano.

La C. Iliana Bayarte Ruano presentó la tesis titulada: "Cambios en el patrón de metilación del DMR del locus H19 e Igf2 en el testículo de ratas obesas y tratadas con el extracto lipídico de *Lycopersicon esculentum*", que fue desarrollada bajo la dirección de la doctora Guadalupe Bravo y del doctor Bladimir Roque Ramírez.

Con fundamento en los resultados de este examen, el Jurado dictaminó que la C. Iliana Bayarte Ruano aprobó el Examen Final para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental.

Carolina López Rubalcava

Guadalupe Bravo

Francisco Javier Jiménez Trejo

Bladimir Roque Ramírez

El Director General del Centro certifica que las firmas que anteceden son auténticas.

José Mustre de León

Emilio Javier Galván Espinosa

CINVESTAV
FARMACOBIOLOGIA
COORDINACION
ACADEMICA

"El presente documento cuenta con la firma del Dr. Emilio Javier Galván Espinosa, Coordinador Académico del Programa de Maestría del Departamento de Farmacobiología, quien certifica que las firmas que aparecen en esta acta provisional son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella."