

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE NUTRICIÓN

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA
UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN
RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

TESIS

Para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

L.N. Mayra Castillo Ortega

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Delia Vanessa López Guerrero

CODIRECTOR:

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

Dra. María Alejandra Terrazas Meraz

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa en la realización de esta tesis:

A mi asesora de tesis, Dra. Delia Vanessa López Guerrero, por brindarme la confianza necesaria para desarrollar este proyecto y por guiarme con calidez a lo largo de todo el proceso. Su apoyo incondicional y sus palabras de aliento fueron fundamentales para mi crecimiento y desarrollo académico.

A mi codirector, Dr. Gustavo Pedraza Alva, por sus valiosas aportaciones y por siempre estar dispuesto a atender mis dudas. Su conocimiento y su disposición para ayudarme fueron de gran valor en este proceso.

Al Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama, por la hospitalidad brindada en su laboratorio, por su paciencia y por las importantes contribuciones que hizo a mi investigación. Su apoyo fue fundamental para el éxito de este trabajo.

A la Dra. Dolores Azucena Salazar Piña y a la Dra. María Alejandra Terrazas Meraz, por sus valiosas aportaciones y correcciones en cada uno de los tutorales. Su guía y consejos fueron de gran importancia para mejorar la calidad de esta tesis.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Tomás Villaseñor Toledo por su apoyo invaluable con la inducción de obesidad en los ratones y en la realización de las cruces. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por su valioso tiempo, apoyo y colaboración. Sin ustedes, este trabajo no habría sido posible

**Dedico este trabajo a las personas que han sido mi mayor
inspiración y apoyo a lo largo de esta travesía:**

A mi esposo, José Alfredo Arreola Nieto, por su apoyo incondicional, por motivarme a ser una mejor persona cada día y por brindarme palabras de aliento cuando más las necesitaba. Tu amor constante y tus palabras alentadoras han sido mi base en los momentos más difíciles. Agradezco sinceramente tu presencia constante y tu apoyo incondicional en cada paso del camino.

A mi hijo, Axel Daniel, por ser mi motivación y el motor que impulsa cada uno de mis esfuerzos. Tu amor y tu sonrisa han sido mi mayor fuerza para seguir adelante.

A mi familia, en especial a mi madre y mi hermana, por ser mi fuente de inspiración, mi motivación constante y el mejor ejemplo de perseverancia. Su amor incondicional y su apoyo inquebrantable han sido pilares fundamentales en mi vida y en este logro.

Este trabajo está dedicado a ustedes con todo mi amor y gratitud. Gracias por ser mi luz en el camino.

Este trabajo se realizó en laboratorio de Neuroinmunología en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina, y en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. La alumna recibió una beca para estudios de maestría por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT), No. de beca 1145984.

RESUMEN

La obesidad, definida como una acumulación excesiva de tejido graso en el organismo, es una compleja condición médica que se considera un problema de salud pública global. Asociada con enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, enfermedades cardíacas, hipertensión y ciertos tipos de cáncer, la obesidad afecta la salud en todas las etapas de la vida, generando un estado de inflamación crónica que puede alterar la respuesta inmune. Durante el embarazo, la obesidad materna puede tener impactos significativos en la salud del feto, incluso en el desarrollo del sistema inmunológico, lo que se refleja en un mayor riesgo de problemas inmunológicos en la descendencia.

Investigaciones recientes han demostrado que los hijos de madres obesas pueden tener un mayor riesgo de alergias, asma y enfermedades autoinmunes. Además, se ha sugerido que la obesidad materna influye en la programación fetal del sistema inmunológico, lo que puede tener repercusiones a largo plazo en su capacidad para combatir infecciones. En el presente proyecto, utilizamos un modelo murino de obesidad usando ratones C57BL/6 para evaluar el impacto de la obesidad de los padres sobre la eficacia de la vacuna contra el virus de la influenza en su descendencia. Los resultados indicaron que los ratones descendientes de padres con obesidad mostraron una respuesta inmune deficiente frente al virus, incluso después de ser vacunados, lo que impactó negativamente la morbilidad y supervivencia. Con los resultados obtenidos se destaca la importancia de abordar la obesidad de manera integral y considerar su impacto a largo plazo en la salud de la descendencia. Se sugiere evaluar marcadores inmunológicos en las crías de padres obesos desde el nacimiento para determinar el grado de inflamación y prevenir posibles complicaciones. En conclusión, comprender y abordar la obesidad materna es fundamental para mejorar la salud de las generaciones futuras.

ABSTRACT

Obesity, defined as an excessive accumulation of fatty tissue in the body, is a complex medical condition considered a global public health problem. Associated with chronic diseases such as type 2 diabetes, heart diseases, hypertension, and certain types of cancer, obesity affects health at all stages of life, generating a state of chronic inflammation that can alter the immune response. During pregnancy, maternal obesity can have significant impacts on fetal health, including the development of the immune system, leading to a higher risk of immune-related issues in the offspring. Recent studies have shown that children of obese mothers may have a higher risk of allergies, asthma, and autoimmune diseases. Additionally, it has been suggested that maternal obesity influences the fetal programming of the immune system, which may have long-term implications for its ability to fight infections. In this project, we used a murine model C57BL/6 obese mice and their offspring to evaluate the efficacy of the influenza virus vaccine. The results indicated that mice offspring of obese parents exhibited a deficient immune response to the virus, even after vaccination, negatively impacting morbidity and survival. The obtained results highlight the importance of addressing obesity comprehensively and considering its long-term impact on offspring health. It is suggested to evaluate immunological markers in offspring of obese parents from birth to determine the degree of inflammation and prevent potential complications. In conclusion, understanding and addressing maternal obesity is essential for improving the health of future generations.

Índice

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	XII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Sobrepeso y Obesidad	1
1.2 Embarazo y obesidad	5
1.3 Cambios placentarios asociados a la obesidad materna	10
1.4 Programación fetal	12
1.5 Sistema inmune	14
1.6 Respuesta inmune innata	17
1.7 Respuesta inmune adaptativa	18
1.8 Sistema inmune frente a infecciones virales	19
1.9 Inmunidad neonatal	21
1.9.1 Sistema inmune innato neonatal	22
1.9.2 Sistema inmune adaptativo neonatal	23
1.10 Virus Influenza	24
1.10.1 Ciclo de replicación del virus de influenza	28
1.11 Vacunas contra la Influenza	32
1.12 Infección por el virus Influenza y Obesidad	36
1.13 Modelos murinos de obesidad y sistema inmune	38
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
4.1 Objetivo general:	43
4.2 Objetivos específicos	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44

5.1	Diseño de estudio y universo de trabajo	44
5.2	Modelo de estudio	44
5.3	Inducción de obesidad	45
5.4	Prueba de tolerancia a la glucosa	46
5.5	Medición de parámetros lípidos en suero.....	47
5.6	Toma de muestra de suero para medición de anticuerpos	47
5.7	Vacunación	48
5.8	Infección con el virus Influenza.....	49
5.9	Análisis de la producción de anticuerpos específicos.	50
5.10	Análisis estadístico.....	51
6.	RESULTADOS	51
6.1	Parámetros metabólicos de los progenitores.....	51
6.2	Parámetros metabólicos y respuesta inmunológica de la progenie	56
6.3	Respuesta inmunológica de los progenitores	64
7.	DISCUSIÓN.....	70
8.	CONCLUSIONES	80
9.	PERSPECTIVAS	81
11.	REFERENCIAS	82
	ANEXO I: PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1	Posibles mecanismos que influyen en el riesgo de obesidad en los hijos de madres con obesidad.	9
Figura 2	Diafonía materno-placentaria y crecimiento fetal. Debido	11
Figura 3	Estructura del virus de influenza	26
Figura 4	Mecanismo de evolución del virus de influenza	27
Figura 5	Ciclo de replicación del virus de influenza	31

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Gráfica 1	Comparación del peso promedio en ratones progenitores con dieta control y dieta alta en grasa (DAG).	52
Gráfica 2	Curva de tolerancia oral a la glucosa en ratones progenitores con dieta control (DAG).	53
Gráfica 3	Comparación de los niveles medios de glucosa y perfil lipídico entre ratones progenitores alimentados con dieta control (normopeso) y dieta alta en grasa (obesidad).	54
Gráfica 4	Comparación del peso promedio en ratones descendientes de progenitores con dieta control y dieta alta en grasa (DAG).	56
Gráfica 5	Pérdida de peso post-infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2 en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad.	58
Gráfica 6	Tasa de supervivencia post-infección en ratones retados con virus de influenza H3N2 descendientes de progenitores con normopeso y obesidad.	60
Gráfica 7	Comparaciones de la respuesta a la vacunación en ratones descendientes de progenitores con normopeso y	61

obesidad.

Gráfica 8	Anticuerpos específicos contra influenza H3N2 en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad, divididos en grupos vacunados y no vacunados con la vacuna trivalente contra influenza.	63
Gráfica 9	Pérdida de peso post-infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2 en ratones progenitores con normopeso y obesidad.	66
Gráfica 10	Tasa de supervivencia post-infección con el virus de influenza H3N2 en ratones normopeso y obesidad (progenitores).	67
Gráfica 11	Anticuerpos séricos específicos contra influenza H3N2 en ratones normopeso y con obesidad, divididos en grupos vacunados y no vacunados con la vacuna trivalente	69

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla 1	Propiedades de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.	16
Tabla 2	Parámetros nutricionales de dieta control y dieta alta en grasa	46
Tabla 3	Descripción de los grupos experimentales en ratones descendientes	49
Tabla 4	Descripción de los grupos experimentales en ratones progenitores	49

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CD: Células dendríticas

DAG: Dieta alta en grasa

DAMS: Patrones moleculares asociados a daño

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

ECV: Enfermedades cardio vasculares

EE. UU: Estados Unidos de América

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

HA: Hemaglutinina

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

IAV: Virus de influenza A

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IMC: Índice de masa corporal

INF- γ : Interferón gamma

IOM: Instituto de Medicina

LPS: Lipopolisacáridos

MCH I: Complejo mayor de histocompatibilidad clase I

MHCII: Complejo mayor de histocompatibilidad clase II

NA: Neuroaminidasa

NK: Células asesinas naturales

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPS: Patrones asociados a patógenos

PCR: Proteína C reactiva

T CD4: Linfocito T colaboradores CD4

T CD8: Linfocitos T citotóxico CD8

TDHA: Déficit de desarrollo cognitivo

TLR: Receptores Tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

UCI: Unidad de cuidados intensivos

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

1. ANTECEDENTES

1.1 Sobrepeso y Obesidad

En la actualidad la obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS): “El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (1). La obesidad induce una inflamación crónica de bajo grado que se caracteriza, por niveles elevados de mediadores inflamatorios, como: Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Factor de necrosis tumoral (TNF) Proteína C Reactiva (PCR) (2). Se asocia con el desarrollo y mantenimiento de múltiples comorbilidades, que incluyen, Enfermedades Cardiovasculares (ECV), Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), dislipidemias, aterosclerosis, hipertensión arterial y trastornos psicológicos (3). El patrón de referencia para el correcto diagnóstico es la medición de grasa corporal, sin embargo, el Índice de Masa Corporal (IMC), es un parámetro útil y ampliamente utilizado para identificar sobrepeso y obesidad en adultos, como un indicador de la relación entre el peso y la talla, el cual se calcula dividiendo el peso del individuo en kg por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). La OMS determina sobrepeso y obesidad con la siguiente clasificación: sobrepeso con IMC igual o superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesidad un IMC igual o superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$, a su vez, la obesidad se subclasifica en: obesidad grado I: $30\text{-}34,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesidad II: $35\text{-}39,9 \text{ kg}/\text{m}^2$, obesidad III: $40 \text{ kg}/\text{m}^2$ o más (4).

Durante las últimas tres décadas, la prevalencia global de sobrepeso y obesidad ha aumentado, progresado a dos tercios en los adultos. En 2015, el 10.8 % de todas las muertes en el mundo fueron atribuibles al sobrepeso, cifra que aumentó al 12.3 % en 2016. En México, se ha documentado que varias comorbilidades asociadas con la obesidad contribuyeron a una proporción significativa de la muerte, discapacidad y muerte prematura en la población durante las últimas dos décadas. Como resultado, la obesidad es considerada actualmente como uno de los principales problemas de salud pública en el país (5).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2021 revela que 7.8% de los niños menores de 5 años tienen sobrepeso, en la población de 5 a 11 años la prevalencia nacional de sobrepeso fue de 18.8% y 18.6% de obesidad y va en incremento conforme aumenta la edad, en la población de 12 a 19 años el 24.7% tiene sobrepeso y el 18.2% obesidad. En adultos mayores de 20 años reportó que el 72.4% de la población adulta presenta sobrepeso u obesidad (35.7% sobrepeso y 36.7% obesidad (5).

Debido a la gran relevancia de la obesidad como problema de salud a nivel mundial, resulta importante conocer los principales factores ambientales y socioculturales asociados al desarrollo de obesidad. Entre los factores que determinan el desarrollo de la obesidad incluyen: Psicológico y conductual (alimentación, actividad física, alcohol, tabaquismo, estrés), demográfico (género, edad, etnia), socioeconómico (estado civil, profesión, educación) predisposición

genética y el uso de algunos fármacos (6). Generalmente, los factores que determinan el desarrollo de la obesidad interactúan entre sí, provocando el desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, procedente principalmente de hidratos de carbono, proteínas y grasas. La obesidad generalmente es ocasionada por un consumo en exceso de energía, dando como resultado un balance energético positivo que puede resultar en la acumulación de grandes cantidades de ácidos grasos al interior de los adipocitos, dicha acumulación puede causar hiperplasia (aumento en número) o hipertrofia (aumento en tamaño) del tejido adiposo, la hipertrofia del adipocito y la pérdida de la capacidad de almacenamiento de grasa ocasiona un aumento de las señales proinflamatorias del huésped y desregula la homeostasis del sistema inmune (7,8). En respuesta a estas modificaciones del tejido adiposo se induce un estado hipóxico, interfiriendo el suministro de sangre a los adipocitos. La hipoxia dentro del tejido adiposo induce la necrosis provocando la infiltración de macrófagos que inician un proceso inflamatorio para eliminar las células muertas y retirar su contenido lipídico (8,9). El aumento de macrófagos juega un papel decisivo en fenotipo de los linfocitos acumulados por el proceso inflamatorio. En este aspecto, en las personas con normopeso la mayor cantidad de macrófagos que reside en el tejido adiposo son del tipo M2, los cuales secretan citocinas mayoritariamente antiinflamatorias como la IL-10, esencial en mantener la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo (10). En individuos con obesidad, la mayoría de los macrófagos cambian a un fenotipo M1 que promueven la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-12). Los macrófagos se diferencian a M1 cuando

son activados por PAMPS (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) como LPS (Lipolisacáridos) o por DAMS (Patrones Moleculares Asociados a Daño Celular) así como por citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF. En este proceso inflamatorio además de los macrófagos M1, intervienen otras subpoblaciones de leucocitos (linfocitos T CD8, linfocitos T CD4 Th1, linfocitos B y granulocitos). Se infiltran en el tejido adiposo hipertrófico, al mismo tiempo que se observa una reducción de las células T reguladoras, lo que contribuye a que estas células se activen y secreten citocinas (TNF, INF γ , IL-6), que amplifican la respuesta inmunológica y con esto la inflamación local (8,11).

El tejido adiposo, constituye el tejido endocrino más grande del individuo y se comunica con otros tejidos constantemente mediante la producción de moléculas liberadas por los adipocitos, las citocinas proinflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6 y hormonas como leptina, adiponectina, cuyos efectos y secreción están influenciados por la cantidad y distribución de tejido adiposo (12). En el caso de la leptina encargada de regular la ingesta de alimentos y del gasto energético accionando receptores hipotalámicos. Los adipocitos secretan leptina de forma proporcional a la masa grasa, es decir que mayor cantidad de tejido adiposo, aumenta la producción de leptina, la cual se encuentra relacionada también con el aumento de citocinas proinflamatorias, y en el caso de las personas con obesidad, existe una clara resistencia a la leptina exacerbando la ingesta de alimentos. Por otro lado, la adiponectina es una hormona con efectos antiinflamatorios, antiaterogénicos y sensibilizantes a la insulina, participa en la reprogramación de

macrófagos de M1 a M2, inhibición de señales mediada por receptores Toll-like (TLR). Esta hormona se ve disminuida en personas con obesidad, lo que contribuye a una mayor infiltración de células inmunitarias, fomentando el desarrollo de inflamación sistémica de bajo grado (11).

1.2 Embarazo y obesidad

La obesidad gestacional es un problema importante de salud pública, reconocida por las complicaciones a corto y a largo plazo en la salud materna e infantil, el sobrepeso y obesidad durante la gestación se evalúa utilizando el índice de masa corporal (IMC) previo al embarazo, por lo que un IMC mayor a 25 kg/m², se considera sobrepeso y un IMC mayor 30 kg/m² se considera obesidad. La ganancia de peso gestacional recomendada según los estándares internacionales del *Institute of Medicine* (IOM) de EE. UU. es de siete a once kg para sobrepeso y en obesidad es de cuatro a nueve kg al término del embarazo (13,14). Pese a estas recomendaciones, la prevalencia de obesidad gestacional está aumentando rápidamente en todo el mundo, en México se estima que la prevalencia va desde 17.6 a 27.7%, es decir, la obesidad afecta actualmente a aproximadamente un tercio de las mujeres en edad reproductiva, lo que se traduce en una alta prevalencia de obesidad durante el embarazo (13).

En general, el aumento de la obesidad en la población se refleja también en los adultos en edad reproductiva, lo que significa que uno o ambos padres no están en las mejores condiciones metabólicas al momento de procrear, por lo que

exponen al producto de esta gestación a factores se encontrará expuesto a factores metabólicos alterados y un ambiente inflamatorio de bajo grado. Este fenómeno se le conoce como “programación metabólica fetal”, el entorno en el que se desarrolla un individuo tiene un impacto en sus características morfo fisiológicas, por tal motivo se han realizado estudios donde se expone que el sobrepeso, la obesidad y el aumento de peso excesivo durante la gestación se asocia a múltiples complicaciones tanto para la madre como para su descendencia (15). El término de programación fetal se define como el proceso de adaptación en el que la nutrición y factores ambientales alteran las vías de desarrollo durante el crecimiento prenatal induciendo cambios en el metabolismo posnatal aumentando la susceptibilidad del desarrollo de enfermedades crónicas en la edad adulta (16). La teoría de Baker y Hale, propone que la programación metabólica fetal está involucrada en las adaptaciones fetales que propician cambios permanentes en la estructura y fisiología del crecimiento y desarrollo fetal (16,17).

Un embarazo saludable implica cambios significativos en el sistema inmunológico de la madre para apoyar el embarazo, lo que se caracteriza por un estado inflamatorio crónico de bajo grado, también conocido como "metainflamación", que se caracteriza principalmente por elevaciones leves de citocinas proinflamatorias en el suero. Sin embargo, los estudios también muestran que una inflamación excesiva no es compatible con un embarazo saludable, la obesidad y el embarazo contribuyen de manera funcional a un estado inflamación, que puede ser perjudicial para la madre y el feto (2,18). La respuesta inflamatoria durante el

embarazo es altamente regulada y ocurre en diferentes etapas del embarazo, siendo parte del proceso de placentación, implantación y finalmente en el parto (19). Los marcadores inflamatorios durante el embarazo se relacionan con el crecimiento fetal y a largo plazo adiposidad en la descendencia, se ha demostrado que padecer obesidad durante el embarazo se asocia con una mayor producción de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF, proteína C reactiva, mayor infiltración de macrófagos y reducción del flujo sanguíneo placentario que da lugar a una deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo y agudiza la inflamación placentaria. y transporte de nutrientes, afectando el desarrollo del sistema inmunológico, dando como resultado una salud fetal deficiente ante los retos antigénicos y el desarrollo de trastornos inmunopatológicos como el asma y alergias (Revisado en 15,20).

El sobrepeso y obesidad antes durante el embarazo puede agravar el estado inflamatorio natural característico de un embarazo saludable, dando resultados perjudiciales para la madre como: diabetes mellitus gestacional (DMG), DM2, hipertensión/ preclamsia, parto prematuro <28 semanas de gestación, riesgos perinatales (partos inducidos, partos postérminos, cesárea). Por otro lado, también se reconocen complicaciones asociadas al sobrepeso y obesidad para el feto, entre ellos: mayor incidencia de mortinatos, macrosomía fetal, defectos cardiacos y defectos del tubo neural (15). Los niños nacidos de mujeres que iniciaron su embarazo con sobrepeso, obesidad y/o aumento de peso gestacional excesivo tienen un riesgo mayor de sufrir obesidad, déficit de desarrollo cognitivo (TDHA),

DM2, enfermedades cardiovasculares y cáncer a largo plazo (15,21). Dichas enfermedades están vinculadas a procesos inflamatorios de bajo grado y estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que sugiere que la obesidad materna está fuertemente asociada con el desarrollo de hiperinsulinemia, dislipidemias, presión arterial alta, deterioro de la función endotelial, inflamación de bajo grado y cambios importantes en el transporte de nutrientes hacia la circulación fetal. Este último conduce a una reprogramación metabólica, hormonal e inmunológica (22,23).

Uno de los potenciales mecanismos que relacionan la obesidad materna con mayor susceptibilidad de la descendencia es que los receptores de la insulina son mucho más abundantes en los trofoblastos maternos. La hiperinsulinemia asociada a la obesidad resulta en una respuesta diferente de los trofoblastos de la placenta, en donde se ha observado que hay una disminución en los genes sensibles a la insulina y que regulan el ciclo celular y la homeostasis del colesterol en las vellosidades placentarias de las mujeres obesas durante el primer trimestre (21). Mujeres con obesidad al principio y final del embarazo presentan concentraciones de insulina en ayunas 50-60% más altas que las mujeres de peso normal, además mujeres con un IMC alto manifiestan niveles más altos de glucosa en ayunas a 1 y 2 horas después de una prueba oral de tolerancia a la glucosa, lo que indica que son más intolerantes a la glucosa (24), siendo esta resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia causantes de una expresión de genes relacionados con la disfunción mitocondrial y por lo tanto una disminución en el metabolismo energético (21).

Con respecto a los lípidos, se sabe que las concentraciones de lípidos circulantes durante el embarazo están elevados en todas las mujeres (22), sin embargo, en comparación con mujeres embarazadas de IMC normal la obesidad materna, se asocia con concentraciones plasmáticas en ayunas de lípidos más altas tanto de triglicéridos como de colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y además mostraron concentraciones más bajas de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (25).

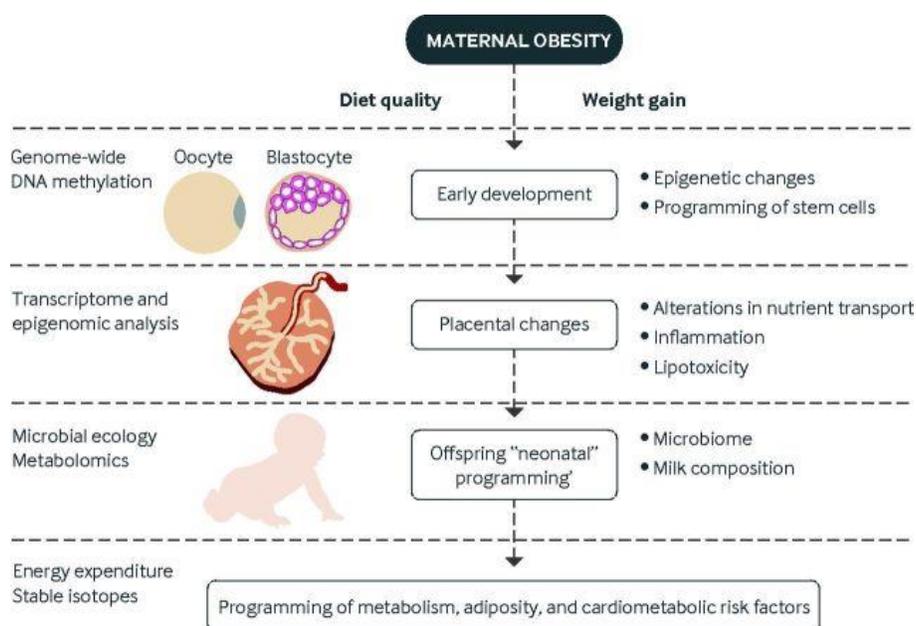


Figura 1. Posibles mecanismos que influyen en el riesgo de obesidad en los hijos de madres con obesidad. La obesidad pregestacional tiene efectos importantes sobre la función reproductiva y el desarrollo del ovocito, estos efectos pueden medirse mediante el restablecimiento de las marcas epigenéticas en las primeras etapas de desarrollo, lo que puede tener influencia en la renovación de células madre. La obesidad materna y las dietas hipercalóricas también pueden influir en el crecimiento de la descendencia al afectar el transporte de nutrientes de la placenta, posiblemente como resultado de un desarrollo placentario alterado causado por inflamación placentaria y alteraciones en las vías de detección de nutrientes (Tomado de 21).

1.3 Cambios placentarios asociados a la obesidad materna

La obesidad materna influye tanto en la placenta como en el feto, durante el embarazo saludable el metabolismo se adapta para la designación de nutrientes para el desarrollo fetal y de la placenta. Sin embargo, esta adaptación se ve desequilibrada cuando la madre tiene obesidad, ocasionando un ambiente metabólico alterado, relacionado con cambios en el crecimiento, desarrollo fetal y función de la placenta (22,23). Por otro lado, la leptina también es producida por la placenta y se libera en primer lugar a la circulación materna y en menor cantidad a la circulación fetal, actúa como regulador de la saciedad y del gasto energético del sistema nervioso central, mientras que la adiponectina se produce en cantidades más bajas en los glóbulos blancos maternos, en el embarazo, la adiponectina promueve la sensibilidad a la insulina y captación de glucosa en el músculo esquelético, reduciendo así la disponibilidad de nutrientes para el transporte de nutrientes en la placenta. Estas dos hormonas tienen gran importancia en el crecimiento y adiposidad fetal (23). Las mujeres con obesidad en el embarazo comparadas con mujeres de IMC normal tienen niveles de adiponectina en plasma más bajos. La leptina aumenta en conjunto con el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de insulina durante el primer y tercer trimestre del embarazo. También, los niveles de leptina en la madre están relacionados con los niveles de leptina en el feto, y niveles altos de leptina en el cordón umbilical están vinculados con resistencia a la insulina en el feto (Revisado en 22,23). Siendo la glucosa la

principal fuente de energía para el feto y la placenta en un embarazo saludable, un ambiente hiperglucémico ocasiona además de las alteraciones en la placenta, algunas de las descritas son: deficiente perfusión vascular materna, trombosis fetal, desequilibrio en las moléculas vasoactivas y potencializa el estrés oxidativo (26). Como se observa en la Figura 2. Las placentas de mujeres con obesidad son más pesadas y el peso de la placenta se correlaciona con el IMC pregestacional, edad materna y la ganancia de peso gestacional con el peso neonatal al nacer y masa grasa. La función de la placenta se ve alterada por el ambiente metabólico materno, afecta el crecimiento prematuro de la placenta y la expresión génica (Revisado en 21).

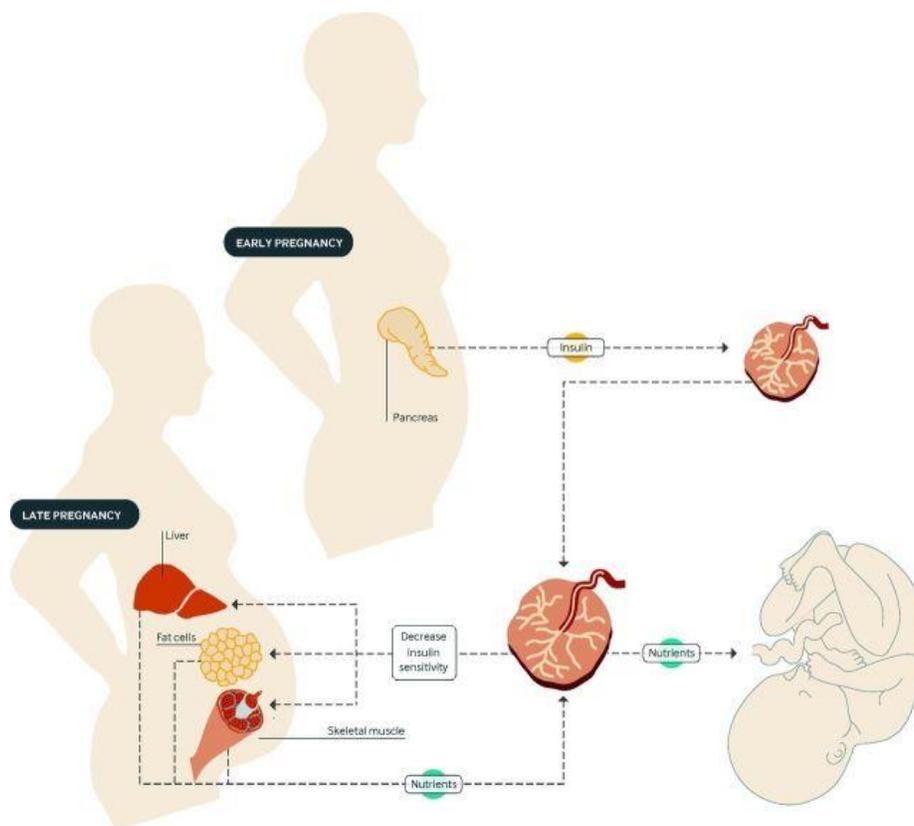


Figura 2. Diafonía materno-placentaria y crecimiento fetal. Debido a la reducción de la sensibilidad a la insulina en las mujeres con obesidad en comparación con las mujeres normopeso, hay un aumento en la respuesta de la insulina al principio del embarazo que afecta el crecimiento prematuro de la placenta y la expresión génica. Dando como resultado la liberación de factores placentarios que disminuyen la sensibilidad a la insulina en el tejido materno (músculo esquelético, hígado y tejido adiposo), lo que resulta en una mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento fetoplacentario. La mayor disponibilidad de nutrientes como la glucosa y los lípidos contribuye a la adiposidad fetal, que se manifiesta solo al final de la gestación (Tomado de 21).

1.4 Programación fetal

La obesidad materna y el entorno intrauterino adverso podría inducir cambios fetales a largo plazo relativamente irreversibles en el metabolismo y en los órganos, está altamente relacionada con el desarrollo de obesidad, neonatos pequeños para la edad gestacional o grande para la edad gestacional, síndrome metabólico y resistencia a la insulina en adultos (17).

Los recién nacidos de mujeres con obesidad tienen mayor riesgo de sobrecrecimiento y los hijos de mujeres con obesidad pesan más porque tienen mayor cantidad de tejido adiposo comparados con los hijos de mujeres con un peso normal (21), y están predispuestos a un aumento de obesidad en la infancia, así como DM2 y enfermedades cardiovasculares (27). El IMC materno ha demostrado ser el principal predictor de la adiposidad neonatal, la ganancia de peso gestacional superior a lo recomendado por el IOM. Se relacionó significativamente con un aumento en la adiposidad neonatal en mujeres con peso normal (21).

El estudio *Healthy Start* demostró asociaciones positivas del aumento del IMC y ganancia de peso gestacional maternos previos al embarazo con un aumento de la adiposidad neonatal, con tasas específicas de período de ganancia de peso gestacional en el embarazo temprano, medio y tardío asociado independientemente con la masa grasa neonatal y el porcentaje de grasa corporal (28).

Aunque aún no se conocen los mecanismos específicos responsables de estas relaciones existen especulaciones sobre el papel del metabolismo y los cambios en el sistema inmunológico en organismos expuestos a factores ambientales intrauterinos adversos. Una investigación realizada por Catalano et al. mostró que los hijos de mujeres con obesidad tienen concentraciones más elevadas de PCR, IL-6 y leptina en el cordón umbilical que los bebés de mujeres con normopeso. Además, también tienen mayor resistencia a la insulina comparados con los bebés de mujeres con normopeso. La resistencia a la insulina de lactantes con obesidad se asoció significativamente con la resistencia a la insulina materna y la grasa corporal neonatal (29). Estos datos sugieren que la obesidad materna y la ganancia de peso excesiva durante el embarazo pueden generar un círculo vicioso intergeneracional de obesidad. El papel de la dieta materna en la sobrenutrición fetal ha sido poco estudiada. Sin embargo, Odaka et al, examinaron si un entorno rico en grasas que comienza en el periodo fetal podría influir en el crecimiento posnatal y la función inmune, demostraron que la dieta rica en grasas en el periodo posnatal resultó en un evidente aumento de peso, glucosa sérica y niveles de leptina. Por otro lado, un entorno dietético rico en grasa en el periodo fetal

influyo en el aumento de peso corporal y triglicéridos, también resulto en una alteración de en los parámetros inmunológicos, como una disminución de linfocitos esplénicos, corteza tímica más delgada y alteraciones en los niveles de anticuerpos específicos de antígeno, además, encontraron elevación de la producción del TNF (30). En un estudio experimental en ratas se demostró que el consumo de una dieta rica en grasa saturadas desde antes de la concepción y continuarla hasta el destete conduce a un aumento en las crías de 6 meses en hiperinsulinemia, adiposidad, hipertensión y disfunción endotelial (Revisado en 31). Estos hallazgos pueden implicar que una dieta rica en grasa induce una disfunción de la regulación inmunológica, lo que resulta en una mayor vulnerabilidad a enfermedades complicadas.

1.5 Sistema inmune

El sistema inmune se compone de tejidos, órganos, células y moléculas que interaccionan de forma directa o bien a través de distintos mediadores capaces de reconocer y eliminar de manera específica agentes extraños, manteniendo a su vez el control de la proliferación celular, la homeostasis celular, la tolerancia hacia antígenos inocuos y el control de la microbiota. De tal manera, que el sistema inmune consta de mecanismos de activación y regulación que aseguran su buen funcionamiento, protegiendo frente a los agentes infecciosos mediante el reconocimiento de PAMPS y combatirlos de manera rápida y determinante, sin

embargo, esta estrategia que forma parte del sistema inmune innato no tiene memoria inmunológica y tiene baja especificidad. Además, el sistema inmune está capacitado para discriminar condiciones normales y anormales en las células, por lo que también tiene la capacidad de eliminar células potencialmente cancerígenas. Para llevar a cabo la función de proteger al individuo de posibles antígenos o microorganismo potencialmente patógenos el sistema inmune consta de dos tipos de inmunidad, con mecanismos y células especializadas, denominadas como la respuesta inmune innata (no específica) y la respuesta inmune adaptativa (específica), ambas estrategias en conjunto funcionan para mantener la integridad del organismo de los agentes agresores potencialmente patógenos y para proteger de futuros contactos con el mismo patógeno. Ambas estrategias son interdependientes, y la inmunidad adquirida depende de las señales de la inmunidad innata para establecer la respuesta. La respuesta inmune innata incluye principalmente mecanismos celulares y moleculares que se establecen al contacto con el agente agresor, esto con la finalidad de eliminarlo y prevenir una posible infección o un daño mayor. La respuesta inmune adaptativa se genera a partir de la respuesta inmune innata, se establece en respuesta al reconocimiento, procesamiento y presentación de los antígenos del patógeno agresor a las células de la respuesta inmune adaptativa. lo cual ayudará a eliminar y generar memoria inmunológica contra al patógeno (32).

Tabla 1. Propiedades de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas.
Esta tabla resume las propiedades importantes de la respuesta inmune y adaptativa

Características inmunidad innata y adaptativa		
Atributo	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Tiempo de reacción	Minutos a horas	Días
Especificidad	Específica para moléculas y patrones moleculares de los patógenos	Altamente específica; incluso discrimina diferencias mínimas en la estructura molecular; reconoce detalles de la estructura microbiana o no microbiana con alta especificidad.
Diversidad	Un número limitado de receptores codificados por la línea germinal	Altamente diversa; un número enorme de receptores que surgen por recombinación genética de los genes q que codifican receptores.
Respuestas de memoria	Ninguna	Memoria persistente; la respuesta a la infección anterior es más rápida y de mayor magnitud.
Discriminación entre lo propio y lo extraño	Perfecta; no hay patrones específicos de microorganismo en el hospedador	Muy buena; fallos ocasionales de la discriminación entre lo propio y lo extraño dan por resultado enfermedad autoinmunitaria.
Componentes solubles de sangre o líquidos tisulares	Muchos péptidos y proteínas antimicrobianos	Anticuerpos
Principales tipos de células	Fagocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos), células asesinas naturales (NK), células dendríticas.	Linfocitos T y B, células presentadoras de antígeno.

(Tomado de 32).

1.6 Respuesta inmune innata

La primera estrategia del sistema inmunitario es la respuesta inmune innata que se encarga de la protección inicial contra las infecciones, agentes ambientales, o antígenos extraños que puedan entrar en contacto con nuestras células, proporcionan una defensa inicial no específica contra las señales de peligro. Este sistema está compuesto por la combinación de barreras físicas, moléculas efectoras no celulares y células especializadas que circulan en sangre y sistema linfático que protegen contra infecciones (33). La primera línea de defensa del organismo consta de barreras físicas (capas epiteliales de la piel, superficies mucosas y de tejido glandular, las barreras químicas comprenden péptidos antimicrobianos y pH ácido. Las células de la respuesta inmune innata incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos/macrófagos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas (DC). Estas células profesionales en respuesta a cambios ambientales extracelulares pueden expresar receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se encargan de reconocer DAMS y PAMPS como TLR, receptores tipo NOD y receptores tipo C de lectina, con alta afinidad (32,34). El reconocimiento de un agente patógeno desencadena una cascada de señalización que culminan en la secreción de citocinas y quimiocinas, activación del complemento y reclutamiento celular lo cual puede inducir inflamación local en el individuo. El antígeno captado por las células innatas se procesa, con diferenciación celular en células presentadoras de antígenos y

contribuye a inflamación o reparación de tejidos. La respuesta innata carece de especificidad y memoria antígeno específica, y, por lo tanto la activación de la respuesta inmune es fundamental para el inicio de la respuesta inmune adaptativa (34).

1.7 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa, está formada principalmente por los linfocitos, tanto circulantes como los que se acumulan en los órganos linfoides secundarios (entre otros, los ganglios linfáticos y el bazo), requiere de mayor tiempo para actuar que la respuesta inmune innata, pero es altamente específica para antígeno. Esta estrategia está mediada por las células T y B que determinan el tipo de respuesta inmune generada ante la infección, las células B se diferencian en células plasmáticas y liberan anticuerpos a la circulación capaces de neutralizar al antígeno para el cual son específicos. Para que se lleve a cabo una respuesta inmune eficiente y de larga duración, se requiere de la participación de las células T cooperadoras. A esta respuesta se le conoce como “respuesta dependiente de células T”. Las células T cooperadoras que son activadas por las células dendríticas de la respuesta inmune innata, reconocen los antígenos fagocitados y procesados, presentados en el contexto complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) sobre la DC. Este reconocimiento no es suficiente, las células requieren una segunda señal que consiste en el reconocimiento de las moléculas coestimuladoras por su ligando sobre la célula T virgen. Una vez activadas las

células T cooperadoras liberan mediadores inflamatorios, que favorecen la eliminación de patógenos intracelulares, las células T CD8+ o citotóxicos efectores (LTC) disponen del mecanismo para matar células infectadas del huésped, a través de la secreción de granzima y perforina o bien por la inducción de apoptosis a través de la molécula Fas y FasL. Los linfocitos T efectores, tanto cooperadores mueren cuando se elimina el antígeno, pero quedan poblaciones de memoria que actuarán mucho más rápido y eficiente cuando haya una segunda exposición con el mismo antígeno (32).

1.8 Sistema inmune frente a infecciones virales

Los virus infecciosos suelen entrar por las principales barreras (epitelios de la piel, aparato digestivo y respiratorio) e intentan colonizar al huésped, para replicarse el ácido nucleico viral utiliza mecanismos de biosíntesis de la célula a la que infecta e impulsa la síntesis de sus proteínas específicas, los epitelios sirven de barreras físicas al impedir la entrada de virus, en caso de que logren atravesar estos epitelios, se encuentran con los mecanismos de defensa de la inmunidad innata en respuesta a productos de los virus se estimula la producción de interferón IFN tipo I, células dendríticas, especialmente las del tipo plasmacitoide, diferentes vías bioquímicas desencadenan la síntesis de IFN, entre ellas está el reconocimiento de ARN y ADN viral mediados por TLR endosómicos (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9), y la activación de receptores citoplasmáticos tipo RIG I por el ARNdc y la vía de

STING por el ADN viral, estas vías convergen en la activación de cinasas que fosforilan y activan los factores de transcripción IRF que estimulan la transcripción de los genes inflamatorios como el IFN tipo I. La replicación viral es inhibida por el IFN tipo I en las células infectadas, y los linfocitos NK matan células infectadas al principio de la infección antes de que se desarrolle la respuesta inmune adaptativa. La expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) se reduce frecuentemente en las células infectadas como un mecanismo de evasión, para evitar que las células con el virus sean reconocidas y eliminadas por las células T CD8.

Los mecanismos de defensa de la inmunidad adaptativa esta mediada por anticuerpos, los más eficaces son los de alta afinidad en las reacciones que tienen lugar en los centros germinales dependientes de T. Estos anticuerpos son eficaces durante el estadio extracelular de la vida de estos microbios. Los virus solamente serán extracelulares antes de que infecte las células del huésped o bien cuando sean liberadas de las células infectadas por germinación o muerte de las células infectadas. Los anticuerpos antivíricos se unen a la cubierta viral o a los antígenos de cápside y funcionan como neutralizantes para impedir la unión y por lo tanto la entrada a las células del huésped y así evitar la infección inicial y la propagación. Para neutralizar los virus dentro de las vías respiratorias e intestinal son importantes los anticuerpos del isotipo IgA, los cuales se secretan a las mucosas y pueden neutralizar y opsonizar las partículas virales y promover su eliminación mucho antes de que estas infecten a las células (35).

1. 9 Inmunidad neonatal

La etapa neonatal se considera desde el nacimiento hasta los 28 días de nacido. Durante esta etapa el recién nacido experimenta la transición de un entorno intrauterino protegido al mundo externo con la amenaza constante de antígenos extraños, se considera una etapa vulnerable, ante la respuesta inmune adaptativa inmadura del neonato, por esta razón, la respuesta inmune innata juega un papel fundamental durante los primeros años de vida, debido a que la respuesta inmune adaptativa aún está madurando. Los neonatos son altamente susceptibles a infecciones, sepsis y trastornos del neurodesarrollo principalmente por el mal funcionamiento de las células inmunitarias innatas, debido a la hiporreactividad intrínseca de las células junto con una mayor activación de los mecanismos inmunosupresores y protectores de los tejidos (36).

El desequilibrio de la nutrición materna ya sea deficiente o excesivo, también puede tener un impacto sobre la inmunidad del neonato y la maduración inmunológica temprana. Bajo condiciones altas de estrés nutricional de la madre, provoca una estimulación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal, dando como resultado una reducción del peso del timo fetal, conduciendo a su vez la apoptosis de los timocitos y las células T Y B inmaduras. Estas alteraciones en el desarrollo del sistema inmunológico neonatal, pueden resultar en mayor susceptibilidad a infecciones al nacer y/o enfermedades inflamatorias (37).

1.9.1 Sistema inmune innato neonatal

Las células del sistema inmune innato se componen principalmente de neutrófilos, CD, NK, y células T γ δ , están disponibles para actuar de inmediato y de manera eficaz frente a patógenos (37). En los neonatos las CD presentan alteraciones funcionales, estas células se divide en dos linajes de desarrollo: CD convencionales que inducen activación y la diferenciación de las células T y, por otro lado, CD plasmocitoides producen INF tipo I y se encargan de mediar las respuestas antivirales. Las CD funcionales en los neonatos tienen deficiencia en la producción de IL-12 la cual es una citocina fundamental para diferenciar una célula virgen hacia el fenotipo Th1, encargado de eliminar patógenos intracelulares. Por su parte las células dendríticas plasmocitoides producen menos INF importantes en la diferenciación al tipo Th1 (36).

Los neutrófilos neonatales son los responsables de la destrucción de patógenos durante una infección mediante la fagocitosis, liberación de sustancias tóxicas y generación de trampas extracelulares de neutrófilos. Estos neutrófilos tienen niveles bajos en la expresión de adhesión en la membrana plasmática, ocasionando una disminución en la actividad quimiotáctica e inhibiendo la adhesión. Como consecuencia los neutrófilos no migran correctamente y se correlaciona con la deficiencia en la opsonización y fagocitosis, es decir, los neonatos son más susceptibles a infecciones (36).

Las células NK participan en la resolución de infecciones virales respiratorias, se encuentra en altas concentraciones en los neonatos, sin embargo, tienen una capacidad funcional disminuida (37). Las células T en los neonatos tienen baja capacidad de proliferación y producción de citoquinas, además producen menores cantidades de perforina y granzima B (37).

1.9.2 Sistema inmune adaptativo neonatal

En los neonatos la funcionalidad de células T se ve afectada, en estudios experimentales las células T CD4+ neonatales se diferencian a respuestas Th2, con una disminución en la producción de citocinas Th1 como (IFN, IL-2 y TNF). Las células Th1, Th2 y Th17 juegan un papel importante para generar inmunidad frente a patógenos intracelulares y parásitos extracelulares, por su parte las células T reguladoras, son importantes para el desarrollo de tolerancia inmunológica y juegan un papel fundamental para limitar las respuestas inmunitarias excesivas. Por otro lado, las células B neonatales no tienen evidencia de exposición antigénica, se observa un repertorio de Ig de superficie parcialmente desarrollado. Probablemente las deficiencias que se observan en la producción de anticuerpos pueden deberse a la inmadurez de las células B, una disminución de la señalización de los receptores o una deficiente colección de células B (37).

1.10 Virus Influenza

El virus de influenza es el agente causal de agudas infecciones respiratorias, potencialmente graves y altamente contagiosas causada por el virus de influenza.

A nivel mundial las epidemias de influenza estacional cada año causan aproximadamente de 290.000 a 650.000 muertes, con hasta 3 millones a 5 millones de personas gravemente afectadas (38).

Las epidemias de influenza ocurren generalmente en los meses de clima frío, cuando la temperatura y la humedad más bajas favorecen la propagación del virus. La influenza se diferencia de otras enfermedades del tracto respiratorio por su rápido inicio, se caracteriza por fiebres muy altas, superiores a los 38° C, tos seca, dolor de cabeza, malestar en general, dolor de garganta y dolores corporales, congestión, vómitos y náuseas (39). Aunque todas las personas pueden contagiarse del virus de influenza, los niños menores de 5 años y los adultos mayores a 65 años son considerados los grupos de población de mayor riesgo, sin embargo, las personas con afecciones crónicas o inmunosupresión, las mujeres embarazadas también se consideran grupos de riesgo. (38). El punto máximo de los síntomas se alcanza de 3 a 5 días posteriores a la infección, gran parte de las infecciones causadas por virus de la influenza A (IAV) H1N1 se limitan al tracto respiratorio superior, sin embargo en casos graves, se produce una infección del tracto respiratorio inferior, incluido el pulmón, asociado frecuentemente con secuelas graves que requieren hospitalización (40).

Existen cuatro cepas de virus de influenza A, B, C Y D, el tipo A Y B son las más comunes en humanos, el virus de influenza A son zoonóticos, ya que infectan una amplia variedad de mamíferos y aves, tiene la capacidad de causar infección respiratoria de leve a grave. Mientras que el virus de influenza B, solo infecta a humanos, es altamente contagiosa y tienen la capacidad de causar infecciones respiratorias severas, por su parte los virus de influenza del tipo C, tienen la capacidad de infectar humanos y cerdos, causan enfermedades respiratorias leves. Mientras que los virus de influenza tipo D afectan principalmente al ganado y cerdos y no se sabe que puedan causar infecciones en los seres humanos (41).

La influenza A serológicamente está definida de acuerdo con sus proteínas de superficie, según la variación antigénica en los antígenos de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta el momento, existen 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA. Además, varias combinaciones de HA y NA son posibles como subtipos que pueden ir desde (H1 a H18 y de N1 a N11), por ejemplo, (H1N1, H3N2, H5N1, H7N9). Actualmente los subtipos de influenza A que circulan habitualmente entre los humanos son H1N1 Y H3N2, junto con los virus de influenza B (42). Los virus de influenza B no se clasifican en subtipos, sin embargo se clasifican en linajes, los que circulan actualmente son dos: B/Yamagata o B/Victoria (43,44).

Como se muestra en la Figura 3. El virus de influenza es un virus de ARN segmentado de sentido negativo, pertenecen a la familia de *Orthomyxoviridae*, Los virus de influenza A (IVA) y B poseen 8 regiones de ARN viral de cadena única (vARN) y se encuentra encapsulado por una envoltura lipídica del huésped con péptidos virales prominentes que comprenden su superficie: HA y NA en las

cuales se manifiesta una deriva antigénica como pequeños cambios estacionales (45).

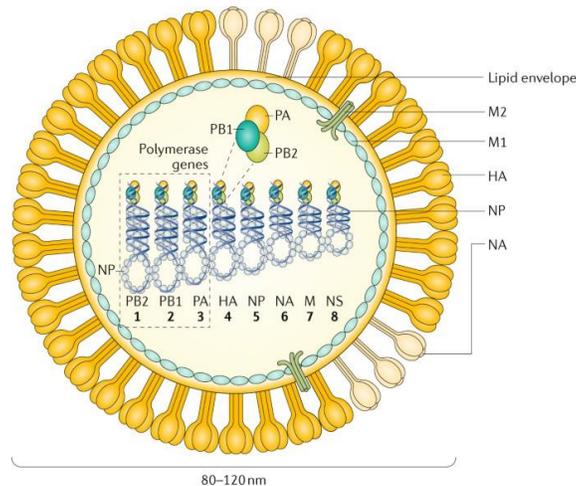


Figura 3. Estructura del virus de influenza

El virión de la influenza A y B son virus de cadena sencilla y sentido negativo, en el interior de la partícula se alojan los ocho genes del ARN y la ribonucleoproteína (RNP). Lleva encajados dos glicoproteínas superficiales, la hemaglutinina (HA) trimérica y la neuraminidasa (NA) tetramérica; la cápside, envuelta por una capa doble de lípidos, tiene debajo el péptido de sostén M1 que a su vez acarrea el fragmento M2, funcionando como canal iónico (Tomado de 45).

Los virus de influenza pueden evadir la respuesta inmune del hospedero mediante dos mecanismos de variación antigénica conocidos como: “deriva antigénica” y “cambio antigénico”, Figura 4. El proceso conocido como “deriva antigénica” o “drift” se refiere a pequeñas mutaciones frecuentes de sus secuencias de glicoproteínas principalmente en las de HA y en menor medida en las de NA, causados durante la replicación del genoma viral, lo que permite que el virus escape de la detección de anticuerpos generados por la cepa anterior, lo que podría conducir a una posible reinfección. Por otro lado el “cambio antigénico” o

“shifts” se originan cuando dos virus de diferentes subtipos de HA y NA infectan un mismo microorganismo y en la misma célula, los genes de ambos virus pueden experimentar una reagrupación de genes, con combinaciones diferentes de HA y NA diferentes a los virus originales (45).

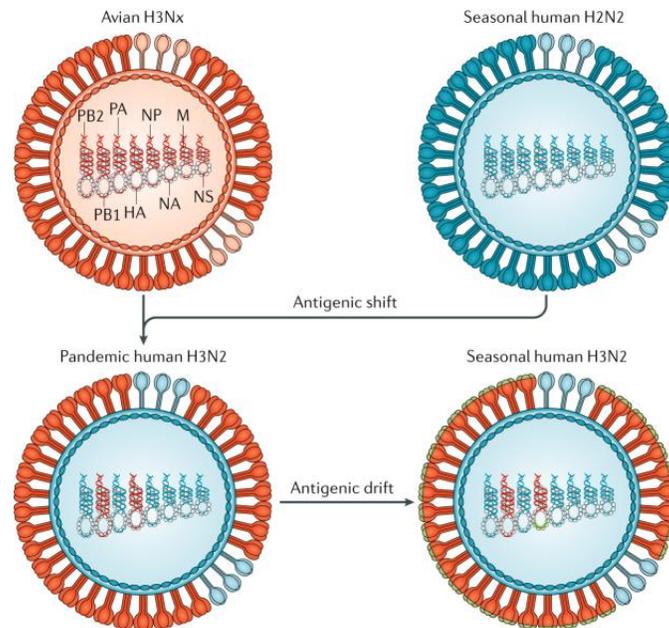


Figura 4. Mecanismos de evolución del virus de influenza.

Los virus de influenza experimentan un proceso de evolución mediado por dos mecanismos de variación antigénica conocidos como: “shift antigénico” y “drift antigénico”. El shift explica el surgimiento de nuevas cepas pandémicas y consiste en la aparición de un nuevo virus que surge de la coinfeción de dos o más subtipos virales, dando lugar a una nueva cepa que contiene segmentos genéticos de ambos virus. El drift antigénico consiste en la mutación aleatoria que ocurre en los sitios antigénicos, de unión a anticuerpos, de las glicoproteínas de membrana, la HA y la NA, esto da lugar a nuevas cepas epidémicas y es responsable de la reformulación de la vacuna cada año (Tomado de 45).

Cinco grandes pandemias de influenza han afectado a la población humana. En el 1918-1919 surgió la pandemia H1N1 (aviar), que causó casi 50 millones de muertes en todo el mundo y fue llamada “la madre de todas las pandemias” o influenza española, desde entonces, todas las pandemias de influenza A han sido

causadas por descendientes del virus 1918. La segunda pandemia de influenza A fue por un virus H2N2 registrada en Asia en 1957, la tercera pandemia causada por un virus H3N2 surgió en Hong Kong en 1968 que remplazo al H2N2 y todavía circula en todo el mundo como IAV estacional. En el 1997 fue la cuarta pandemia fue de H5N1 (aviar) en Hong Kong y por último la quinta pandemia del virus de influenza A H1N1 de origen (porcino), que apareció en México en marzo y principios de abril del 2009 y que sustituyo al anterior virus de influenza humana estacional H1N1. Esta pandemia fue relativamente leve y afecto a niños pequeños y adultos de mediana edad con mayor severidad que a otros grupos. Este patrón inusual de mortalidad y morbilidad asociada con la edad se puede atribuir a los mayores de 60 años que ya tenían algún nivel de inmunidad de protección cruzada contra el nuevo virus H1N1 (46).

1.10.1 Ciclo de replicación del virus de influenza

El virus de influenza ingresa al organismo por las células epiteliales del tracto respiratorio, se une a la célula del huésped por interacción de la hemaglutinina con residuos de ácido siálico (AS) en la superficie de las células para iniciar infección. La NA libera el virus atrapado al dividir las terminales del AS. El ácido siálico es una molécula muy abundante en la superficie celular en los oligosacáridos de las glicoproteínas. La HA de los virus de influenza aislados en humanos favorece la unión a los AS unidos al $\alpha 2,6$ con galactosa, mientras que los virus que infectan

aves se internalizan preferencialmente mediante unión al enlace $\alpha 2,3$. La hemaglutinina de influenza es la proteína clave para la entrada del virus a la célula.

Después de la unión a los residuos de AS, el virus se internaliza en el endosoma, y posteriormente este se asociará con los lisosomas. A continuación, el interior del endosoma se acidifica por un mecanismo dependiente de la proteína viral M2, lo que desencadena un cambio conformacional en la HA que produce la fusión de la envoltura viral con el endosoma. La fusión da como resultado que el contenido del genoma viral se libere, es decir, los 8 segmentos de ARN en forma de complejos de ribonucleoproteínas virales (vRNP), en el citoplasma. Los vRNP se importan al núcleo de las células infectadas, donde se produce la transcripción y la replicación del ARN viral a través de actividades enzimáticas del complejo de polimerasas viral unido a los vRNP. La replicación del ARN viral ocurre a través de un mediador de sentido positivo conocido como complejo de ribonucleoproteína complementaria (cRNP). La transcripción del ARN viral da como resultado ARNm de cadena positiva que se poliadenilan y se exportan al citoplasma para su traducción en proteínas virales. Las polimerasas virales recién sintetizadas (PB1, PB2 Y PA) y las NP virales se importan al núcleo para aumentar la síntesis de ARN viral, mientras que las proteínas de membrana del virus HA, NA y el canal iónico M2 del virus viajan a la superficie celular a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi (45). En las últimas etapas de la infección, las proteínas virales internas, incluidas la proteína de matriz (M1), la nucleoproteína

(NP), las polimerasas (PB1, PB2 Y PA) y la proteína de exportación nuclear (NEP), se empaquetan en el virus en ciernes en la membrana celular, con HA y NA en la superficie de la membrana celular. La proteína no estructural 1(NS1), PB-1F2 y PAX normalmente no se empaquetan en viriones. En la superficie celular, las células B pueden detectar las proteínas HA, NA y M2, y se puede inducir una respuesta inmunitaria con estas proteínas. La NP viral, aunque normalmente no se encuentra dentro de las células, también se ha detectado en parches en la superficie celular y también podría ser reconocido por las células B. Las partículas nacientes se adhieren a la membrana celular del huésped como resultado de la interacción entre HA Y ácidos siálicos. Esto es contrarrestado por la actividad de NA, que libera el virus dividiendo los residuos terminales de ácido siálico. Durante este paso, HA y NA son accesibles, pero solo se encuentra un número muy bajo de copias de M2 en los viriones, y la membrana del virus protege las proteínas internas del reconocimiento por parte de las células B. Finalmente, para generar virus infeccioso, la HA debe dividirse en subunidades HA1 y HA2 mediante proteasas del huésped que están presentes en el tracto respiratorio. Figura 5 (47).

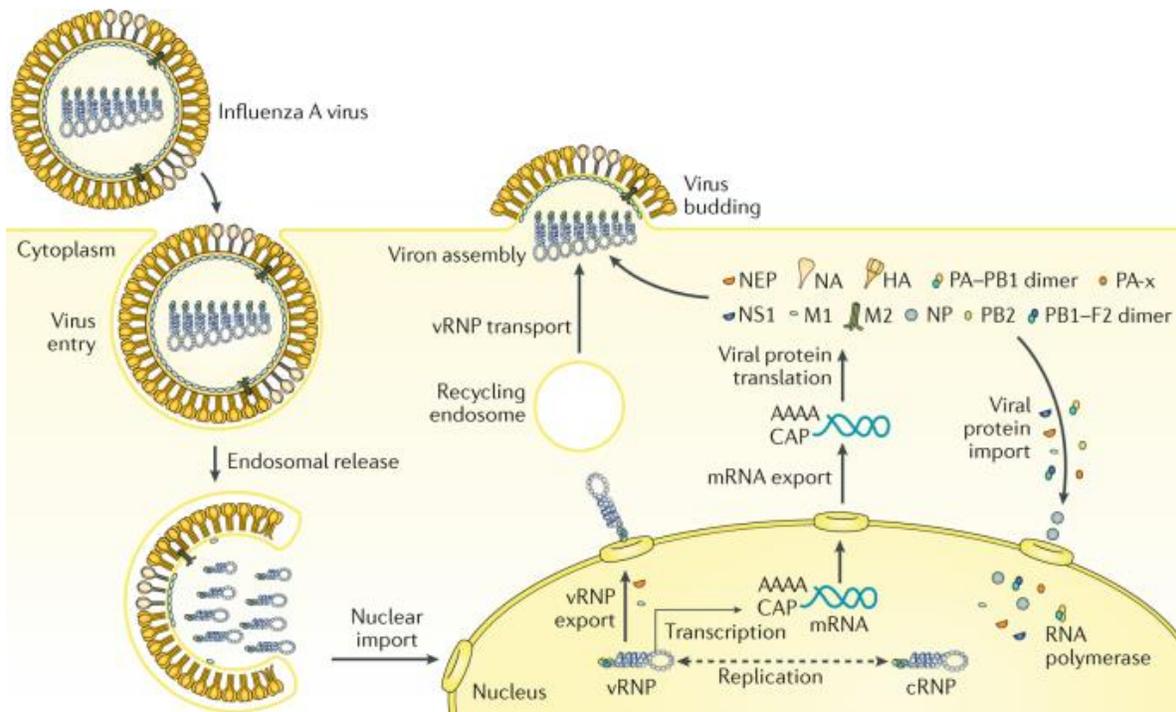


Figura 5. Ciclo de replicación del virus de la influenza. La etapa inicial del ciclo de replicación del virus de la influenza, inicia con la unión de la partícula viral con la célula huésped. Para ello, la HA se une a los receptores de la membrana celular que contienen ácido siálico. Los virus ingresan a las células a través de endocitosis mediada por receptores. La acidificación de los endosomas, por un lado, provoca un cambio conformacional en HA, exponiendo el péptido de fusión, esto gracias a la proteína M2 que funciona como un canal iónico que introduce protones en el virión, acidificándolo y provocando la liberación de mRNPs, ribonucleoproteínas asociadas al ARN de sentido negativo correspondiente al genoma del virus. Estos complejos son transportados al núcleo de la célula. Una vez en el núcleo, la ARN polimerasa dependiente de ARN transcribe y replica el genoma, produciendo tres tipos de moléculas de ARN: ARN complementario positivo (ARNc), que sirve como molde para la generación de más moléculas de genoma viral; ARN viral pequeño de sentido negativo (ARNsv), que regula la transición de la transcripción a la replicación, y el ARNm, que se exportan al citoplasma para su traducción de las proteínas virales. Las proteínas virales necesarias para la replicación y la transcripción se reintroducen en el núcleo, y los RNP de la progenie se exportan al citoplasma para su empaquetamiento con la ayuda de M1 y NEP. HA, NA y M2 se transportan a través de la vía trans-Golgi a la membrana plasmática donde se forman los nuevos viriones. Las proteínas virales recién sintetizadas se asocian a la membrana celular ya que el proceso de salida es por gemación mediada por la actividad de NA, enzima que actúa cortando los residuos de AS, liberando así a la nueva progenie viral (Tomado de 45).

1.11 Vacunas contra la Influenza

La vacunación es una de las estrategias más importantes para la prevención y el control de la infección por el virus de influenza. La eficacia general estimada de las vacunas que actualmente se aplican es de aproximadamente entre un 40 y un 60%, siendo la naturaleza misma del virus de influenza una limitante en la generación de vacunas, resultando necesario reformular la composición de las vacunas de manera anual, esto con la finalidad de incluir los virus estacionales circulantes que se pronostican durante la próxima temporada de influenza (46). Si bien, la eficiencia de estas vacunas suele ser más alta en la población en general cuando la mayoría de los virus que circulan coinciden con los virus presentes en las vacunas, en algunas temporadas puede oscilar entre un 10 al 20 %, cuando los virus circulantes no coinciden con los presentes en la vacuna (42). En general, las vacunas actuales funcionan mejor contra los virus de la influenza B y la influenza A(H1N1) y ofrecen menos protección contra los virus de la influenza A(H3N2), sin embargo, de manera general, ofrecen una alta protección contra enfermedad grave y hospitalización y eventualmente contra la muerte (48).

En la actualidad, existen tres vacunas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.) para prevenir la enfermedad por el virus de influenza en humanos; son generadas bajo diferentes tecnologías, las vacunas con virus inactivados y atenuados son generadas en huevos embrionados, las generadas en

cultivo celular de virus inactivados, y la vacuna recombinante que consta solo de la proteína HA. A continuación, se describen cada una de ellas.

Vacunas generadas en huevos embrionados.

Las vacunas más comúnmente utilizadas son aquellas compuestas por virus inactivados obtenidos a partir de huevos embrionados. Estas vacunas se administran típicamente por vía intramuscular o subcutánea (46), Las tres formulaciones disponibles de esta vacuna se basan en la producción de virus generados en huevos embrionados de gallina infectados, ya sea en forma de virus completo o fraccionado.. El virus producido se encuentra en grandes concentraciones en el líquido alantoideo, donde el virus es concentrado por centrifugación, fraccionado utilizando detergentes como Triton® X-100, inactivadas por formaldehído y luego diluidas en solución salina.

De este tipo de vacunas se pueden formular trivalentes o tetravalentes, de dosis alta para uso en mayores de 65 años. El tipo y la cantidad de antígenos virales contenidos en la vacuna antigripal trivalente y tetravalente (viriones fraccionados, inactivada) cumplen con los requisitos actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las vacunas trivalentes o tetravalentes generadas bajo esta tecnología, proporcionan inmunidad principalmente mediante la inducción de anticuerpos que se dirigen a los epítomos protectores en la HA. Algunas formulaciones también pueden inducir anticuerpos específicos de NA que no protegen contra la infección, pero pueden modular la enfermedad resultante (44).

Se ha demostrado que tanto las vacunas de virus fraccionados o de subunidades son seguras y han sido aplicadas a millones de personas en todo el mundo, son las más utilizadas en todos los grupos de edad a partir de los 6 meses (46,49). La efectividad de las vacunas inactivadas radica en su sistema de producción rápida en huevos embrionados de gallina, y el tiempo requerido en la selección de cepas de la vacuna es relativamente rápido (49). Estas vacunas promueven la producción de anticuerpos neutralizantes frente a las proteínas HA y NA. Aunque la respuesta de anticuerpos es eficaz frente a la provocación homóloga, su especificidad la vuelve ineficaz frente a nuevos subtipos virales (48).

Las vacunas de virus inactivados de influenza se presentan en formulaciones trivalentes o cuadrivalentes. Las formulaciones trivalentes contienen cepas de virus de influenza A de los subtipos H1N1 y H3N2, junto con una cepa de virus de influenza B de los linajes Yamagata o Victoria. Por otro lado, las formulaciones cuadrivalentes abarcan dos cepas de virus de influenza B, una de cada linaje Yamagata y Victoria, además de las cepas de virus de influenza A H1N1 y H3N2. Esta diversificación busca proporcionar protección contra una amplia gama de cepas de virus de la gripe que circulan durante la temporada de gripe (49).

Vacunas de virus atenuado

A diferencia de las vacunas inactivadas, las vacunas de virus atenuados son administradas mediante inoculación intranasal, vía natural de entrada del virus. En estas vacunas los genes que codifican para las proteínas HA y NA son introducidos dentro de un virus atenuado adaptado a crecer a temperaturas bajas.

Este tipo de virus contienen la proteína HA y NA de la cepa deseada (de la cepa que se requiere para la temporada actual) pero el resto de las proteínas pertenece al fenotipo atenuado, de tal manera que se simula una infección natural pero el virus se replica mínimamente en el tracto respiratorio inferior sin causar enfermedad grave. Induce respuestas inmunitarias humorales y celulares más amplias que las vacunas de HA inactivadas e incita la producción de anticuerpos IgA, esenciales para protección inicial contra el virus de influenza en las mucosas, y IgG, importantes para la neutralización del virus de influenza en tejidos y torrente sanguíneo (49). Estas vacunas no se recomiendan en personas inmunocomprometidos, niños menores de 2 años, personas mayores de 50 años y mujeres embarazadas ya que el virus puede tener una mayor replicación en sistemas inmunológicos comprometidos, se administran principalmente en individuos sanos de 2 a 49 años (46,49).

Vacunas de proteínas recombinante

Las vacunas de proteínas recombinantes se administran vía intramuscular y se producen mediante sistemas de expresión en células de insecto utilizando el sistema de baculovirus o bien en células de mamífero transfectadas con plásmidos o lentivirus en cultivo celular. A diferencia de las vacunas anteriores, este tipo de vacunas no contienen material genético viral, ni virus completo. Se toma el gen que codifica para la proteína HA, la proteína más inmunogénica y blanco de anticuerpos neutralizantes. Estas vacunas presentan la ventaja de que se puede clonar cualquier gen de cualquier HA (49). Aunque la proteína HA es considerada

la proteína más inmunodominante, también es la más cambiante entre las diferentes cepas debido al cambio antigénico, por lo que se hace necesario reformular anualmente las vacunas con las HA de las cepas circulantes, ya que los anticuerpos generados en los individuos previamente vacunados, no serán neutralizantes hacia las nuevas HA de los virus de la siguiente estación (48,50). La deriva antigénica ocurre cuando las mutaciones conducen a cambios en los sitios de unión de los anticuerpos en las proteínas de superficie HA y NA, ocasionando el escape a los anticuerpos generados por la vacuna. Las vacunas inactivadas en general estimulan la producción de anticuerpos contra epítomos de la HA principalmente, estas vacunas son muy propensas a disminuir su eficacia debido a la deriva antigénica. Las personas vacunadas no pueden generar la respuesta adecuada de anticuerpos una vez que son infectadas con otras cepas diferentes a las contenidas en la formulación de la vacuna, debido a que muchas vacunas ofrecen protección específica de la cepa (7).

1.12 Infección por el virus Influenza y Obesidad

Recientemente, la obesidad ha sido asociada y reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades graves durante las infecciones virales, incluyendo influenza y COVID19, esta última con efectos devastadores en los últimos años en la población a nivel mundial (51,52). Durante la pandemia de influenza H1N1 del 2009, la obesidad mórbida y el IMC mayor a 35-40 kg/m² se

reconoció como un factor de riesgo importante para el desarrollo grave de la enfermedad (40). Con frecuencia se relaciona a la obesidad con un volumen pulmonar reducido, alteraciones en la función de los músculos respiratorios y el intercambio de gases agravado por la apnea del sueño y la inflamación crónica, la función pulmonar reducida parece muy oportuna para la infección y propagación por el virus de la influenza y por consiguiente para lesiones pulmonares (53). Se ha demostrado que tras la infección por el virus de influenza la obesidad se asocia con un aumento en el riesgo de hospitalización y complicaciones, con una probabilidad dos veces mayor de requerir ingreso en unidades de cuidados intensivos (UCI) y la necesidad de ventilación mecánica (40), ya que se asocia con una replicación excesiva del virus, debido al desbalance en la respuesta inmune, generando incluso tormenta de citocinas que eventualmente causaran una respuesta inflamatoria exacerbada (40,53). Además, se relaciona con una mayor propensión a infecciones bacterianas, complicando los cuadros respiratorios a neumonías graves (40). Por otra parte, los adultos con obesidad inoculados con la vacuna trivalente a pesar de desarrollar respuestas de anticuerpos, la efectividad de la vacuna trivalente es relativamente más baja, esto debido a una activación disminuida de las células T citotóxicas y una menor expresión de citocinas funcionales como el $IFN\gamma$ y granzima B, incrementando hasta dos veces el riesgo de desarrollar una enfermedad respiratoria por el virus Influenza (38).

Las alteraciones metabólicas y/o inmunitarias asociadas por la enfermedad respiratoria por el virus influenza, están relacionadas con alto riesgo

cardiovascular, sistemas endocrino e inmunitario comprometidos y con la inflamación de bajo grado asociada a la obesidad (53). Además de que la exposición prenatal en mujeres con obesidad a una variedad de infecciones tales como (influenza, toxoplasma gondii, rubeola, citomegalovirus y virus del herpes simple) se le atribuyen consecuencias cardiometabólicas y enfermedades neuroconductuales en su descendencia (54).

Los mecanismos implicados en el aumento de la susceptibilidad a infecciones en personas con obesidad no están bien establecidos, sin embargo, se han postulado varios mecanismos que contribuir con el aumento de la susceptibilidad a infecciones, como lo es la inflamación de bajo grado causada por varios elementos como: la permeabilidad aumentada del intestino hacia el LPS de las bacterias de la microbiota, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina, etc. (55).

1.13 Modelos murinos de obesidad y sistema inmune

Dado que la obesidad un problema de salud a nivel mundial, el cual es multifactorial, para estudiar los fenómenos asociados a este padecimiento, se han desarrollado distintos modelos animales para poder entender las alteraciones fisiopatológicas, inmunológicas y conductuales que la componen, siendo los modelos murinos los más utilizados por su facilidad de manejo y por su reproducibilidad. En diversos estudios con roedores a los cuales se les induce obesidad, se han encontrado resultados similares a los humanos con esta

enfermedad. En ratones con obesidad inducida por Dieta Alta en Grasas (DAG), se ha demostrado que las crías tienen mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad y aumento de adiposidad, hiperlipidemia, hiperleptinemia, hipertensión, función pancreática alterada y disminución de la tolerancia a la glucosa (56). Además, con la obesidad tenemos cambios inmunológicos que impactan tanto en la inmunidad celular como en la producción de anticuerpos en los animales con obesidad, efecto que ha sido estudiado en personas con obesidad, pero que poco se sabe del impacto que podría tener sobre la descendencia. En la actualidad se sabe, que el tejido adiposo es un componente importante en la inducción de inflamación de bajo grado, una condición que compromete al sistema inmunológico por la activación consecutiva del sistema inmune innato (57).

Por esta razón en este trabajo evaluaremos si la obesidad de los padres tiene impacto la respuesta inmune de la descendencia en un modelo murino. Utilizando una vacuna contra el virus Influenza determinaremos su eficiencia ante el reto con el virus, ya que como se mencionó anteriormente, el ambiente en el que se desarrollarán las futuras crías será un ambiente inflamatorio que muy probablemente tenga efectos a largo plazo en estos individuos (58).

2. JUSTIFICACIÓN

El sobrepeso y la obesidad, así como sus complicaciones asociadas, representan un serio problema de salud pública. Si bien la obesidad puede tener consecuencias sobre la respuesta inmune en cualquier etapa de la vida, diversos estudios proveen evidencias de que la obesidad pregestacional o aumento de peso excesivo durante el embarazo, pueden influir en el desarrollo intrauterino y aumentar la susceptibilidad de la descendencia presentar complicaciones a lo largo de su vida, por lo tanto, la transmisión intergeneracional de la susceptibilidad a la obesidad, son áreas que requieren mayor atención. Sin embargo, las consecuencias de la obesidad materna y/o paterna sobre alteraciones en el sistema inmune de su descendencia ha sido poco estudiada.

Por esta razón es importante determinar si la obesidad puede tener consecuencias sobre el tipo y la calidad de la respuesta inmune en la descendencia de quien la padece. Una manera de evaluar si el sistema inmune se encuentra en óptimas condiciones, es mediante la inmunización, es decir la vacunación contra algún patógeno y posteriormente el reto con el patógeno y medir diferentes mediadores de la protección. De tal manera que en nuestro laboratorio contamos con un modelo de vacunación e infección murino utilizando el virus influenza adaptado a infectar al ratón. Este modelo permite evaluar la eficacia de las vacunas contra este virus, en un tiempo corto y de manera controlada.

Los resultados obtenidos en este proyecto podrían servir de antecedente para valorar si la misma relación exista en seres humanos y su descendencia cuando hay obesidad pregestacional.

Para alcanzar los objetivos de este proyecto, se utilizó la vacuna trivalente comercial disponible para la aplicación en humanos, la cual es de virus completo, inactivada y fraccionada, en donde la inmunidad se basada en generar anticuerpos neutralizantes contra la proteína HA. La vacuna fue aplicada en ratones descendientes de ratones a los cuales se les indujo obesidad mediante el consumo de una DAG. El resultado obtenido generará conocimiento sobre las consecuencias de la obesidad parental en el sistema inmune de la descendencia, resaltando la importancia de prevenir la obesidad en la población humana debido a los alcances que puede llegar a tener en la descendencia la infección por el virus de influenza.

3. HIPÓTESIS

La respuesta inmune protectora generada por la vacuna trivalente será menor en los ratones descendientes de padres con obesidad, causando un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad ante el reto con el virus influenza, comparado con ratones nacidos de padres normopeso.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar el nivel de protección de la vacuna trivalente ante el reto con el virus influenza en camadas de ratones nacidos de padres con obesidad comparado con la respuesta ante el reto en camadas de ratones nacidos de padres con normopeso

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar los niveles de anticuerpos séricos producidos en los ratones vacunados con la vacuna trivalente en ratones descendientes de padres con obesidad comparado con ratones nacidos de padres con normopeso
2. Evaluar el nivel de protección proporcionado por la vacuna trivalente frente al desafío del virus de la influenza en ratones descendientes de padres con normopeso y obesidad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de estudio y universo de trabajo

El estudio realizado fue un diseño experimental prospectivo y longitudinal que tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la vacuna trivalente contra el virus de la influenza en camadas de ratones nacidos de progenitores con obesidad, al enfrentarse al virus de la influenza. La variable independiente considerada fue la obesidad de los progenitores, mientras que la variable dependiente fue la respuesta del sistema inmunológico de la descendencia frente al virus de la influenza. Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, y el Laboratorio de Inmunología Viral de la Facultad de Medicina bajo la dirección del Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, así como en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM.

5.2 Modelo de estudio

Se emplearon ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6J con edades entre 6 y 8 semanas, obtenidos del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Estos animales fueron alojados en condiciones estándar de bioterio, mantenidos en aisladores con ciclos de luz de 12 horas y oscuridad de 12 horas. Los ratones

utilizados en el estudio fueron descendientes de progenitores con obesidad. Durante el experimento, se les suministró una dieta balanceada estéril y agua *ad libitum*.

5.3 Inducción de obesidad

Inicialmente, la microbiota de los ratones utilizados durante este proyecto, fue homogenizada mediante la mezcla de heces de una caja a otra durante un mes en cada cambio de caja, lo cual favorece que la microbiota no sea un factor que modifique el estado inmunológico y metabólico de los ratones. Posteriormente, se indujo la obesidad utilizando una dieta rica en grasas mediante el suministro de pellets (D12492 de Research Diets), los cuales contienen un 60% de grasa, un 20% de proteína y un 20% de lípidos (Tabla 2). Esta dieta se administró durante 8 semanas. Antes del apareamiento, se evaluaron la ganancia de peso, los niveles de glucosa en ayunas, los niveles lipídicos y la intolerancia a la glucosa. La dieta alta en grasas (DAG) se suspendió al momento del nacimiento, y las crías, una vez destetadas, recibieron un alimento estándar y balanceado. Los progenitores del grupo de control fueron alimentados con una dieta estándar, y se evaluaron los mismos parámetros metabólicos mencionados anteriormente.

Tabla 2: Parámetros nutricionales de dieta control y dieta alta en grasa.
 Dieta control (Teklad Global 18% Protein Extruded Rodent Diet (Sterilizable) 2018XS), dieta alta en grasa D12492 de Research Diets

Contenido	Dieta control		Dieta alta en grasa	
	g %	Kcal %	g %	Kcal %
Carbohidrato	44	58	26.3	20
Proteína	18.4	24	26.2	20
Grasa	13	18	34.9	60
Densidad energética Kcal/g	3.1		5.24	

5.4 Prueba de tolerancia a la glucosa

Se llevaron a cabo pruebas de tolerancia oral a la glucosa en ratones que desarrollaron obesidad después de 8 semanas de recibir la DAG. Estas pruebas se realizaron después de un ayuno mínimo de 4 horas. Antes de la administración de glucosa, se obtuvieron muestras de sangre para medir los niveles de glucosa a través de un pequeño corte en la vena de la cola utilizando un glucómetro portátil con tiras reactivas (OneTouch). Se tomaron los niveles de glucosa basal como referencia, seguidos de mediciones a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración de una dosis de glucosa con una concentración de 2g/kg de peso corporal.

5.5 Medición de parámetros lípidos en suero

Se analizaron los niveles de lípidos en sangre en los ratones que desarrollaron obesidad tras 8 semanas de recibir la DAG (DAG). Esto se llevó a cabo mediante la obtención de muestras de sangre a través de un pequeño corte en la vena de la cola y utilizando el medidor portátil (Mission® 3 in 1) que utiliza tiras reactivas con una gota de sangre, se evaluó el nivel de triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los progenitores del grupo de control fueron alimentados con una dieta estándar, y se evaluaron los mismos parámetros metabólicos mencionados anteriormente.

5.6 Toma de muestra de suero para medición de anticuerpos

Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo a los 0 y 21 días posteriores a la vacunación, utilizando un pequeño corte transversal en la cola después de calentar a los animales con una lámpara. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 rpm, y al finalizar, se recolectó la fase sérica de las muestras. Estas muestras se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -20°C para su posterior uso en ensayos ELISA con el objetivo de determinar la producción específica de anticuerpos contra la influenza.

5.7 Vacunación

Una vez que se obtuvieron las crías de ambos grupos, descendientes de padres con normopeso y con obesidad, se mantuvieron junto a sus progenitores durante un período de lactancia de 3 semanas. Al cumplir las 3 semanas de edad, fueron destetados y se les tomó una muestra de sangre mediante una pequeña incisión en la cola. La mitad de los animales fueron vacunados vía subcutánea con 50 μ L de la vacuna VAXIGRIP trivalente (Sanofi) vía subcutánea, administrando una dosis de 1.5 μ g de HA para H1N1, H3N2 y la cepa de influenza B Washington, respectivamente. Los controles recibieron 50 μ L de solución salina. Se recolectó una muestra de sangre previa a la inmunización con la vacuna y antes del desafío con el virus de influenza H3N2, a través de un pequeño corte en la cola, y se almacenaron en tubos de 1.5 mL. Como control positivo, se utilizó una camada de ratones sanos normopeso, sometidos al mismo procedimiento. Como control negativo, se emplearon ratones no vacunados. En la tabla 3 se muestra se describe el número de ratones por grupo de experimento en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad. Mientras que en la tabla 4 se muestra el número de ratones por grupo de experimento en ratones progenitores.

Tabla 3: Descripción de los grupos experimentales en ratones descendientes: Todos los ratones fueron vacunados a los 21 días de edad y desafiados con el virus H3N2 a los 21 días post-vacunación. En el caso de infección por Influenza la protección se evaluó mediante la supervivencia y la pérdida de peso.

	Grupo	Tratamiento	# de ratones por experimento
Control	Descendientes de progenitores normopeso	Control positivo Con vacuna	8
		Control negativo Sin vacuna	8
Experimental	Descendientes de progenitores con obesidad	Con vacuna	16
		Sin vacuna	14

Tabla 4: Descripción de los grupos experimentales en ratones progenitores: Todos los ratones fueron vacunados a los 21 días de edad y recibieron una segunda dosis de la vacuna a los 21 días posteriores y después fueron desafiados con el virus H3N2 a los 21 días post-vacunación. En el caso de infección por Influenza la protección se evaluó mediante la supervivencia y la pérdida de peso.

	Grupo	Tratamiento	# de ratones por experimento
Control	Progenitores normopeso	Control positivo Con vacuna	5
		Control negativo Sin vacuna	8
Experimental	Progenitores con obesidad	Con vacuna	12
		Sin vacuna	11

5.8 Infección con el virus Influenza.

Los ratones C57BL6/J descendientes de padres con obesidad fueron desafiados con el virus de la influenza 21 días después de la vacunación. Para este procedimiento, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de una solución de isofluorano (Soflorane Vet, Laboratorio PisA) durante 10 a 15

segundos. Una vez semiinconscientes, se les inoculó vía intranasal con 50 µL de un lisado de pulmón obtenido de ratones BALB/c infectados con el virus A/H3N2/NT/60/68, con una dosis de 200 UFF. Tras la inoculación con el virus, se monitoreó la morbilidad (pérdida de peso y la aparición de signos de enfermedad) y la mortalidad durante los 14 días siguientes a la infección. Los ratones que perdieron más del 25 al 30 % de su peso inicial fueron sacrificados, siendo considerados fallecidos debido a la infección por influenza.

5.9 Análisis de la producción de anticuerpos específicos.

Se llevó a cabo un ensayo de ELISA de captura para determinar la producción de anticuerpos específicos contra la influenza. En este procedimiento, se utilizó una placa de 96 pozos (Costar, High Binding) en la cual se colocó antígeno (líquido alantoide con el virus A/H1N1/New Caledonia/20/99 o A/H3N2/NT/60/68) en cada pozo. Las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche con 50 µL de líquido alantoide diluido 1:2 en PBS1x. Posteriormente, se realizaron dos lavados en la placa con 150 µL de PBS 1x con Tween 0.05%, seguidos de un bloqueo con 150 µL de PBS 1x con Tween 20 al 0.05% y un 5% de leche descremada por dos horas a 37°C. Luego, se realizaron cuatro lavados más en la placa con 150 µL de PBS 1x con Tween 20 al 0.05%, seguidos de la adición por duplicado de 50 µL de un anticuerpo anti-IgG totales de ratón acoplado a fosfatasa alcalina, diluido 1:200 en PBS 1x con Tween 20 al 0.05% y un 5% de leche descremada. Las placas se

incubaron durante una hora a 37°C. Finalmente, se realizaron cuatro lavados adicionales con PBS 1x con Tween 20 al 0.05%, seguidos del revelado con 50 µL de PNPP en 0.1% de dietalonamida por pozo. Una vez que se desarrolló el color en aproximadamente 30 a 60 minutos, se tomaron las lecturas a 405 nm utilizando un espectrofotómetro MultiSkan 352 (Labsystem).

5.10 Análisis estadístico.

Para el análisis de datos, se utilizó el software GraphPad Prism Inc., versión 8.0.2. Se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) y/o pruebas t de Student para determinar las diferencias entre los grupos experimentales. Además, se realizaron Curvas de Supervivencia de log-rank de Mantel-Cox para comparar las tasas de supervivencia entre los grupos experimentales. Se consideraron valores $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****), y no significativo como (ns).

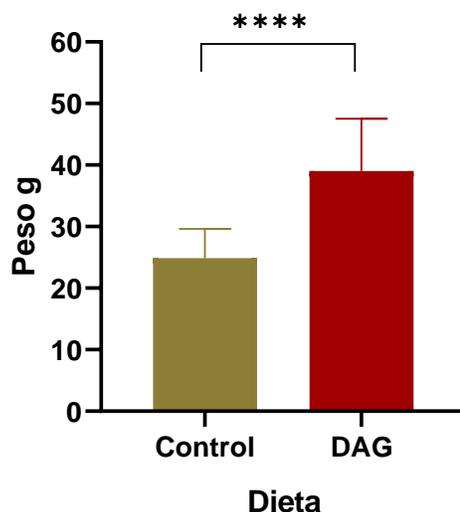
6. RESULTADOS

6.1 Parámetros metabólicos de los progenitores

Si bien nuestro estudio se enfoca en la respuesta inducida por la vacuna trivalente en los ratones descendientes de ratones con obesidad, en la Gráfica 1, se muestra la comparación de pesos entre el grupo alimentado con dieta control y el grupo alimentado con DAG, esto para demostrar que los padres efectivamente tenían un

marcado aumento de peso con respecto a los ratones control. Se observa que el grupo alimentado con una dieta balanceada tuvo un peso promedio de 24.89 g, mientras que el grupo alimentado con DAG alcanzó un peso promedio de 39.02 g. En promedio, los progenitores alimentados con DAG tienen un 56% más de peso que aquellos alimentados con dieta control, siendo esta diferencia estadísticamente muy significativa.

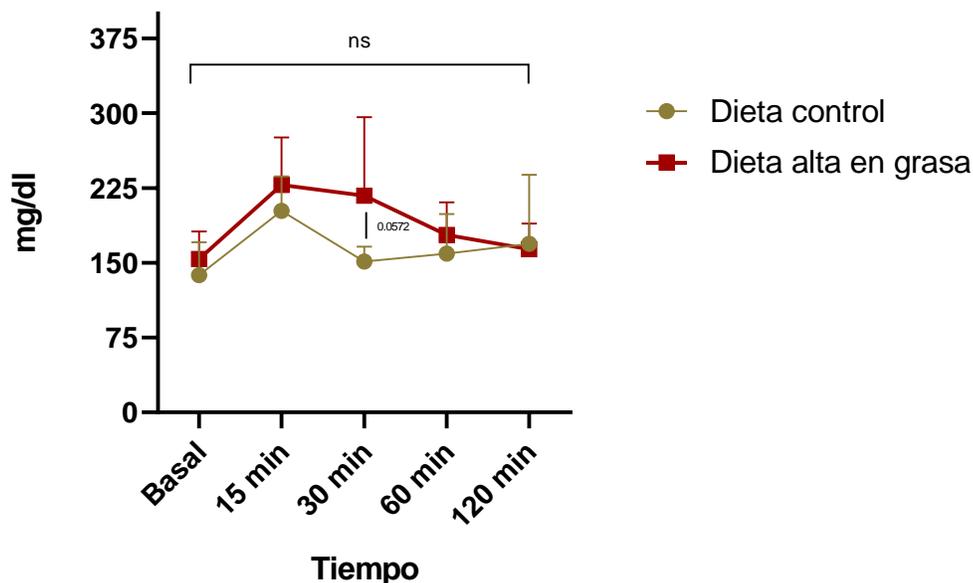
Comparación de peso en ratones progenitores con dieta control y dieta alta en grasa



Gráfica 1. Comparación del peso promedio en ratones progenitores con dieta control y dieta alta en grasa (DAG). El grupo control estuvo constituido por 13 ratones progenitores alimentados con dieta control durante 8 semanas, mientras que el grupo DAG estuvo formado por 22 ratones progenitores alimentados durante 8 semanas con dieta alta en grasa. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de t de Student no pareada para determinar la significancia estadística entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****) y no significativo como (ns). Se encontró una diferencia significativa en el peso entre los progenitores alimentados con dieta control y aquellos alimentados con una DAG, con un valor de p es < 0.0001 .

En la Grafica 2. Se muestran los resultados del análisis de la curva de tolerancia a la glucosa los cuales revelan diferencias significativas entre los grupos de dieta control y alta en grasa en varios momentos de medición. La prueba de ANOVA de dos vías muestra una interacción no significativa entre los factores y una contribución considerable de la dieta ($p < 0.0001$) y el tiempo ($p = 0.0068$) en la variación de los datos. La diferencia entre las medias predichas indica una disminución significativa en los niveles de glucosa en la dieta control en comparación con la DAG (diferencia de -24.31 unidades, IC del 95%: -41.75 a -6.864). Esto se confirma en varios puntos de tiempo de medición, donde los niveles de glucosa son significativamente más bajos en la dieta control en comparación con la dieta DAG, especialmente a los 30 minutos ($p = 0.0572$). Sin embargo, no se observan diferencias significativas en los niveles basales ($p = 0.8968$), a los 15 minutos ($p = 0.5447$), a los 60 minutos ($p = 0.8265$) y a los 120 minutos ($p = 0.9991$). Los detalles del test muestran consistencia con estas conclusiones, destacando las diferencias en las medias y los tamaños de las muestras en cada punto de tiempo de medición.

Curva de tolerancia a la glucosa en ratones progenitores con dieta control y dieta alta en grasa



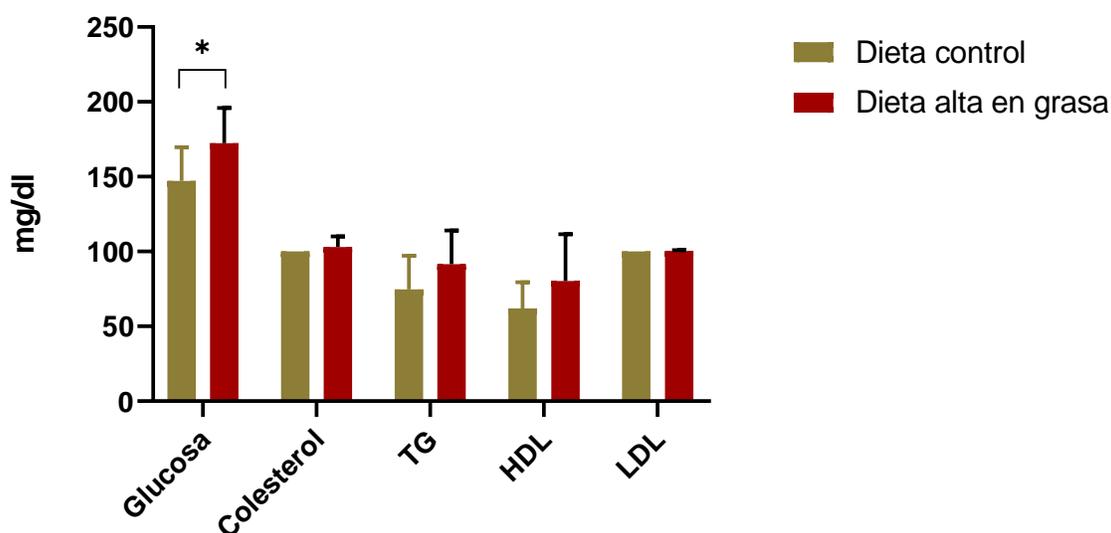
Gráfica 2. Curva de tolerancia oral a la glucosa en ratones en ratones progenitores con dieta control (DAG). El grupo control consistió en 10 ratones progenitores alimentados con dieta control durante 8 semanas, mientras que el grupo DAG estuvo compuesto por 13 ratones progenitores alimentados con dieta alta en grasa durante el mismo período. Las mediciones se realizaron después de un ayuno de 4 horas, utilizando un glucómetro portátil (OneTouch) para medir los niveles de glucosa en muestras de sangre obtenidas de una pequeña incisión en la vena de la cola. Se tomaron mediciones de glucosa basal y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de una dosis de glucosa (2g/kg de peso corporal). Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****) y no significativo como (ns).

Así mismo, se realizó un análisis de los niveles basales de glucosa y perfil lipídico en ratones progenitores alimentados con dieta control y se compararon con los ratones alimentados DAG. En la Gráfica 3, se observó una diferencia significativa en los niveles de glucosa entre los grupos de dieta control y dieta alta en grasa,

con un valor de p ajustado de 0.0175. La glucosa basal fue significativamente más baja en los progenitores con dieta control en comparación con aquellos con dieta alta en grasa.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol, triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) entre los grupos de dieta control y dieta alta en grasa. Los valores de p ajustados para estas comparaciones fueron mayores que 0.05, lo que indica que las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Glucosa y perfil lipídico en ratones progenitores con dieta control y dieta alta en grasa



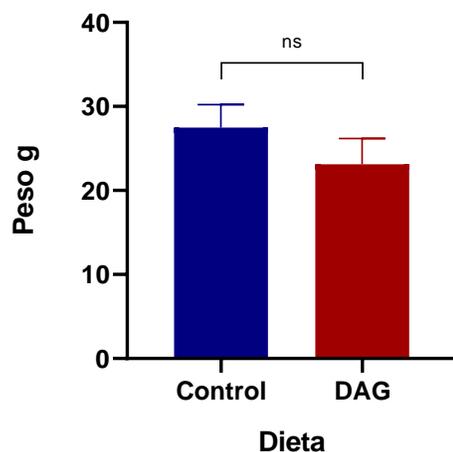
Gráfica 3. Comparación de los niveles medios de glucosa y perfil lipídico entre ratones progenitores alimentados con dieta control (normopeso) y dieta alta en grasa (obesidad). Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Sidak para analizar las diferencias entre los grupos. Los resultados muestran que los niveles de glucosa fueron significativamente más bajos en el grupo de dieta control en comparación con el grupo de dieta alta en grasa (diferencia media = -

25.18, intervalo de confianza del 95% = -47.24 to -3.122, p ajustado = 0.0175). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol, triglicéridos (TG), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) entre los grupos ($p > 0.05$ para todas las comparaciones)."

6.2 Parámetros metabólicos y respuesta inmunológica de la progenie

Una vez determinado que los ratones progenitores alimentados con una dieta alta en grasa desarrollaron obesidad después de 8 semanas de DAG, se observaron niveles de glucosa basal alterados. Aun cuando, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de lípidos en suero entre los grupos de dieta control y dieta alta en grasa. Se presume que estos parámetros ya estaban disfuncionales al momento de la cruce. La progenie obtenida de estos padres fue separada de sus padres a los 21 días de nacidos, recién destetados, y se observó que no hay una diferencia significativa de peso, como se muestra en la Grafica 4. Lo que sugiere que la DAG no ha tenido un efecto notable en el peso de los descendientes de los progenitores con obesidad en comparación con el grupo control al menos a la edad en la que se inició el experimento y dado que no había diferencia de peso suponemos que tampoco presentaban ninguna alteración metabólica.

Comparación de peso en ratones descendientes de progenitores con dieta control y DAG



Gráfica 4. Comparación del peso promedio en ratones descendientes de progenitores con dieta control y dieta alta en grasa (DAG). El grupo control está compuesto por 16 ratones de 21 días de edad, descendientes de progenitores alimentados con dieta control durante 8 semanas, mientras que el grupo DAG se compone de 31 ratones descendientes de progenitores alimentados durante 8 semanas con DAG. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de t de Student no pareada para determinar la significancia estadística entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****) y no significativo como (ns). No se encontró una diferencia significativa entre el grupo de ratones descendientes de progenitores alimentados con dieta control y los alimentados con DAG.

Los ratones descendientes se dividieron en 4 grupos experimentales, descendientes de padres con obesidad vacunados y otro sin vacunar, y de igual manera para las crías de padres normopeso. La vacuna fue aplicada vía subcutánea, lo equivalente a 1.5 μg de HA de H1N1, 1.5 μg de la cepa H3N2 y 1.5 μg de la cepa de influenza B Washington, respectivamente.

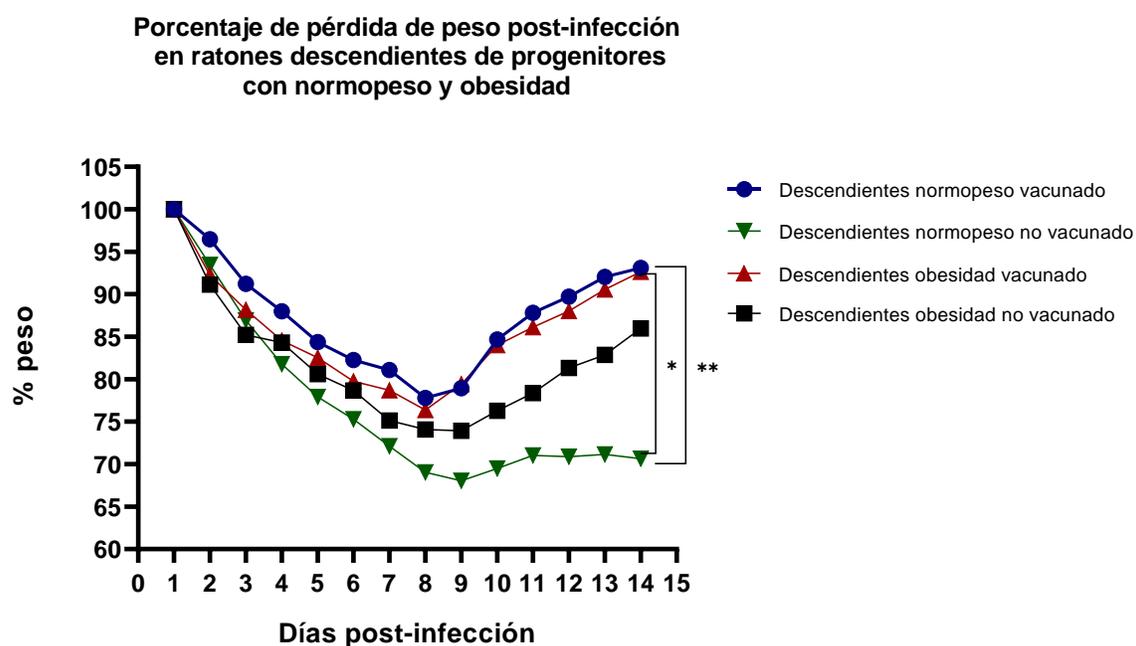
Para evaluar la protección inducida por la vacuna trivalente VAXIGRIP en los grupos experimentales, los ratones fueron retados a los 21 días posteriores a la

vacunación con el virus A/H3N2/ NT/60/68 de origen humano adaptado al ratón, en una dosis de 200 UFF vía intranasal. Para evaluar la protección se tomaron en cuenta la morbilidad y la mortalidad de los animales. Para la morbilidad se toma en cuenta la pérdida de peso a lo largo de 14 días post reto. Se consideró como muerte por influenza a aquellos ratones que perdieron el 30% de su peso inicial y fueron sacrificados para evitar sufrimiento adicional al animal.

En la gráfica 5, se muestran los resultados de los grupos experimentales: el grupo 1, compuesto por descendientes normopeso vacunados, que se estableció como el grupo control positivo, es decir el de mayor protección. El grupo 2, compuesto por descendientes normopeso sin vacuna, se consideró como el control negativo. Se encontró una diferencia importante entre los ratones vacunados y los no vacunados ($p = 0.0031$), mostrando que la vacunación ofrece mayor protección. A los 8 días después de la infección, el Grupo 1 perdió el 22.21% de su peso inicial y recuperó el 14.86% del peso perdido a los 14 días. En contraste, el Grupo 2 perdió el 30.4% de peso a los 8 días y solo recuperó el 1.63% a los 14 días.

Bajo las mismas condiciones, los grupos 3 y 4, compuestos por ratones descendientes de progenitores con obesidad, fueron vacunados y posteriormente retados con el virus. El Grupo vacunado recuperó el 16.3% de peso perdido a los 14 días, mientras que el no vacunado recuperó el 11.86%. Las pruebas de Tukey mostraron una diferencia significativa entre los ratones no vacunados descendientes de padres normopeso y los vacunados descendientes de padres con obesidad ($p = 0.0171$) con un valor de $p < 0.05$ (*). Estos resultados indican

que la vacunación tuvo un efecto significativo en la prevención de la pérdida de peso asociada a la infección por el virus de influenza en ratones descendientes de progenitores normopeso. Se observó que, en los ratones descendientes de padres con obesidad, la pérdida de peso es menor, incluso en los ratones no vacunados. Por ende, sugieren que la respuesta a la vacunación varía dependiendo del peso inicial de los ratones, siendo más efectiva en ratones con normopeso.

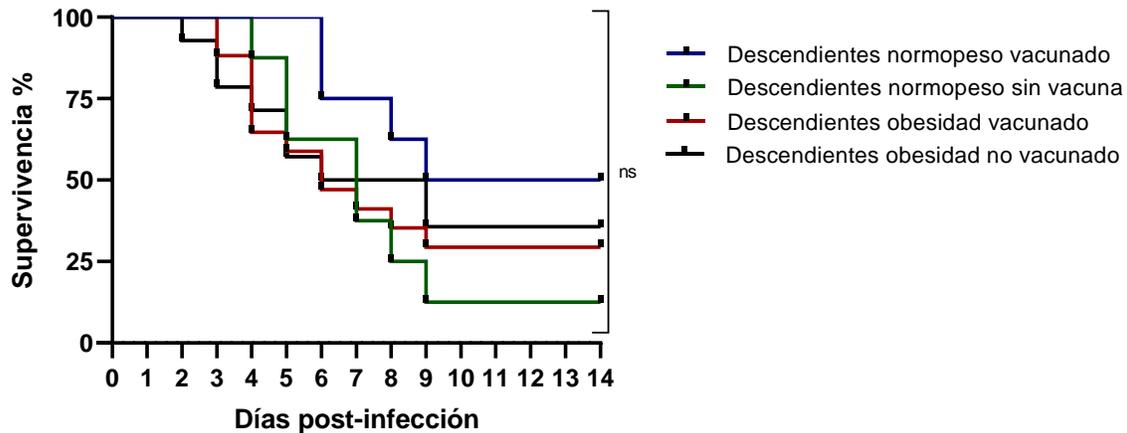


Gráfica 5: Pérdida de peso post-infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2 en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad. Ratones de la cepa C57BL6J descendientes de padres con normopeso y obesidad fueron inmunizados a los 21 días de edad con 50 μ L de la vacuna trivalente vía subcutánea en una dosis de 1.5 μ g de HA para H1N1, H3N2 y de influenza B cepa Washintong, o recibieron solo vehículo (no vacunados). 21 días posteriores a la inmunización fueron retados i.n. con 200 UFF del virus de influenza. Los ratones fueron monitoreados durante los 14 días posteriores a la infección, para la observación de signos de enfermedad y pérdida de peso. Se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey's para determinar las diferencias entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****). Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.01$ (**)) en el grupo de normopeso no vacunado comparado con el grupo normopeso vacunado y $p < 0.05$ (*) obesidad vacunado comparado con el grupo de normopeso no vacunado.

En la gráfica 6, se muestra la tasa de supervivencia de los diferentes grupos experimentales. Se observa que en los ratones descendientes de progenitores con normopeso vacunados, tiene una tasa de supervivencia del 50.9%, mientras que los ratones descendientes de progenitores normopeso que no fueron vacunados, presenta una tasa de supervivencia del 11.4%. Por otro lado, en el grupo compuesto por descendientes de progenitores con obesidad que fueron vacunados, muestra una tasa de supervivencia del 29.45%, mientras que el último grupo, formado por descendientes de progenitores con obesidad que no fueron vacunados, tiene una tasa de supervivencia del 35.37%.

Se realizó una comparación de las curvas de supervivencia entre los grupos aplicando el test de log-rank de Mantel-Cox, no encontrando una diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de los grupos. Aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística, la tasa de supervivencia del grupo de descendientes de progenitores con normopeso que fueron vacunados (50.9 %) es más alta que la del grupo de descendientes de progenitores con obesidad vacunado (29.45%), mostrando una tendencia en la disminución en la mortalidad y morbilidad de los ratones vacunados tanto en ratones descendientes de ratones normopeso como en ratones descendientes de padres con obesidad. Es importante mencionar que también los días de evolución de la enfermedad muestran que los ratones no vacunados mueren días antes que los que mueren del grupo vacunado.

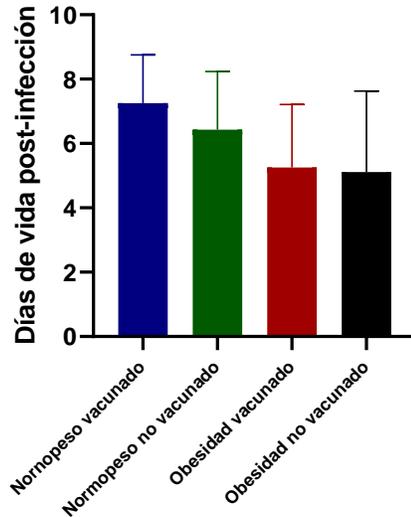
**Tasa de supervivencia post-infección
en ratones descendientes de progenitores
con normopeso y obesidad**



Gráfica 6. Tasa de supervivencia post-infección en ratones retados con virus de influenza H3N2 descendientes de progenitores con normopeso y obesidad. Los ratones descendientes de padres con normopeso y con obesidad fueron inmunizados a los 21 días de edad con 50 μ L de la vacuna trivalente vía subcutánea, seguido de un desafío con 200 UFF del virus de influenza a los 21 días. Se observó la tasa de mortalidad durante los 14 días posteriores a la infección. Para el análisis estadístico, se llevó a cabo una comparación de las curvas de supervivencia entre los grupos utilizando el test de log-rank de Mantel-Cox. Los resultados indicaron que no se encontró una diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de los grupos (Chi-cuadrado = 2.506, grados de libertad = 3, $p = 0.47$).

En la Gráfica 7, se presenta una comparación de la respuesta a la vacunación, mostrando los días de sobrevida en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad, tanto vacunados como no vacunados. Mediante el análisis de comparaciones múltiples de Tukey, se determinó que no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos en cuanto a su respuesta a la vacunación.

Comparación de respuesta a la vacunación en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad



Gráfica 7. Comparaciones de la respuesta a la vacunación en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad. Los ratones descendientes de padres con normopeso y con obesidad fueron inmunizados a los 21 días de edad con 50 μL de la vacuna trivalente vía subcutánea, seguido de un desafío con 200 UFF del virus de influenza 21 días después. Se observó la tasa de mortalidad durante los 14 días posteriores a la infección. Para el análisis estadístico, se realizó la prueba de Tukey de múltiples comparaciones, las barras representan la diferencia media entre los grupos comparados, y los intervalos de error muestran el intervalo de confianza del 95% para estas diferencias medias. Los resultados indicaron que no se encontró una diferencia significativa entre los grupos.

En la siguiente gráfica se muestran los niveles de anticuerpos específicos contra el virus de influenza en ratones vacunados y sobrevivientes a la infección. Los anticuerpos séricos fueron determinados utilizando un ensayo de ELISA de captura. En la gráfica 8, se observa una diferencia significativa en los niveles de anticuerpos específicos contra influenza H3N2 entre ratones normopeso vacunados y no vacunados. Los niveles son significativamente más altos en los

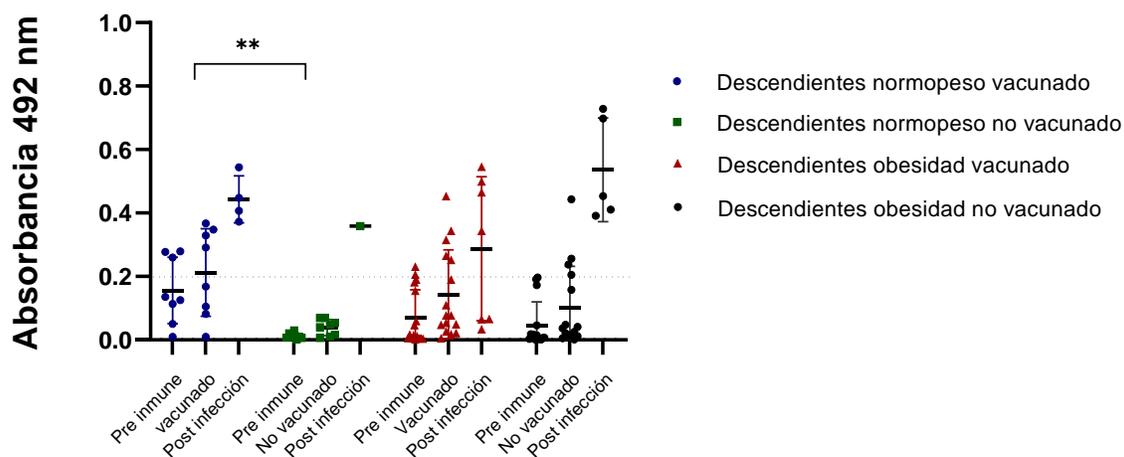
ratones normopeso vacunados y desafiados con el virus ($p < 0.01$) en comparación con los no vacunados. Sin embargo, se encontró que solo 4 ratones presentaron niveles de anticuerpos por encima de la línea de fondo, y otros 4 mantuvieron niveles similares a los detectados antes de la inmunización.

En los otros grupos, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos entre ratones normopeso y obesos, ya sean vacunados o no. Entre los ratones descendientes de progenitores con obesidad que fueron vacunados, de un total de 16 ratones, 5 tuvieron anticuerpos detectables, similares a los niveles de los ratones normopeso después de la vacunación y la infección. Incluso entre los que sobrevivieron a la infección, los niveles de anticuerpos fueron similares a los de los ratones normopeso.

Un resultado sorprendente fue observado en el grupo de descendientes de progenitores con obesidad que no fueron vacunados. A pesar de no recibir la vacuna, sobrevivieron más a la infección que el grupo de descendientes de progenitores normopeso. Solo 1 ratón en este grupo sobrevivió y generó anticuerpos, lo que destaca la importancia de explorar más a fondo cómo la obesidad y otros factores pueden influir en la respuesta inmune ante la influenza. Estos resultados sugieren que existen otros mecanismos protectores en los ratones vacunados, como la respuesta de células T CD4 y T CD8, parámetros no evaluados durante este estudio. Así mismo, se evaluaron los niveles de anticuerpos específicos para la cepa H1N1, esto debido a que la vacuna trivalente posee ambas cepas en su formulación, sin embargo, los niveles de anticuerpos

séricos contra H1N1, fueron muy bajos mostrando la inmunodominancia de la cepa H3N2, lo que llevó a continuar la evaluación exclusivamente para esta cepa.

Anticuerpos sericos (Ig G) específicos contra influenza H3N2



Gráfica 8. Anticuerpos específicos contra influenza H3N2 en ratones descendientes de progenitores con normopeso y obesidad, divididos en grupos vacunados y no vacunados con la vacuna trivalente contra influenza. Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos contra influenza mediante una Elisa de captura, utilizando sueros recolectados a los 21 días después de la vacunación y a los 14 días después de la infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2. Se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett para determinar las diferencias entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (\cdot), $p < 0.01$ ($\cdot\cdot$), $p < 0.001$ ($\cdot\cdot\cdot$), y $p < 0.0001$ ($\cdot\cdot\cdot\cdot$), y no significativo como (ns). Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.01$ ($\cdot\cdot$)) en el grupo de normopeso no vacunado comparado con el grupo normopeso vacunado.

6.3 Respuesta inmunológica de los progenitores

Dado que no encontramos grandes alteraciones en la respuesta inmune de los descendientes de progenitores con normopeso y descendientes de progenitores con obesidad vacunados, en cuanto a su producción de anticuerpos específicos y

supervivencia, evaluamos la respuesta inmunológica en los progenitores. Como se mostró en las Gráficas 1 y 2, los ratones alimentados con DAG desarrollaron obesidad tras 8 semanas de DAG y mostraron alteraciones en los niveles basales de glucosa.

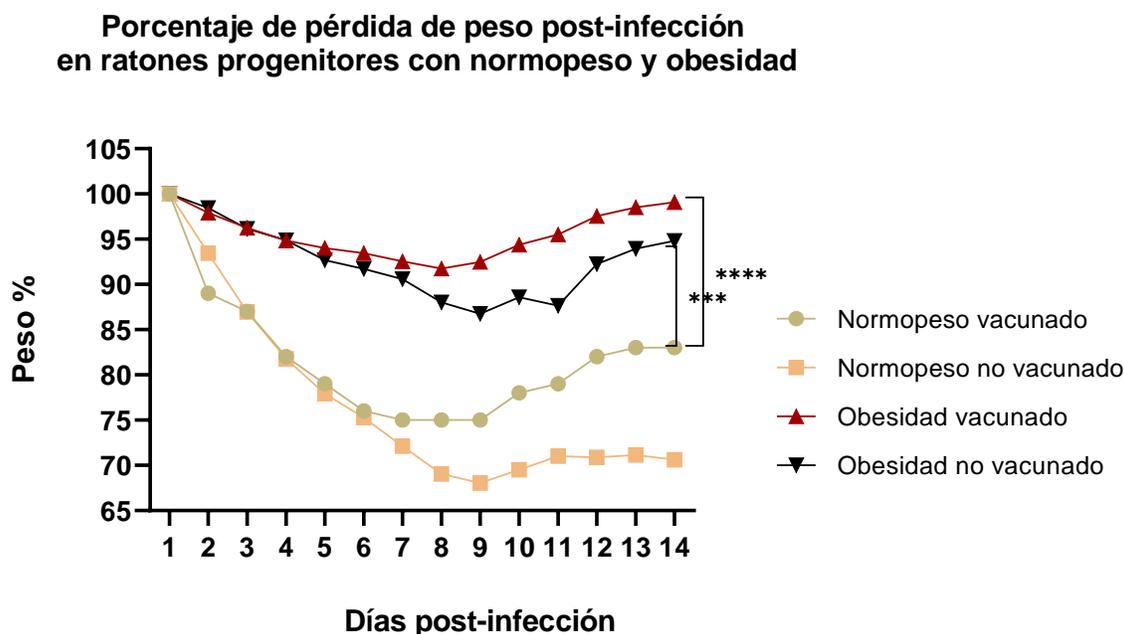
Los ratones progenitores alimentados con dieta control o DAG se dividieron en 4 grupos experimentales, progenitores con normopeso y obesidad vacunados y otro sin vacunar. La vacuna fue aplicada vía subcutánea, lo equivalente a 1.5 µg de HA de H1N1, 1.5 µg de la cepa H3N2 y 1.5 µg de la cepa de influenza B Washington, a las 14 semanas de edad, la inmunización se repitió 3 semanas después (refuerzo). La primera vacuna se administró para estimular la respuesta inmune inicial contra el virus de la influenza. El refuerzo se administra después de 21 días para fortalecer y prolongar esta respuesta inmune, especialmente en ratones con obesidad, donde la respuesta inmune puede estar comprometida.

Para evaluar la protección inducida por la vacuna trivalente VAXIGRIP en los grupos experimentales, los ratones fueron retados a los 21 días posteriores a la vacunación con el virus A/H3N2/ NT/60/68 de origen humano adaptado al ratón, en una dosis de 200 UFF vía intranasal. Para evaluar la protección se tomaron en cuenta la morbilidad y la mortalidad de los animales. Para la morbilidad se toma en cuenta la pérdida de peso a lo largo de 14 días post reto. Se consideró como muerte por influenza a aquellos ratones que perdieron el 30% de su peso inicial y fueron sacrificados para evitar sufrimiento adicional al animal.

Como se observa en la gráfica 9. La prueba de Dunnett para comparaciones múltiples revela diferencias significativas en el porcentaje de peso perdido entre varios grupos:

Entre los ratones normopeso vacunados y no vacunados, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.1574$), lo que sugiere que la vacunación en ratones normopeso no tuvo un impacto significativo en la pérdida de peso después de la infección. Se observó que los ratones normopeso vacunados experimentaron una pérdida máxima de peso del 25% de su peso inicial al día 5 después de la infección por el virus de la influenza. Sin embargo, mostraron una recuperación del 8% al día 14 post-infección. En contraste, los ratones normopeso sin vacuna continuaron perdiendo peso hasta el día 9, con una pérdida del 32% de su peso inicial, y solo lograron recuperar un 2% al día 14. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre los ratones normopeso vacunados y los ratones con obesidad, ya sea vacunados o no vacunados. Los ratones con obesidad, tanto vacunados ($p < 0.0001$) como no vacunados ($p = 0.0001$), perdieron significativamente menos peso después de la infección en comparación con los ratones normopeso vacunados. Los ratones con obesidad que fueron vacunados mostraron una pérdida máxima de peso del 8.25% de su peso inicial al día 8 después de la infección y lograron recuperar aproximadamente el 7.3% de su peso al día 14, casi volviendo a su peso inicial. En contraste, los ratones con obesidad que no fueron vacunados experimentaron una pérdida del 13.24% de su peso inicial al día 9, seguida de una recuperación del 8% al día 14.

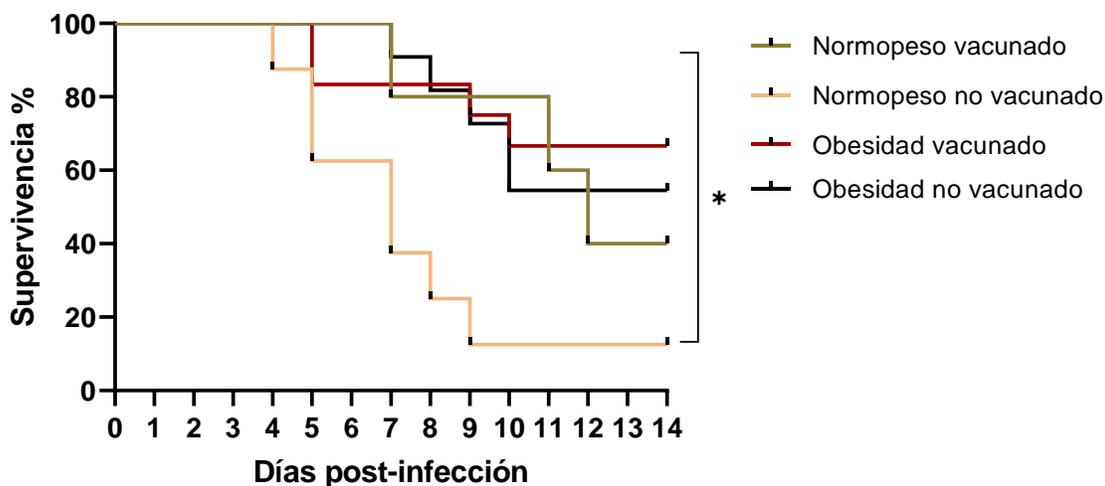
Estos resultados sugieren que la obesidad en los progenitores influye significativamente en la pérdida de peso posterior a la infección por el virus de la influenza, con una mayor pérdida de peso observada en progenitores con normopeso, independientemente de si fueron vacunados o no.



Gráfica 9: Pérdida de peso post-infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2 en ratones progenitores con normopeso y obesidad. Ratones de la cepa C57BL6J progenitores con normopeso y obesidad fueron inmunizados a las 14 semanas de edad con 50 μL de la vacuna trivalente vía subcutánea en una dosis de 1.5 μg de HA para H1N1, H3N2 y de influenza B cepa Washintong, o recibieron solo vehículo (no vacunados). La inmunización se repitió 3 semanas después (refuerzo). 21 días posteriores a la segunda inmunización fueron retados i.n. con 200 UFF del virus de influenza. Los ratones fueron monitoreados durante los 14 días posteriores a la infección, para la observación de signos de enfermedad y pérdida de peso. Se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey's para determinar las diferencias entre los grupos, considerando valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****). Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.01$ (**)) en el grupo de normopeso no vacunado comparado con el grupo normopeso vacunado y $p < 0.05$ (*) obesidad vacunado comparado con el grupo de normopeso no vacunado.

En la gráfica 10, se muestra la tasa de supervivencia después de la infección con el virus de influenza en ratones normopeso y con obesidad vacunados y no vacunados. En el grupo control (alimentado con dieta estándar), se observó que comenzó a perder peso después del reto con el virus de influenza, el 40% murió entre el día 7 y 9 el 60% de los ratones sobrevivieron. En el grupo de padres que fueron alimentados con DAG vacunados, tuvo una mortalidad del 100 % entre el día 6 y 10. En un tercer grupo, ratones alimentados con DAG no vacunados, se observó una tasa de supervivencia del 33.33%. Cuando los ratones pierden del 25 al 30 % de su peso corporal, son considerados como muerte por Influenza.

Tasa de supervivencia post-infección en ratones progenitores normopeso y obesidad



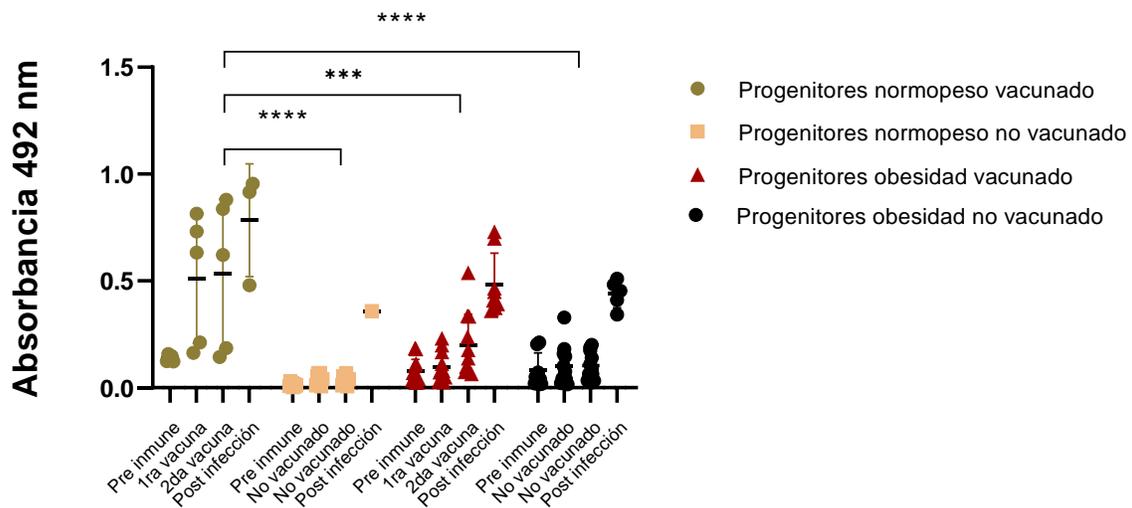
Gráfica 10. Tasa de supervivencia post-infección con el virus de influenza H3N2 en ratones normopeso y obesidad (progenitores). Los ratones progenitores con normopeso y obesidad fueron inmunizados después de 8 semanas de alimentación estándar o DAG, con 50 μ L de la vacuna trivalente vía subcutánea, seguido de un desafío con 200 UFF del virus de influenza 21 días después. Se observó la tasa de mortalidad durante los 14 días posteriores a la infección. Para el análisis estadístico, se llevó a cabo una comparación de las curvas de supervivencia entre los grupos utilizando el test de log-rank de Mantel-Cox. Los resultados indicaron que no se encontró

una diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de los grupos (Chi-cuadrado = 11.95, grados de libertad = 3, $p = 0.0076$).

Además, se determinaron los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza en ratones progenitores con dietas control y DAG mediante un ensayo de ELISA de captura, grafica 11. Se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples de Sidak, el cual reveló diferencias significativas en los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza H3N2 entre los grupos de ratones evaluados. En primer lugar, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza entre los ratones progenitores normopeso vacunados y no vacunados. Los niveles de anticuerpos fueron significativamente más altos en los ratones normopeso vacunados en comparación con los no vacunados. Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0005$) en los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza entre los ratones progenitores normopeso vacunados y los ratones progenitores con obesidad vacunados. Los niveles de anticuerpos fueron más altos en los ratones normopeso vacunados. Asimismo, se identificó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza entre los ratones progenitores normopeso vacunados y los ratones progenitores con obesidad no vacunados. Los niveles de anticuerpos fueron significativamente más altos en los ratones normopeso vacunados.

Estos resultados sugieren que la vacunación contra la influenza tiene un impacto significativo en la producción de anticuerpos específicos en ratones normopeso en comparación con los ratones no vacunados y los ratones con obesidad.

Anticuerpos sericos (Ig G) específicos contra influenza H3N2



Gráfica 11. Anticuerpos séricos específicos contra influenza H3N2 en ratones normopeso y con obesidad, divididos en grupos vacunados y no vacunados con la vacuna trivalente. Se analizaron los niveles de anticuerpos mediante ELISA de captura, utilizando sueros recolectados a los 21 días después de la primera y segunda vacunación, y a los 14 días después de la infección con 200 UFF del virus de influenza H3N2. El análisis estadístico de comparaciones múltiples de Sidak revela diferencias significativas en los niveles de anticuerpos específicos contra la influenza. Las comparaciones entre ratones progenitores normopeso vacunados y no vacunados, así como entre ratones progenitores normopeso vacunados y ratones progenitores con obesidad vacunados y no vacunados, muestran diferencias estadísticamente significativas, con valores de p ajustados <0.0001 y 0.0005 respectivamente.

7. DISCUSIÓN

La obesidad representa un gran reto para la salud pública ya que ejerce un impacto considerable sobre la respuesta inmune del organismo, lo cual aumenta significativamente la susceptibilidad a las infecciones y sus complicaciones. Se ha documentado que la obesidad induce un estado de inflamación crónica que conlleva cambios significativos en la función de las células del sistema inmune, resultando en una desregulación generalizada y favoreciendo la aparición de procesos inflamatorios exacerbados. Este estado inflamatorio crónico asociado con la obesidad puede afectar negativamente la capacidad del sistema inmune para montar una respuesta eficaz ante patógenos como el virus de la influenza, infección respiratoria que suele ser grave e incluso causar la muerte, tanto en humanos como en animales con obesidad, en donde aumenta el riesgo de complicaciones aún en individuos vacunados (40,59). Si bien la obesidad puede presentarse en todas las etapas de la vida, en nuestro trabajo nos enfocamos a evaluar el impacto de la obesidad parental sobre la descendencia, particularmente en la respuesta inmune protectora generada por una vacuna comercial contra el virus influenza, para posteriormente ser retados con un virus influenza de origen humano, adaptado para infectar ratón, de tal manera que el modelo, nos permitió evaluar la producción de anticuerpos, la morbilidad y la mortalidad, parámetros que indican el grado de eficiencia de la vacuna administrada.

La vacunación contra el virus influenza sigue siendo la principal medida preventiva para evitar complicaciones y enfermedades graves asociadas con esta infección respiratoria. La influenza afecta principalmente a personas con sistemas inmunes comprometidos, adultos mayores y niños menores de 2 años. En el caso de individuos con enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes o el síndrome metabólico, la infección por influenza puede causar neumonía grave e incluso la muerte (60), por lo que la vacunación es ampliamente recomendada, aunque se ha estudiado que en estas enfermedades crónicas la respuesta inducida por las vacunas puede ser deficiente (59), por lo tanto, es crucial comprender cómo factores como la obesidad de los progenitores pueden afectar la respuesta a la vacunación y la infección por el virus de influenza en los descendientes.

Durante el desarrollo de la primera parte del presente proyecto se generaron los ratones con obesidad alimentados con una DAG, esta dieta es comercial por lo que se conoce su contenido preciso de macro y micronutrientes, y administrada durante 8 semanas generó aumento en el peso de los ratones. Este modelo se encuentra ampliamente caracterizado y estandarizado en el laboratorio del Dr. Gustavo Pedraza del IBT-UNAM. Durante el proceso de generación de obesidad, es importante mezclar heces fecales de los animales que están con DAG con los normopeso con dieta estándar, esto minimizará la posible influencia de la microbiota en los cambios metabólicos e inmunológicos de los ratones (61). Una vez pasadas las 8 semanas y con un notable aumento del peso casi el 40%,

tomamos parámetros bioquímicos, tales como la glucosa basal, curvas de tolerancia oral a la glucosa, triglicéridos, HDL y LDL. El colesterol total no fue posible de medir con el equipo portátil que se utilizó, muy probablemente a la sensibilidad de las tiras reactivas utilizadas, en todos los casos nos marcaba por abajo del límite de detección. Si bien los cambios no fueron muy evidentes, la glucosa basal muestra un aumento significativo en los ratones con obesidad, lo que nos indica que hay cambios en el metabolismo. Cabe mencionar que estos ratones son muy jóvenes y el tiempo de inducción es relativamente corto, por lo que con más tiempo de alimentación con DAG, los ratones desarrollaran más signos del síndrome metabólico y marcadores de inflamación (61). Teniendo estos datos, se procedió a realizar las cruzas poniendo a ambos padres con obesidad, esperando que las cruzas fuesen exitosas. Se colocaron de 2 a 3 hembras por macho, tratando de aumentar la probabilidad de embarazo. Las hembras una vez preñadas, fueron separadas y se siguieron alimentando con la DAG hasta el destete de sus crías, el cual se lleva a cabo a los 21 días de nacidos. Cabe mencionar, que estas cruzas resultaron muy complicadas, pues los ratones tanto hembras como machos presentan un aumento importante en el peso corporal y una baja en la fertilidad, además de que algunas de las hembras que daban a luz, se comieron a sus crías, muy probablemente por el estado metabólico alterado en el que se encuentran. Los descendientes eran separados en machos y hembras y posteriormente alimentados con una dieta balanceada, pues el objetivo de este trabajo se centra en el efecto de la obesidad de los progenitores, y no del efecto

de la dieta en los descendientes. Los animales fueron divididos en grupos para ser retados con el virus, y otros grupos para ser vacunados y posteriormente retados.

Para el caso de los ratones progenitores alimentados con la dieta estándar o con la DAG, también fueron inmunizados con la vacuna trivalente y retados para evaluar el efecto de la obesidad sobre la respuesta inmune utilizando el modelo de vacunación e infección por Influenza. Los resultados obtenidos fueron contrarios a lo esperado y lo reportado por Alarcon et al., en donde los ratones alimentados con una dieta alta en grasa y con obesidad, entre mayor era el aumento de peso, mayor la gravedad de la infección. En nuestros ensayos, los ratones con obesidad presentaron una menor pérdida de peso y una mayor tasa de supervivencia, siendo la mortalidad de un 25 % en los ratones con obesidad vacunados y en los no vacunados del 50 %. Con respecto a los ratones normopeso, presentaron una severidad mayor ante el reto sobreviviendo solo el 25% de los ratones no vacunados y alrededor de un 60% en los vacunados. En ambos grupos, se demuestra que la vacunación es un factor protector contra la enfermedad grave y muerte. Cabe mencionar, que la diferencia principal entre lo reportado por Alarcon et al., y otros grupos como el de Guo et. al., es el tiempo de alimentación de los ratones a los que se les induce obesidad pues a diferencia de los nuestros que fueron alimentados por alrededor de 8 semanas, estos ratones fueron alimentados por aproximadamente 20 semanas, lo cual podría estar relacionado con que no hay un daño fisiológico establecido y el estado de inflamación crónica no ha sido suficiente como para deteriorar el sistema inmune bajando su eficiencia (62,63).

Por otra parte, existen evidencias de que, en ciertos contextos, la obesidad puede conferir protección ante ciertos patógenos. A este fenómeno se le conoce como la “paradoja de la obesidad”. Este fenómeno sugiere que el aumento en el tejido adiposo puede tener un papel sobre la respuesta inmune actuando como un reservorio de energía lo cual permite un menor deterioro de los tejidos (62,64), además de algunas teorías en donde en la obesidad hay disfunción de las células T citotóxicas lo cual generaría un menor daño a nivel pulmonar (65), sin embargo, faltan estudios que demuestren en que contextos la obesidad podría estar actuando como un factor protector o de resistencia hacia las infecciones por el virus Influenza. Estos ensayos se llevaron a cabo en ratones macho y hembra con obesidad que no fueron utilizados para las cruces, o que no lograron el embarazo. Los resultados fueron interesantes, por lo que se plantea en algún futuro seguir estudiando el fenómeno observado en ratones con obesidad. Una vez que se tenían datos sobre los ratones que serían los progenitores, procedió a evaluar entonces la respuesta en los ratones descendientes. Aunque se sabe poco de como el sobrepeso y la obesidad pregestacional o gestacional afecta al sistema inmune, es importante destacar que el impacto de estos factores ambientales durante la morfogénesis y diferenciación de otros órganos y sistemas ha sido ampliamente descrito, como en el caso del desarrollo del sistema nervioso, en donde es evidente que la obesidad materna tiene efectos negativos (66,67). Por esta razón, en este trabajo se planteó el evaluar el sistema inmune de ratones descendientes de padres con obesidad, utilizando el modelo de vacunación-reto con el virus influenza, el cual está ampliamente caracterizado en nuestro

laboratorio (68). Este modelo permitió evaluar el grado de protección inducido por la vacuna trivalente comercial ante el reto con un virus influenza adaptado para infectar ratones. Aunque la vacuna utilizada en nuestro estudio induce una protección parcial, esto debido a que la cepa vacunal es diferente a la cepa con la que retamos a los animales, nos resultó suficiente para evaluar su eficacia en este contexto particular. El primer dato interesante, es que los ratones descendientes de padres con obesidad no presentan cambios en el peso corporal al llegar al destete, lo que nos indica que los ratones aun nacidos y lactados por madres con obesidad, no presentan daños metabólicos que se observen a corto plazo, al igual que los parámetros bioquímicos los cuales resultaron normales. Sin embargo, existen evidencias de que tanto humanos como modelos animales hijos de madres con obesidad, cuando son adultos y envejecen tienen un mayor riesgo de desarrollar obesidad y enfermedades metabólicas que los descendientes de padres normopeso (69,70). No obstante, en nuestro proyecto se utilizaron ratones jóvenes vacunados al destete, esto con la finalidad de evitar que la edad y el posible deterioro metabólico, influyeran sobre la respuesta inmune, que en nuestro contexto tendría que verse alterada por el ambiente obesogénico e inflamatorio de los padres.

Una vez que se logró tener un número suficiente de crías para establecer los grupos experimentales, estos fueron vacunados y posteriormente retados con el virus de la cepa H3N2, el cual es altamente virulento en dosis mayores a 200 UFF. Este virus causa una infección respiratoria aguda que provoca la pérdida de peso,

pelo erizado, letargo y eventualmente la muerte⁽¹⁵⁾ . Sin embargo, cuando hay una vacunación, estos signos y la mortalidad se ven disminuidas. En los resultados se observó que en los ratones descendientes de ratones normopeso, la diferencia en la pérdida de peso entre ratones vacunados y no vacunados es significativa, evidenciando que la vacunación tuvo un efecto protector contra la pérdida de peso asociada a la infección por influenza. Sin embargo, la protección inducida por la vacuna trivalente no fue tan evidente en los ratones descendientes de progenitores con obesidad, sugiriendo una posible disfunción en la respuesta inmune. En cambio, en los ratones descendientes de padres normopeso, los resultados fueron los esperados, pues hay cambios tanto en la morbilidad como en la mortalidad, siendo evidente el beneficio de la vacunación en este grupo. Cuando se llevó a cabo el reto con el virus infeccioso, los ratones descendientes de padres con obesidad, no mostraron diferencias entre la pérdida de peso y en la tasa de mortalidad, la cual paradójicamente, es menor que en los ratones vacunados descendientes de padres normopeso, lo cual nos sugiere, que hay un mecanismo metabólico diferencial que protege de la pérdida de peso, en donde al parecer, los ratones descendientes de padres con obesidad presentan una mejor recuperación ante el reto en los ratones sobrevivientes. Sin embargo, en los ratones vacunado y no vacunados descendientes de padres con obesidad, no hay diferencias en la pérdida de peso, teniendo ambos grupos una tasa de mortalidad de aproximadamente 30%, comparado con arriba del 50 % en ratones vacunados descendientes de padres normopeso. Este resultado, era de esperarse, pues la vacuna parece no estar teniendo un efecto protector en los ratones descendientes

de padres con obesidad, como lo planteado en nuestra hipótesis, sin embargo, la menor pérdida de peso, y la alta recuperación posterior al reto, nos habla de un mecanismo de resistencia a la infección anteriormente mencionado en el trabajo de Guo et al., 2017, en donde los descendientes de madres con obesidad que fueron alimentadas con dietas altas en grasa durante 20 semanas, muestran una mejor recuperación, menor daño pulmonar en una infección con el virus Influenza (71). La diferencia principal, entre el reporte previo de Guo, et al. con nuestro proyecto, es que nosotros vacunamos e infectamos muy cercanos al destete, mientras que el grupo de Guo, infecta cuando la descendencia cumplió 20 semanas de edad, mostrando el efecto de la obesidad materna y de la dieta alta en grasa sobre el sistema inmune a largo plazo, demostrando una resistencia a la infección por el virus influenza en los ratones cuyas madres tuvieron obesidad, reflejando un menor daño pulmonar, menor pérdida de peso y una mejor función de células T, sugiriendo que hay una respuesta de células T diferencial, que en este caso genera protección. Cabe mencionar, que en el caso de neumonía por el virus Influenza, hay una gran actividad de células T que, en algunas condiciones, provoca más daño que reparación, por lo que, el que haya menos células T en los ratones descendientes de madres con obesidad podría explicar en parte el fenómeno de resistencia y recuperación en estos (40,72). Estos resultados son similares a los que nosotros observamos, sin embargo, en este trabajo no se evalúa la vacunación, solo la infección en ratones adultos descendientes de madres con obesidad (71). La inducción en la producción de anticuerpos en la vacunación es de suma importancia para la resolución de la infección, y para

proteger de futuros encuentros con el mismo patógeno. En este proyecto, se midió la producción de anticuerpos específicos contra el virus influenza a los 21 días post-inoculación de la vacuna, y a los 21 días post-reto en los ratones sobrevivientes. Los resultados que obtuvimos en cuanto a los niveles de anticuerpos, se destacó una diferencia significativa entre los ratones descendientes de progenitores con normopeso vacunados y los no vacunados, como esperábamos, hay una mayor producción en los ratones que recibieron la vacuna. Al comparar los niveles de anticuerpos entre los ratones descendientes de progenitores con obesidad y los descendientes de progenitores con normopeso sin vacuna, observamos que hay una tendencia a una mayor producción de anticuerpos en el grupo de ratones descendientes de padres con obesidad incluso mayor que en los descendientes de padres normo peso. Aunque este resultado no fue significativo, es importante evaluar si estos anticuerpos son funcionales, el isotipo y el grado de neutralización. En los ratones vacunados del grupo de los ratones descendientes de padres con obesidad, observamos que la producción pre-reto y post-reto es muy baja, algo que no nos podría estar indicando que la obesidad parental podría estar afectando la producción de anticuerpos, como lo observado tanto en pacientes vacunados como en modelos murinos de vacunación contra influenza, en donde la obesidad, la diabetes y otras enfermedades crónicas afectan la producción de anticuerpos disminuyendo la eficacia de la vacuna (73,74).

Con base en estos resultados, se observa que la vacuna trivalente VAXGRIP es menos eficiente en los ratones descendientes de padres con obesidad, mostrando una tendencia a tener mayor tasa de mortalidad, menor producción de anticuerpos, pero menor pérdida de peso y una mayor recuperación en los ratones sobrevivientes como lo observado por (71), lo cual nos sugiere algún mecanismo metabólico o alguna reserva energética que pudiese estar actuando como un mecanismo protector ante la pérdida de peso por la infección por el virus influenza, ya que este fenómeno también fue observado en los ratones con obesidad, sin embargo, la mortalidad es mayor, demostrando que efectivamente la obesidad es un factor de riesgo para enfermedad grave y muerte, como lo ya reportado para la infección por el virus influenza, en donde la obesidad exacerba los síntomas y complica la recuperación (63). Los resultados obtenidos, muestran que la obesidad parenteral impacta en la respuesta inmune protectora ante retos inmunológicos como las vacunas y las infecciones virales, por lo que es necesario seguir estudiando los elementos inmunes alterados en estas condiciones, y además, analizar el fenómeno de la paradoja de la obesidad que podría estar contribuyendo a una resistencia a la infección, y una recuperación más rápida en los ratones infectados.

8. CONCLUSIONES

Conclusiones en Descendientes de Progenitores con Obesidad:

- Los ratones descendientes de progenitores con obesidad no vacunados muestran una menor pérdida de peso durante la infección por influenza y tienen una recuperación más rápida en comparación con otros grupos.
- La tasa de supervivencia en ratones descendientes de progenitores normopeso vacunados es más alta que la del grupo de descendientes de progenitores con obesidad y vacunados.
- Los ratones descendientes de progenitores con obesidad vacunados, que sobrevivieron al desafío con el virus de influenza, producen una mayor cantidad de anticuerpos específicos contra la influenza.
- La DAG induce obesidad y altera el metabolismo en los ratones alimentados por 8 semanas.
- Los ratones con obesidad pueden presentar una menor producción de anticuerpos específicos a la vacunación contra influenza en comparación con los ratones normopeso.

9. PERSPECTIVAS

- Se requiere de aumentar el número de ratones en cada grupo experimental para alcanzar la significancia estadística en la tasa de mortalidad.
- Es importante investigar el grado de neutralización de los anticuerpos producidos e identificar los subtipos de los anticuerpos generados para comprender mejor la eficacia y la naturaleza de la respuesta inmune en cada uno de los grupos experimentales.
- Evaluar el daño pulmonar progresivo causado por la infección con el virus de la influenza a lo largo del tiempo, mediante la observación y análisis de cambios histopatológicos, función pulmonar y marcadores inflamatorios en ratones descendientes de padres con obesidad.
- Determinar los marcadores inflamatorios presentes en la descendencia de padres con obesidad al nacer y post-infección.
- Evaluar la contribución de la obesidad materna y/o paterna por separado en la respuesta inmune utilizando el modelo murino de vacunación e infección por el virus influenza.

11. REFERENCIAS

1. WHO. Fact Sheet: Obesity and Overweight. World Health Organization. 2020.
2. Schmatz M, Madan J, Marino T, Davis J. Maternal obesity: The interplay between inflammation, mother and fetus. Vol. 30, Journal of Perinatology. 2010. 2010. DOI: 10.1038/jp.2009.182
3. González Jiménez E. Obesidad: Análisis etiopatogénico y fisiopatológico. Vol. 60, Endocrinología y Nutricion. 2013. DOI:10.1016/j.endonu.2012.03.006
4. Escobar Duque ID. Guía de práctica clínica (GPC) para la prevención, diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos. Univ Médica. 2017;58(2). DOI: <https://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-2.obes>
5. Shamah-Levy T, Romero-Martínez M, Barrientos-Gutiérrez T, Cuevas-Nasu L, Bautista-Arredondo S, Colchero M, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales. Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2021. 2022. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2021/doctos/informes/220804_Ensa21_digital_4ago.pdf
6. Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. Rev Chil Nutr. 2017;44(3). <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000300226>

7. Wiggins KB, Smith MA, Schultz-Cherry S. The nature of immune responses to influenza vaccination in high-risk populations. Vol. 13, *Viruses*. 2021. DOI: 10.3390/v13061109
8. León-Pedroza JI, González-Tapia LA, del Olmo-Gil E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G, González-Chávez A. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cir Cir*. 2015;83(6). <https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.041>
9. Zhen Y, Shu W, Hou X, Wang Y. Innate Immune System Orchestrates Metabolic Homeostasis and Dysfunction in Visceral Adipose Tissue During Obesity. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. 2021.
10. Acosta JR, Tavira B, Douagi I, Kulyté A, Arner P, Rydén M, et al. Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;104(10):4552–62. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.702835>
11. Andrade FB, Gualberto A, Rezende C, Percegoni N, Gameiro J, Hottz ED. The Weight of Obesity in Immunity from Influenza to COVID-19. Vol. 11, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.638852>
12. Redinger RN. The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. Vol. 3, *Gastroenterology and Hepatology*. 2007. PMID: [21960798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960798/)
13. Cervantes Ramírez DL, Haro Acosta ME, Ayala Figueroa RI, Haro Estrada I, Fausto Pérez JA. Prevalencia de obesidad y ganancia de peso en mujeres

embarazadas. Atención Fam. 2019;26(2).

<http://dx.doi.org/10.22201/facmed.14058871p.2019.2.68824>

14. Zonana-Nacach A, Baldenebro-Preciado R, Ruiz-Dorado MA. Efecto de la ganancia de peso gestacional en la madre y el neonato. *Salud Publica Mex.* 2010;52(3). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0036-36342010000300006&script=sci_abstract
15. Wilson RM, Messaoudi I. The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418. DOI: 10.1016/j.mce.2015.07.028
16. Reyes RB, Carrocera LAF. Programación metabólica fetal. *Perinatol y Reprod Humana.* 2015;29(3). <https://doi.org/10.1016/j.rprh.2015.12.003>
17. Zhu Z, Cao F, Li X. Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00764>
18. Christian LM, Porter K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. *Cytokine.* 2014;70(2). Doi: 10.1016/j.cyto.2014.06.018
19. Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2015;36(7). DOI: 10.1016/j.placenta.2015.04.006
20. Gaillard R. Maternal obesity during pregnancy and cardiovascular development and disease in the offspring. Vol. 30, *European Journal of Epidemiology.* 2015. DOI: 10.1007/s10654-015-0085-7

21. Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: Mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. Vol. 356, *BMJ* (Online). 2017. DOI: 10.1136/bmj.j1
22. Kelly AC, Powell TL, Jansson T. Placental function in maternal obesity. Vol. 134, *Clinical Science*. 2020. <https://doi.org/10.1042/CS20190266>
23. Arroyo-Jousse V, Jaramillo A, Castaño-Moreno E, Lépez M, Carrasco-Negüe K, Casanello P. Adipokines underlie the early origins of obesity and associated metabolic comorbidities in the offspring of women with pregestational obesity. Vol. 1866, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.165558
24. Barbour LA, Farabi SS, Friedman JE, Hirsch NM, Reece MS, Van Pelt RE, et al. Postprandial Triglycerides Predict Newborn Fat More Strongly than Glucose in Women with Obesity in Early Pregnancy. *Obesity*. 2018;26(8). <https://doi.org/10.1002/oby.22246>
25. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Michael Wallace A, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9). DOI: 10.1210/jc.2002-020311
26. Parrettini S, Caroli A, Torlone E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.611929>
27. Frias AE, Grove KL. Obesity: A transgenerational problem linked to nutrition

- during pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2012;30(6). DOI: 10.1055/s-0032-1328875
28. Starling AP, Brinton JT, Glueck DH, Shapiro AL, Harrod CS, Lynch AM, et al. Associations of maternal BMI and gestational weight gain with neonatal adiposity in the Healthy Start study. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(2). DOI: 10.3945/ajcn.114.094946
 29. Catalano PM, Presley L, Minium J, Mouzon SH De. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care.* 2009;32(6). Doi: 10.2337/dc08-2077
 30. Odaka Y, Nakano M, Tanaka T, Kaburagi T, Yoshino H, Sato-Mito N, et al. The influence of a high-fat dietary environment in the fetal period on postnatal metabolic and immune function. *Obesity.* 2010;18(9). DOI: 10.1038/oby.2009.513
 31. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(1 57-1). DOI: 10.1152/ajpregu.00354.2004
 32. Owen, J.A., Punt, J., Stranford SA. *Kuby Inmunología. 7a edición.* México: McGraw-Hill Interamericana; 2014.
 33. Castelo-Branco C, Soveral I. The immune system and aging: A review. Vol. 30, *Gynecological Endocrinology.* 2014. DOI:10.3109/09513590.2013.852531
 34. Di Pasquale A, Preiss S, Da Silva FT, Garçon N. *Vaccine adjuvants: From*

- 1920 to 2015 and beyond. Vol. 3, Vaccines. 2015.
<https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
35. Elsevier. Inmunidad contra los virus y sus mecanismos de evasión. ElsevierConnect. 2019; <https://www.elsevier.com/es-es/connect/inmunidad-contra-los-virus-y-sus-mecanismos-de-evasion>
36. Tsafaras GP, Ntontsi P, Xanthou G. Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. Vol. 8, Frontiers in Pediatrics. 2020.
<https://doi.org/10.3389/fped.2020.00005>
37. Moraes-Pinto MI de, Suano-Souza F, Aranda CS. Immune system: development and acquisition of immunological competence. Vol. 97, Jornal de Pediatria. 2021. DOI: 10.1016/j.jped.2020.10.006
38. Dhakal S, Klein SL. Host Factors Impact Vaccine Efficacy: Implications for Seasonal and Universal Influenza Vaccine Programs. J Virol. 2019;93(21). DOI: 10.1128/JVI.00797-19
39. Green WD, Beck MA. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. Ann Am Thorac Soc. 2017;14. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201706-447AW
40. Honce R, Schultz-Cherry S. Impact of obesity on influenza A virus pathogenesis, immune response, and evolution. Vol. 10, Frontiers in Immunology. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01071
41. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala VKR, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. Vol. 93, Journal of Medical Virology. 2021. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>

42. Nypaver C, Dehlinger C, Carter C. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. Vol. 66, Journal of Midwifery and Women's Health. 2021. DOI: 10.1111/jmwh.13203
43. WHO. WHO Fact Sheet Influenza (Seasonal). WHO. 2018. <https://www.preventionweb.net/understanding-disaster-risk/terminology/hips/bi0044>
44. Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3). DOI: 10.1128/CMR.00097-12
45. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. Vol. 4, Nature Reviews Disease Primers. 2018. DOI: 10.1038/s41572-018-0002-y
46. Trombetta CM, Kistner O, Montomoli E, Viviani S, Marchi S. Influenza Viruses and Vaccines: The Role of Vaccine Effectiveness Studies for Evaluation of the Benefits of Influenza Vaccines. Vaccines [Internet]. 2022 May 1;10(5):714. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/10/5/714>
47. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. Vol. 19, Nature Reviews Immunology. 2019. DOI: 10.1038/s41577-019-0143-6
48. Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GFA. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. Vol. 94, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.023
49. Sekiya T, Ohno M, Nomura N, Handabile C, Shingai M, Jackson DC, et al.

- Selecting and using the appropriate influenza vaccine for each individual. Vol. 13, *Viruses*. 2021. Doi: 10.3390/v13060971
50. Cox MMJ, Izikson R, Post P, Dunkle L. Safety, efficacy, and immunogenicity of Flublok in the prevention of seasonal influenza in adults. *Ther Adv Vaccines*. 2015;3(4). Doi: 10.1177/2051013615595595
 51. Rico-Fontalvo J-E, Daza-Arnedo R, Pájaro-Galvis N, Leal-Martínez V, Abuabara-Franco E, Saenz-López J, et al. Obesidad y Covid-19 Obesity and Covid-19. *iMedPub Journals*. 2020;16(4). Doi: 10.1016/j.abril.2020.05.003
 52. Rubio Herrera MA, Bretón Lesmes I. Obesidad en tiempos de COVID-19. Un desafío de salud global. *Endocrinol Diabetes y Nutr*. 2021;68(2). DOI: 10.1016/j.endinu.2020.10.001
 53. Bhattacharya I, Ghayor C, Pérez Dominguez A, Weber FE. From Influenza Virus to Novel Corona Virus (SARS-CoV-2)–The Contribution of Obesity. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.556962
 54. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VVW, Eriksson JG, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. Vol. 5, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2017. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30107-3
 55. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. Vol. 127, *Journal of Clinical Investigation*. 2017. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30107-3
 56. Kusuyama J, Alves-Wagner AB, Makarewicz NS, Goodyear LJ. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism. Vol. 2, *Nature*

Metabolism. 2020.

57. id Kershenobich D. Inflamación de bajo grado y obesidad: espectadores discretos o agentes causales del síndrome metabólico. *El Resid.* 2010;5(3).
<https://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2010/rr103d.pdf>
58. Neidich SD, Green WD, Rebeles J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Noah TL, et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. *Int J Obes.* 2017;41(9). Doi: 10.1038/ijo.2017.131
59. Milner JJ, Beck MA. 5th International Immunonutrition Workshop Micronutrients , immunology and inflammation The impact of obesity on the immune response to infection Proceedings of the Nutrition Society. *Proc Nutr Soc.* 2012;71.
60. Chen J, Wang J, Zhang J, Ly H. Advances in Development and Application of Influenza Vaccines. Vol. 12, *Frontiers in Immunology.* 2021.
61. Fabersani E, Marquez A, Russo M, Ross R, Torres S, Fontana C, et al. Lactic Acid Bacteria Strains Differently Modulate Gut Microbiota and Metabolic and Immunological Parameters in High-Fat Diet-Fed Mice. *Front Nutr.* 2021;8.
62. Alarcon PC, Damen MSMA, Ulanowicz CJ, Sawada K, Oates JR, Toth A, et al. Obesity amplifies influenza virus-driven disease severity in male and female mice. *Mucosal Immunol.* 2023;16(6).
63. Guo W, Wu D, Li L, Ding S, Meydani SN. Obesity, rather than high fat diet, exacerbates the outcome of influenza virus infection in influenza-sensitized mice. *Front Nutr.* 2022;9.

64. Lavie CJ, Coursin DB, Long MT. The Obesity Paradox in Infections and Implications for COVID-19. Vol. 96, Mayo Clinic Proceedings. 2021.
65. Green WD, Al-Shaer AE, Shi Q, Gowdy KM, MacIver NJ, Milner JJ, et al. Metabolic and functional impairment of CD8+ T cells from the lungs of influenza-infected obese mice. *J Leukoc Biol.* 2022;111(1).
66. Evsyukova II. The impact of maternal obesity and diabetes on fetal brain development (mechanisms and prevention). *J Obstet Women's Dis.* 2020;69(3).
67. Radford-Smith DE, Anthony DC. Mechanisms of Maternal Diet-Induced Obesity Affecting the Offspring Brain and Development of Affective Disorders. Vol. 13, *Metabolites.* 2023.
68. Padilla-Quirarte HO, Badillo-Godinez O, Gutierrez-Xicotencatl L, Acevedo-Betancur Y, Luna-Andon JD, Montiel-Hernandez JL, et al. Targeting M2e to DEC-205 induces an enhanced serum antibody-dependent heterosubtypic protection against influenza A virus infection. *Vaccine.* 2019;37(19).
69. Grzęda E, Matuszewska J, Ziarniak K, Gertig-Kolasa A, Krzyśko- Pieczka I, Skowrońska B, et al. Animal Foetal Models of Obesity and Diabetes – From Laboratory to Clinical Settings. Vol. 13, *Frontiers in Endocrinology.* 2022.
70. Chamorro-García R, Poupin N, Tremblay-Franco M, Canlet C, Egusquiza R, Gautier R, et al. Transgenerational metabolomic fingerprints in mice ancestrally exposed to the obesogen TBT. *Environ Int.* 2021;157.
71. Guo W, Wu D, Li L, Smith DE, Meydani SN. Impact of Maternal Obesity and High Fat Diet during Pregnancy and Lactation on Offspring Body Weight,

Immune Function, and Resistance to Influenza Infection. *FASEB J.* 2017;31(S1).

72. Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA. Diet-Induced Obesity Impairs the T Cell Memory Response to Influenza Virus Infection. *J Immunol.* 2010;184(6).
73. Abd Alhadi M, Friedman LM, Karlsson EA, Cohen-Lavi L, Burkovitz A, Schultz-Cherry S, et al. Obesity Is Associated with an Impaired Baseline Repertoire of Anti-Influenza Virus Antibodies. *Microbiol Spectr.* 2023;11(3).
74. Park HL, Shim SH, Lee EY, Cho W, Park S, Jeon HJ, et al. Obesity-induced chronic inflammation is associated with the reduced efficacy of influenza vaccine. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(5).

ANEXO I: PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS



V Meeting of DOHAD Latin American Regional Society
XXXIV Annual Meeting of the Chilean Society of
Reproduction and Development



THE ORGANIZING COMMITTEE OF THE MEETING CERTIFICATES THE ORAL/POSTER PRESENTATION

Mayra Castillo Ortega, Tomas Villaseñor Toledo, Fernando R.
Esquivel Guadarrama, Gustavo Pedraza Alva, Delia Vanessa López
Guerrero.

“Evaluation of the immune response to the trivalent influenza
vaccine in offspring of obese mice.”



Dra. Dolores Busso, SChRD



Dr. Bernardo Krause, LA-DOHAD

Valdivia, Chile, September, 2023



UC | Chile

CERTIFICATE

Mayra Castillo Ortega

has attended the Pre-congress symposium

**Molecular Basis of the Perinatal Programming of
Cardiometabolic Diseases**
to LA-DOHaD 2023 congress

September 4-5, 2023
Santiago, Chile

Organizing Committee

M L6pez, K Araujo, P Casanello, L Sobrev6a



Vicerrector6a de
Investigaci6n
Programa de
Doctorado en
Ciencias M6dicas



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Nutrición

Otorga la presente

CONSTANCIA

A

Mayra Castillo Ortega

Por su destacada y activa participación al asistir a las actividades del

“SEGUNDO SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN”

Llevado a cabo el 25 y 26 de mayo del 2023.

Atentamente

Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

MTRO. DAMIAN ARIZMENDI ECHEGARAY

SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE NUTRICIÓN

Por una humanidad culta

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Nutrición

Otorga la presente



CONSTANCIA

A LA

LN. MAYRA CASTILLO ORTEGA

[Error on Page ...](#)

Por: su participación como ponente en el cuarto seminario de investigación 2023 con el tema: "DOHad: Orígenes de la salud en el desarrollo y la enfermedad".

Horas: 1 hora

Sede: Facultad de Nutrición

Cuernavaca, Morelos, a 22 de marzo 2023

Mtra. Jésica López Bucio Fabián

Encargada de Despacho de la Dirección

... la humanidad culta

Una universidad de excelencia



RECTORÍA
2017-2023



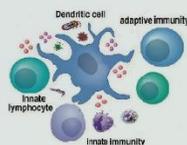
La Universidad Autónoma de Aguascalientes
a través del Centro de Ciencias Básicas

Otorga la presente:

CONSTANCIA

A: MAYRA CASTILLO ORTEGA

Por haber **asistido** al:



II SIMPOSIO INTERNACIONAL
Inmunidad Innata en Salud
y Enfermedades Infecciosas

Realizado de manera virtual
(canal YouTube de la Sociedad Mexicana de Inmunología)
Del 10 al 14 de octubre de 2022, con una duración de 32 horas.

Aguascalientes, Ags., México, 15 de octubre de 2022.

Mtro. en C. Jorge Martín Alferez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Dr. Daniel Scott-Algara
COORDINADOR DE RELACIONES DEL
INSTITUTO PASTEUR CON AMÉRICA LATINA

SE LUMEN PROFERRE





MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. **Mayra Castillo Ortega**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10053477**, bajo la dirección de la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, en codirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 20 días del mes de mayo de 2024.

C.i.p. - Archivo.JLBF/DAE/SYLM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA | Fecha:2024-05-20 14:15:24 | FIRMANTE

kjCmT0yKlpab30vt/sqtrNjE3VQDrpYuFE4D6NYB95kl88ZUQo1mMLxIWnFt7jPgRXuBONhIxoKlrmBvcedHVlBm4x0a0qsYhCU1opsPBX8DOme8gUv0cJ9GSDbcZLECBnuEgNaCFj1NI3uyloeEAH59PXPk5cx1LjoPLWZGvqzNolpsHXMCcu+FpHLJ2W6T8GZqDIkUM2Khhp/Zn9wqTzJW5LBYL2TAJmPZ5Cu+pvpgP/BaXDr7nlkHwYdiFYQnE9B1leV9YtWNrzUVOpZWZw5JkZ3NLV5cqUrvUSAyu5X6YDONldj3rAf75HsaxeJ48+EYj0QZFsYruCYwijwplCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QKfbkScXG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NZIDNPu489XDv0Ce0MdlvCRdxmCsDvax>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. **Mayra Castillo Ortega**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10053477**, bajo la dirección de la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, en codirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. América Ivette Barrera Molina
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 09 días del mes de mayo de 2024.

C.i.p. - Archivo. JLBF/DAE/SYLM





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AMERICA IVETTE BARRERA MOLINA | Fecha:2024-05-09 06:34:03 | FIRMANTE

YBnaZYfgRBrzoNPQHm337SRAQKqhlGlc1RL6VGh+oPFUMiPNd5l9lXghowNmquTilwZ5RAH4QjeAkqro3A9FMLID671PpAiM19qihOjOp8yoVPYTFfomNxNrnjlysgl+QjoBQsx8t610ZGW+qADDFUXkxKILPecIIndnUE4vhmRUg72wP+MXPXOSb5o2nwSDLmKli6J2nMAhTACSv4CAoCA2kioC8D3oImiJO7RvEtN3TGrDkcG4fcYRQGFVRoF18Od7bEMWMuJdmnAt18LhLtVt7R8P2iwxq1uuT7+pFJdrLzNnhSmLZU8nWOOELnrzMm2BGSCXv0OIJThS19UPGw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pLNY8kdR6](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0z26JHuc5iB4SF1L8yl7JU0ZczkeFJkk>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. **Mayra Castillo Ortega**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10053477**, bajo la dirección de la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, en codirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 14 días del mes de mayo de 2024.

C.i.p. - Archivo. JLBF/DAE/SYLM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2024-05-15 14:37:13 | FIRMANTE

F2jZnCOcWduebNqQFZrkJHwbIP/KULrETaEuoKMiOeotCak8bhC3a/17yq9yLyJMzX4h+ASYjUKcPLAkMnZCtvS4rLpb4iAs9QSZL1hTz3B0HJwpzL+4kMWbUYPJFTKY0RE2BW
QUTVOTBAyupyjgg0NNK8KSv6FC7vF38m6hVMXCoWTVdZ0jnQsaX58haqG/xhKXg+xDJFJeNhXAtgcvfGN05GsNT2uw52pO6yoFZVq05t9EDI+2DO6nu+K62r+OhC8Ajd8wHg
d/81QhAJzaVX4yGi1Gueb599GkSP09vLC/3pLVHnuoTXAPB/KER/tTOTc0aSkGOTPCZmwy3BRtXw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[th7zZsdvq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/d8NPg8MlnsnUoX7NGmePS7oY6jcbmQgy>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la C. **Mayra Castillo Ortega**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10053477**, bajo la dirección de la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, en codirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

A t e n t a m e n t e

Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 03 días del Mes de Mayo del 2024.

C.i.p. - Archivo. JLBf/DAE/SYLM





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2024-05-03 19:20:52 | FIRMANTE

A9C6RPd+BBxhibtbrEG2ZVYFG3KU772aRF3waygJIeAM7eJzssYIkOfKWiiUVJOeeDpPFObOfieBXJ7Lw9rJjxY6Cck5PaRUJq9fimAIGzoMW5/ckDgtgPldZjvLPi7om0hkkPwElWdYHH2xnW0GftC5UtW/ZnL4HMCkBYOgscWpLFLenlfNP82tc5/DzyDEheDFkzjSsF/wKpEpKvcTJgp/TY14N2uxXg3dFrtl+mC+Ur70dtHuPZ4J5D9Cs/Almt3OXPHLJNsLk9wMC1Obf9LhijQRrgTGcoqvmjH1gFrEHNWdP4eSUmQ8gUvirnC5kWmDepyEHGhV773pJcQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



KM1IHUdsk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AkF44RAPP7iWIMf38111KIB0tQWRfRRY>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.

Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por el (la) C. **Mayra Castillo Ortega**, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula **10053477**, bajo la dirección de la Dra. Delia Vanessa López Guerrero, en codirección del Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva y que lleva por título **“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA HACIA UNA VACUNA TRIVALENTE CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA EN RATONES DESCENDIENTES DE PADRES CON OBESIDAD”**

ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dra. María Alejandra Terrazas Meráz
Sinodal

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 03 días del mes de mayo de 2024.

C.i.p. - Archivo. JLBf/DAE/SYLM





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ALEJANDRA TERRAZAS MERAZ | Fecha:2024-05-03 06:33:10 | FIRMANTE

A49Zhn1Ur8DgZJgX4PEOfd6E17v1+KpVOBk0fq+mVGyL9IOTET6xmNt36kVTPC8fGiV8WjuzbkQnH4lxZu+S4al6D4jYpJJBUL0fZ2tcWdCPcn7xTGtrJf9LsvF0i2PDXcmEXA4BRwK9xXwDctXLE51HRz1QvG/hMezul/ffTHUsOay2+r3sQH5NWpBfH+g7AXwZRsoYeiTQomTutLy5OS5XJO7pKgQgZb1rst9Z6nrKY4BEfOzoBHHFy+c197mtJrC5QCcXqY9xq2dPp4OYDZQ6PGc0xZz/Cns+GSJfXUQj83jxGeQCRdtrJGZ134ZeCfWw3glfzDRcT68QqmU4A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[LZlvjzOG1](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EdRiWu1Zelyi2GdGzYMFV0PfrHTKvBOM>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029