



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EL EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE EL ESTRÉS DEL RETICULO
ENDOPLÁSMICO EN LA LIPOGÉNESIS RENAL DE RATONES C57BL/6

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ELIZABETH IRINA FIGUEROA JUÁREZ



MÉXICO, D.F. EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2015



JURADO ASIGNADO:

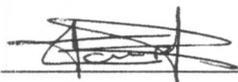
PRESIDENTE: M. en C. Lucía Cornejo Barrera
VOCAL: Dr. Samuel Canizales Quinteros
SECRETARIO: Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
1er. SUPLENTE: Dr. José Ignacio Páramo Ramírez
2° SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN;
SALVADOR ZUBIRÁN**

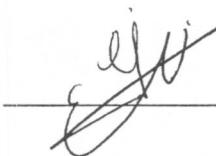
ASESOR DEL TEMA:

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio



SUSTENTANTE:

Elizabeth Irina Figueroa Juárez



Unfolded protein response on renal lipogenesis in C57BL/6 mice (1029.2)

Claudia Tovar-Palacio², Ivan Torre-Villalvazo¹, Gabriela Alemán¹, Elizabeth Figueroa-Juárez², Nimbe Torres¹, Armando Tovar¹ and Ricardo Correa-Rotter²

Author Affiliations

¹Fisiología de la Nutrición Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, S.Z Mexico, D.F Mexico

²Nefrología y Metabolismo Mineral Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, S.Z México, D.F Mexico

Abstract

It has been postulated that endoplasmic reticulum stress, which is associated with protein misfolding, may generate renal lipid accumulation. Thus the aim of this study was to demonstrate that endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin (T) administration up-regulate the expression of lipogenic enzymes in mice kidney. Male C57BL/6 mice were injected with tunicamycin and studied at several time points: 1) control, 2) T8 (8h), 3) T24 (24h). Serum glucose levels showed a significant decrease in the T24 group of mice compared to the control group or T8 group. Serum triglycerides, in T8 and T24 groups significantly decreased compared to control. Gene expression of proteins involved in the unfolded protein response (UPR) such as ATF6, CHOP and GRP78 in T8 and T24 groups were significantly higher than the control group. Assessment of the PERK pathway as part of the UPR, showed that eIF2 α -total significantly decreased compared to the control and this effect was more evident after 24 hours of exposure to T with respect of T8 group. Finally, the state of phosphorylation of eIF-2 α protein, was significantly higher in the T8 and T24 than the control group. Changes in UPR were associated with an increase in the group T8 of renal mRNA and protein abundance of SREBP-1, ACC and FAS involved in fatty acid synthesis compared with the control and the T24 group.

omega-3 FFA, tamoxifen and omega-3FAA plus tamoxifen on cell apoptosis and growth. Tamoxifen resistance-related signals were assessed by immunoblotting.

Results: In this study, omega-3FFA induces MCF-7 cell apoptosis to suppress cell growth. However, the treatment of breast cancer cells with omega-3FFA attenuated tamoxifen-induced cell apoptosis. Omega-3FFA and tamoxifen significantly increased Erk1/2 and Akt phosphorylation levels in a dose- and time-dependent manner. Compared to ω -3FFA alone, the combination of tamoxifen with ω -3FFA significantly increased Erk1/2 and Akt phosphorylation levels.

Conclusions: Because Erk1/2 and Akt activation has been linked to tamoxifen-related anti-estrogen resistance in breast cancer patients, these results indicate that omega-3FFA may interfere with the effects of tamoxifen in the prevention of breast cancer risk.

T-P-3531

Pomegranate extract, ellagic acid, or urolithin acid extended lifespan in *Ceanorhabditis elegans* model organism

Jolene Zheng *Baton Rouge LA*, Mingming Wang *Baton Rouge Louisiana State University*, Chenfei Gao *Metairie Louisiana*, David Heber *Los Angeles California*, Steven Heymsfield *Baton Rouge Louisiana*, Roy Martin Davis *CA*, Michael Keenan *Baton Rouge Louisiana*, John Finley *Lakewood Ranch Florida*, Frank Greenway *Baton Rouge Louisiana*, Frederick Enright *Baton Rouge Louisiana*, Zhaoping Li *Los Angeles CA*

Background: We found that pomegranate juice (PJ) affected lifespan in an inverse J-shaped manner in *C. elegans* model organism. PJ extract (POMxm) is rich in phenolic acid that provides antioxidant property and healthy benefits. Its main component, ellagic acid (EA), the hydrolysate of polyphenols, is further converted to urolithin acid (UA) by the microflora in the colon. We compared the effects of POMxm, EA, or UA on lifespan and intestinal fat deposition (IFD) using wild type *C. elegans* (N2) and mutant *daf-16(mgDf50)I* in liquid culture.

Methods: All animals were kept in 96-well plate at 20°C. Control animals received lab standard food *E. coli* (OP50). Experimental groups were fed with additional POMxm (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μ g/ml), or EA or UA (1, 2, 5, 10, 25, 50 μ M) diluted in dimethyl sulfoxide (0.05%). Lifespan was determined every other day by counting numbers of survival animals. Nile Red staining was applied one week after treatment (0.5mg/ml acetone in glycerol-water 75:25) and the fluorescence intensity of the IFD was determined.

Results: POMxm increased lifespan in N2 ($P < 0.05$) but not in the *daf-16* mutant ($P > 0.05$). EA extended lifespan in both strains ($P < 0.05$). Higher doses of UA (50 μ M) increased the lifespan in N2 ($P < 0.05$). Fluorescent intensity of IFD was reduced by POMxm in *daf-16(mgDf50)I* mutant. The fluorescent intensity was increased in EA treated animals, while it was reduced in *daf-16(mgDf50)I* ($P < 0.05$).

Conclusions: These data suggested that in *C. elegans* POMxm increases lifespan is *daf-16* dependent, which was abolished in the *daf-16* mutant. EA is more potent than UA on lifespan extension, which may involve other pathway(s).

T-P-3532

Resveratrol Attenuates Obesity-Related Renal and Systemic Alterations During Acute and Chronic Endoplasmic Reticulum Stress

Elizabeth Figueroa-Juárez *Mexico City Distrito Federal*, Claudia Tovar-Palacio *Tovar-Palacio Mexico, City D.F.*, Margarita Teran-Garcia *Urbana Illinois*

Background: Renal lipid accumulation has been associated with chronic renal failure in obese patients. Molecular mechanisms seem to implicate lipotoxicity and induction of endoplasmic reticulum (ER) stress. Resveratrol (R) is a natural bioactive compound that elicits benefits over some obesity-related metabolic disorders

Methods: The objective was to evaluate the effect of R supplementation on a high fat (HF) diet over a chronic and acute induction of ER stress. Male C57BL/6 mice were fed for 28 weeks with four different dietary treatments: Control (C), C+R (CR), HF, and HF+R (HFR). At the end of the study, half of the animals on each group were treated with tunicamycin (T) to induce acute ER stress. Weight gain, glucose tolerance test (GTT), indirect calorimetry and serum biomarkers were analyzed.

Results: Compared to HF mice, weight gain was decreased in the HFR group along with a significant increase in O₂ consumption and CO₂ production during fasting and fed state. Mice in the HF and HFR groups had sustained increase in GTT compared to C and CR. Total- and LDL-cholesterol were lower in HFR group compared to HF group. Mice in the non-T treated groups (CR and HFR) did not show a decrease in glucose, total- and LDL-cholesterol compared to those in the CR+T and HFR+T groups. In contrast, T-treated groups (C+T and HF+T) had lower glucose, total- and LDL-cholesterol compared to C and HF treated animals. No differences were observed in other biomarkers (albumin, creatinine, AST, ALT and triglycerides) in CR+T and HFR+T groups despite the acute ER stress induction.

Conclusions: In conclusion, resveratrol supplementation showed beneficial effects over body weight gain, metabolic oxidation rate and biochemical parameters with and without pharmacological induction of ER stress.

T-P-3533

Short-Term High Fat Diet Impairs Postprandial Metabolic Flexibility in Skeletal Muscle.

Suzanne Bowser *Christiansburg Virginia*, Ryan McMillan *Blacksburg Virginia*, Nabil Boutagy *Blacksburg Virginia*, Michael Tarpey *Blacksburgs Virginia*, Kristin Osterberg *Blacksburg VA*, Madlyn Frisard *Blacksburg VA*, Andrew Neilson *Blacksburg VA*, Brenda Davy *Blacksburg Virginia*, Kevin Davy *Blacksburg Virginia*, Matthew Hulver *Blacksburg VA*

Background: Obesity, diabetes and the metabolic syndrome are associated with metabolic inflexibility, the inability of skeletal muscle to adapt and respond to various nutrient states. The purpose of this study was to determine the effects of an acute, 5-day, isocaloric high fat diet (HFD) on skeletal muscle postprandial substrate metabolism in healthy, non-obese, male humans.

Methods: Eleven subjects (age 22.1 ± 1.7 yrs, BMI 22.3 ± 2.8) were fed an isocaloric control diet (2788 ± 53.03 kcal/d, 30.9% fat, 9.4% of kcal sat fat) for 2 weeks, followed by 5 days of an isocaloric to habitual energy intake HFD (53.8% fat, 24.5% of kcal sat fat). Subjects underwent a high fat meal challenge (kcal \sim 30% daily energy intake, 64% fat) before and after the HFD. Muscle biopsies were obtained prior to and 4 hours following the meal. Skeletal muscle substrate metabolism was assessed by measuring the oxidation of [U-14C]-glucose and [1-14C]-palmitic acid. Metabolic flexibility was assessed by measuring [1-14C]-pyruvate oxidation +/- palmitate. Insulin sensitivity was assessed prior to and following HFD via I.V. glucose tolerance test. Intestinal permeability was assessed via sugar probe test.

The FASEB Journalwww.fasebj.org

April 2016

The FASEB Journal vol. 30 no. 1 Supplement 692.24

**RESVERATROL ATTENUATES OBESITY
RELATED RENAL AND SYSTEMIC
ALTERATIONS DURING ACUTE AND
CHRONIC ENDOPLASMIC RETICULUM
STRESS****Claudia Tovar-Palacio¹, Margarita Terán-García²,
Elizabeth Figueroa-Juarez¹, Ivan Torre-Villalvazo³, Lilia G Noriega³,
Armando R Tovar³ and Ricardo Correa-Rotter¹** Author Affiliations**Abstract**

Renal lipid accumulation has been associated with chronic renal failure in obese patients. Molecular mechanisms seem to implicate lipotoxicity and induction of endoplasmic reticulum (ER) stress. Resveratrol (R) is a natural bioactive compound that elicits benefits over some obesity-related metabolic disorders. The objective of this study was to evaluate the effect of R supplementation on a high fat (HF) diet over a chronic and acute induction of ER stress in C57BL/6 mice. Male mice were fed for 28 weeks with four different dietary treatments: Control (C), C+R (CR), HF, and HF+R (HFR). At the end of the study, half of the animals on each group were treated with tunicamycin (T) to induce acute ER stress. Weight gain, glucose tolerance test (GTT), indirect calorimetry and serum biomarkers were analyzed. Weight gain of the HFR group was lower than HF accompanied with a significant increase in O₂ consumption and CO₂ production during fasting and fed state. Mice in the HF and HFR groups had lower glucose tolerance compared to C and CR. Total- and LDL-cholesterol were lower in HFR group compared to HF group. Mice treated with T had lower glucose, total- and LDL-cholesterol compared to C and HF groups. No differences were observed in other biomarkers (albumin, creatinine, AST, ALT and triglycerides) in CR+T and HFR+T groups despite the acute ER stress induction. In conclusion, resveratrol supplementation showed beneficial effects on body weight gain, energy expenditure and biochemical variables with and without pharmacological induction of ER stress.

Footnotes

This abstract is from the Experimental Biology 2016 Meeting. There is no full text article associated with this abstract published in The FASEB Journal.

We recommend

Nutraceutical Values of Muscadine against Obesity and Metabolic Complications in-vivo

vishnupriya gourineni et al., FASEB J, 2012

Endurance training ameliorates insulin resistance via suppressing of muscle endoplasmic reticulum stress (884.8)

Yoshihiro Kadota et al., FASEB J, 2014

HF-feeding-induced endoplasmic reticulum stress links metabolic syndrome (1107.11)

Yassine Sakar et al., FASEB J, 2014

Seaweed Supplementation Attenuates Long-term High Fat Diet-induced Chronic Inflammation and Insulin Resistance Regardless of Obesity in C57BL/6N Mice

Yunkyoung Lee et al., FASEB J, 2016

Plant-Derived Bioactive Lipids Impact Glucose Homeostasis and Energy Metabolism in Mice

Thomas Jetton et al., FASEB J, 2015

Diabetes and Liver Metabolism

Diabetes In Control, 2013

Resveratrol Induces Alteration in Gut Microbiome

Diabetes In Control, 2017

ER stress and development of type 1 diabetes

Feyza Engin, J Investig Med, 2016

Red Wine Molecule Extends Lifespan Of Fat Mice Lives By Reversing Obesity-Related Gene Pathways

Harvard Medical School, ScienceDaily, 2006

Obesity: Reviving The Promise Of Leptin

Children's Hospital Boston, ScienceDaily, 2009

Powered by

Al comparar los valores de concentración de albúmina sérica de los grupos de animales administrados con tunicamicina respecto a los grupos de animales que no fueron tratados con ella, se puede observar que los grupos (C+T) y (AG+T), mostraron una tendencia hacia valores menores de concentración de albumina respecto a los grupos (C) y (AG); mientras que los grupos (CR+T) y (AGR+T) no mostraron una tendencia hacia valores menores de concentración de albumina respecto a los grupos (CR) y (AGR).

Como se mencionó en la introducción y en el apartado anterior, en un estudio dirigido por nuestro grupo de trabajo (Tovar-Palacio et al., 2014), se demostró que la inducción del estrés del RE por tunicamicina promueve el desarrollo de lipogénesis renal y con ello estimula el daño renal. Éste daño renal inducido por la tunicamicina provoca la hipoalbuminemia en suero en todos los grupos (C+T) y (AG+T); sin embargo, los grupos (CR+T) y (AGR+T) presentaron un comportamiento similar al de los grupos no tratados con tunicamicina, y no muestran ésta tendencia hacia la disminución de los valores de albumina, a pesar de que en ninguno de los grupos se presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Por lo que la suplementación con resveratrol en ratones alimentados con una dieta control, así como con una dieta alta en grasa, sugiere un efecto renoprotector sobre la concentración de albúmina en suero; sin embargo no mostró un efecto estadísticamente significativo.

8.0 CONCLUSIONES

- El resveratrol suplementado a una dosis de 200 mg/kg pc/d redujo significativamente el incremento de peso corporal en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa respecto a los grupos no suplementados con resveratrol.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d d en ratones C57BL/6 no indujo ningún efecto en la prueba de tolerancia a la glucosa

intraperitoneal, tanto en los animales alimentados con una dieta control como con una dieta alta en grasa, respecto a los animales no suplementados con resveratrol.

- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d en ratones C57BL/6 no indujo cambios ni en el valor del coeficiente respiratorio (RER) ni en la proporción de sustratos oxidados respecto a los grupos no suplementados con resveratrol, tanto en los animales alimentados con una dieta control como con una dieta alta en grasa, respecto a los animales no suplementados con resveratrol; sin embargo, incrementó de forma estadísticamente significativa el volumen de oxígeno consumido en ambas dietas suplementadas con resveratrol respecto a los no suplementados con resveratrol.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentó una tendencia a reducir la concentración de glucosa en suero en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa, sin embargo no presentó diferencia estadísticamente significativa; así mismo, mantuvo la concentración de glucosa dentro del rango normal ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico y no presentó diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d redujo la concentración de colesterol total y LDL en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa de forma estadísticamente significativa respecto al grupo no suplementado con resveratrol; así mismo, mantuvo la concentración de colesterol total y LDL dentro del rango normal ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico en las dietas suplementadas con resveratrol, tanto control como alta en grasa, sin presentar diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin Tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d no presentó diferencia estadísticamente significativa en la concentración de colesterol HDL en ratones C57BL/6 suplementados alimentados con una dieta control

y una dieta alta en grasa; y mantuvo la concentración de colesterol HDL en valores normales ante la inducción del estrés de retículo endoplásmico, sin presentar diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina en ambas dietas suplementadas.

- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d no redujo la concentración de triglicéridos de forma estadísticamente significativa en ratones C57BL/6 suplementados alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa; así mismo, mantuvo la concentración de triglicéridos en el rango normal en ambas dietas suplementadas a diferencia de las no suplementadas ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico, y ambos grupos presentaron un incremento estadísticamente significativo respecto a los grupos suplementados con resveratrol sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d presentó una tendencia a mejorar el perfil hepático (composición corporal de hígado, transaminasas ALT y AST) y no presentó hepatotoxicidad en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa, a pesar de no mostrar diferencia estadísticamente significativa; y mantuvo los valores de dichos parámetros en valores dentro del rango normal (AST) o cercanos al rango normal (ALT) ante la inducción farmacológica del estrés del retículo endoplásmico sin presentar diferencia estadísticamente significativa respecto a los grupos sin tunicamicina.
- El resveratrol suplementado en una dosis de 200 mg/kg pc/d mostró una tendencia a disminuir la concentración de creatinina en suero y aumentar la concentración de albúmina en suero hasta el rango normal de valores en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa aunque no presentó diferencia estadísticamente significativa; y mantuvo la concentración de dichos parámetros en valores normales ante la inducción farmacológica de estrés de retículo endoplásmico en ambas dietas suplementadas con resveratrol aunque ningún grupo presentó diferencia estadísticamente significativa.

9.0 PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis morfohistológico para poder evaluar las estructuras generales de las células del riñón, identificar componentes celulares que contienen hidratos de carbono, fibras de colágeno, su estado de inflamación y acumulación de grasas neutras con la finalidad de evaluar el efecto del resveratrol y de la inducción al estrés del RE a nivel histológico en tejido renal.
- Determinar el efecto del resveratrol sobre la expresión relativa en tejido renal del RNAm de los genes implicados en la vía de SIRT1/AMPK y las proteínas implicadas en la respuesta a proteínas no plegadas activada por la inducción farmacológica del estrés del RE.
- Determinar el efecto del resveratrol sobre la expresión relativa en tejido renal de las proteínas implicadas en la vía de SIRT1/AMPK y las proteínas implicadas en la respuesta a proteínas no plegadas activada por la inducción farmacológica del estrés de retículo endoplásmico.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 25 de Abril del 2017

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Anexo a la presente le hago llegar el informe técnico final del proyecto de investigación a mi cargo titulado: **“Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico”**, con **No. de Registro CINVA 921** y **Clave: NMM-921-13/15-1**. Adjunto también encontrará los comprobantes que lo avalan.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
Investigadora en Ciencias Médicas C
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

Informe técnico final del proyecto de investigación

“Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico”

No. de Registro CINVA 921

Clave: NMM-921-13/15-1

A. Formación de recursos humanos:

Se graduó un alumno a nivel y licenciatura y está en proceso un alumna a nivel maestría

1. Tesis dirigida a nivel licenciatura (concluida):

“El efecto del resveratrol sobre el estrés del retículo endoplásmico en la lipogénesis renal en ratones C57BL/6”

Alumno: Elizabeth Irina Figueroa Juárez

Año de graduación : 2015

Institución : Facultad de Química, UNAM.

2. Tesis dirigida a nivel maestría (en proceso):

“Evaluación de la utilización de resveratrol como modulador de la lipogénesis renal y la respuesta al estrés del retículo endoplásmico en ratones C57BL/6”.

Alumno: Elizabeth Irina Figueroa Juárez

Año de graduación : 2017 (en proceso)

Institución : Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado en Ciencias Biológicas, Biomedicina.

B. Presentación de los avances del proyecto en Congresos Nacionales e Internacionales.

1. Claudia Tovar-Palacio, Ivan Torre-Villalvazo, Gabriela Aleman, Elizabeth Figueroa-Juárez, Nimbe Torres, Armando R Tovar, Ricardo Correa-Rotter. (2014) Unfolded protein response on renal lipogenesis in C57BL/6 mice. FASEB J 2014 vol. 28 no. 1 Supplement 1029.2.
2. Elizabeth Figueroa-Juárez, Claudia Tovar-Palacio Tovar-Palacio, Margarita Teran-Garcia. (2015). Resveratrol Attenuates Obesity-Related Renal and Systemic Alterations During Acute and Chronic Endoplasmic Reticulum Stress. Obesity, 2015 The 33rd Annual Scientific Meeting of the Obesity Society. Abs. T-P-3532.
3. Claudia Tovar-Palacio, Margarita Terán-García, Elizabeth Figueroa-Juarez,

Ivan Torre-Villalvazo, Lilia G Noriega, Armando R Tovar, Ricardo Correa-Rotter.(2016) Resveratrol attenuates obesity related renal and sytemic alterations during acute and chronic endoplasmic reticulum. FASEB J 2016 vol. 30 no. 1 Supplement 692.24.

4. Elizabeth Figueroa-Juárez, Leon Islas Weinstein², Rogelio Hernández-Pando, Armando R Tovar, Claudia Tovar-Palacio (2016). Renal endoplasmic reticulum stress and its modulation by Resveratrol. Keystone symposia on molecular and celular biology. Cellular Stress Responses and Infectious Agents (S4) Abs.(1022).
5. Elizabeth Figueroa-Juárez, León Islas Weinstein, Rogelio Hernández-Pando, Lilia G. Noriega, Victoria Ramírez, Armando R Tovar, Ricardo Correa-Rotter, Claudia Tovar-Palacio. (2017) Beneficial effects and modulation on renal acute and chronic endoplasmic reticulum stress by Resveratrol. WCN17-1316.

A. Publicaciones:

La publicación correspondiente a este proyecto se encuentra en proceso de ser enviada para su publicación a una revista de arbitraje internacional. El título del manuscrito es: "The role of the Unfolded Protein Response on renal lipogenesis in C57BL/6 mice". En el momento que se tenga la aceptación de esta publicación se le hará llegar con la finalidad de completar el expediente.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 25 de Abril del 2017

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: **"Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico"**, con **No. de Registro CINVA 921** y **Clave: NMM-921-13/15-1**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
Investigadora en Ciencias Médicas C
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

México, D.F. a 10 de Febrero de 2016

Dra. Claudia Tovar Palacios
Depto. Nefrología y Metabolismo Mineral
Presente

Estimada Dra. Tovar:

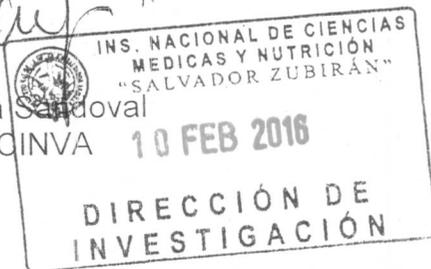
Por este conducto le informo que su proyecto: **"EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOGÉNESIS RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO."**, con registro **CINVA: NMM-921-13/15-1** finalizó en agosto de 2015. En mayo del 2015 usted solicitó una prórroga que no fue autorizada debido a que no se justificó adecuadamente el uso de más animales. Hasta la fecha no tuvimos respuesta de su parte, por lo que, le solicito de la manera más atenta realice el cierre de su protocolo mediante el formato que se anexa a la presente. De no recibir respuesta de su parte en el plazo de 30 días, el protocolo se dará por cerrado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Mylene Ortega
el
Cerrado
10 - marzo
2016

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Claudia Tovar
11 - Feb - 16

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN

10 FEB 2016

INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

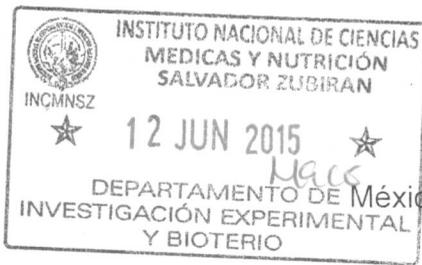
414

Accsc



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DEPARTAMENTO DE México, D. F., a 12 de Junio del 2015. INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio

Depto. Biología de la Reproducción

Presente.

REF: CINVA-921 NMN-921-13-15-1

Estimado Dra. Tovar.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal inflamación y estrés en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico"

Este comité ha dictaminado **no aprobar la prórroga hasta justificar para qué utilizarán los 100 animales, ya que en el protocolo original solo se solicitaron solo 50 ratones.**

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

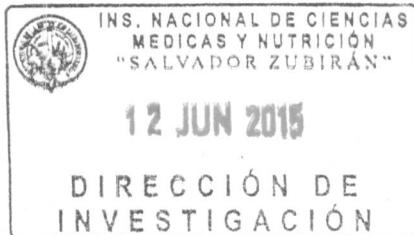
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

venida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

21 de mayo de 2015

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
Presente.

Con referencial al proyecto de investigación **“Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico”** solicito una prorroga para extender la vigencia de éste proyecto. Cuyo número de registro es CINVA: 921 y la Clave: NMM-921-13/15-1.

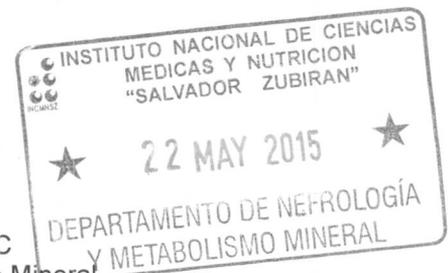
La extensión de la vigencia se solicita por los siguientes motivos:

1. No fue posible iniciar el proyecto en el momento de su aprobación ya que el bioterio en aquel momento no contaba con la cantidad de animales solicitados, para lo cual fue necesario esperar un año para obtenerlos.
2. Por otro lado, la investigación ya se inició de acuerdo a lo establecido en el protocolo sometido, sin embargo, aun quedan varias mediciones por completar para poder concluir el proyecto. Una de las grandes limitantes es que el estudio evalúa las modificaciones metabólicas en tejido renal, el cual es de tamaño muy reducido en este modelo animal. Por esta razón no fue posible realizar todos los análisis correspondientes tales como: histologías, cuantificación de lípidos neutros en el tejido, así como la determinación del estado de fosforilación de algunas proteínas involucradas en las rutas metabólicas a estudiar.
3. Finalmente, es de gran importancia la determinación y evaluación de varios parámetros bioquímicos en orina, la cual tampoco fue suficiente durante la recolección del estudio previo.

Por estas circunstancias, se solicita la extensión de la vigencia para poder avanzar en el proyecto con resultados más completos y con un mayor entendimiento del análisis bioquímico y metabólico que se desea estudiar por lo cual se solicita: 100 animales más en dos exhibiciones con una diferencia de 8 meses entre cada exhibición. Adicionalmente de 15 animales que servirán para el montaje de diversas técnicas.

Atentamente,

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
Investigadora en Ciencias Médicas C
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación.
M.V.Z Mariela Contreras Escamilla, Jefa de Investigación



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Agosto 12,2013

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
Investigadora en Ciencias Médicas
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
P r e s e n t e .

Con referencia al proyecto de investigación: **“Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico”**.

Registro CINVA: **921**

Clave: **NMM-921-13/15-1**

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA) revisó el proyecto, y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

Dr. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ. Griselda Salmerón Estrada.- Secretaria CINVA
Dra. Nimbe Torres y Torres.- CINVA
MVZ.M.C. Ma. de la Luz Streber J.- CINVA
Dr. Gonzalo M. Torres Villalobos.- CINVA
Dr. Emiliano Tesoro Cruz.- CINVA
MVZ.M.en C. Octavio Villanueva S.- Invest.Exp.y Bioterio

Cristina Cruz R.

13/08/13

01/09/2015



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Agosto 12, 2013

Dra. Claudia Teresa Tovar Palacio
Investigadora en Ciencias Médicas
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
P r e s e n t e .

Con referencia al proyecto de investigación: **"Efecto del resveratrol en la lipogénesis renal, inflamación y estrés oxidante en el establecimiento de la obesidad y el síndrome metabólico"**.

Registro CINVA: **921**

Clave: **NMM-921-13/15-1**

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA) revisó el proyecto, y se decidió **APROBARLO** para su desarrollo.

Atentamente

Dr. Rafael Hernández González

Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ. Griselda Salmerón Estrada.- Secretaria CINVA
Dra. Nimbe Torres y Torres.- CINVA
MVZ.M.C. Ma. de la Luz Streber J.- CINVA
Dr. Gonzalo M. Torres Villalobos.- CINVA
Dr. Emiliano Tesoro Cruz.- CINVA
MVZ.M.en C. Octavio Villanueva S.- Invest.Exp.y Bioterio

Cristina Cruz R.

13/08/13



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

Folio del registro: NMM-921-13/15-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto:

"EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOGÉNESIS RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO"

Tipo de proyecto:

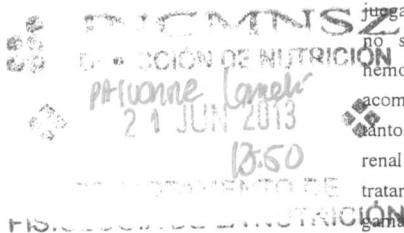
Investigación Experimental

Antecedentes:

Entre las consecuencias metabólicas más importantes de la obesidad, se encuentran las alteraciones del metabolismo de lípidos. Estas alteraciones dan como resultado hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hiperglicemia y enfermedades cardiovasculares (Listenberger et al., 2003). En forma específica se ha sugerido la hiperlipidemia que puede cursar con el deterioro renal mediado por anomalías del metabolismo de lípidos (Praga, 2002). En varios estudios, tanto en seres humanos como en animales experimentales con diabetes, se ha demostrado una correlación entre los lípidos del suero, lípidos renales y proteinuria y una progresión en el deterioro de la función renal (Spencer et al., 2004; Bonnet et al., 2000; Gin et al., 2000; Sun et al., 2002).

La insuficiencia renal crónica es un proceso fisiopatológico de múltiples etiologías, resultando en una inexorable disminución del número y función de las nefronas (Schrier, 2004). La enfermedad crónica renal evoluciona hacia la falla renal para lo cual es necesario el tratamiento dialítico o trasplante para el mantenimiento de la vida (K/DOQ1, 2002; He et al., 1999; Foley et al., 1998; Munter et al., 2002; Gerstein et al., 2001).

El incremento en la prevalencia de individuos con síndrome metabólico se ha asociado fuertemente como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad crónica renal así como de la enfermedad renal terminal (Hsu, 2006; Iseki, 2004). Recientemente se ha demostrado el papel que juegan los lípidos intrarrenales en la enfermedad renal inducida por obesidad (Jiang et al., 2005). Por lo tanto, la acumulación de lípidos parece tener un papel muy importante en la patogénesis renal, produciendo en sus primeras etapas cambios estructurales y funcionales en el riñón. Inicialmente se asumió que la formación de depósitos de lípidos en los riñones obedecía a los niveles elevados de estos en suero. Recientemente se ha encontrado que la síntesis endógena de lípidos juega un papel fundamental en el desarrollo de estos depósitos en el riñón. El mecanismo por el cual la obesidad causa daño renal no se ha esclarecido completamente y es muy probable que involucre toda una combinación de anomalías tanto hemodinámicas como metabólicas (Tesauro et al., 2011). La progresión de la enfermedad renal crónica se encuentra usualmente acompañada por inflamación, hipertrofia, estrés oxidante y anomalías del metabolismo de lípidos y de la glucosa. Por lo tanto, se deberán analizar las alternativas que puedan revertir dichos procesos para la prevención o tratamiento de la enfermedad renal crónica y la enfermedad renal terminal. Los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas. El resveratrol es un antioxidante natural con una amplia gama de reportes sobre sus beneficios metabólicos. El resveratrol es una fitoalexina polifenólica que se encuentra en forma natural en muchas especies de plantas, incluyendo vides de uva y bayas. Presenta una amplia gama de beneficios para la salud desde el punto de vista farmacológico como antioxidante, antimutagénico, anti-inflamatorio, estrogénico, anticancerígeno y



cardioprotector. Aun más, se ha pensado que el resveratrol es el responsable de que el consumo moderado de vino tinto se asocie con una disminución de la mortalidad secundaria a la enfermedad coronaria (Kopp et al., 1998). En estudios recientes se ha reforzado esta teoría lo cual ha conducido a postular que el resveratrol tiene un papel crucial en la protección cardiovascular otorgada por las uvas y el vino (Bertelli y Das, 2009). Los estudios más recientes conducidos en animales han abierto una perspectiva prometedora del potencial uso del resveratrol en la prevención y el tratamiento de desórdenes metabólicos serios como la obesidad.

El resveratrol es un compuesto natural que afecta el metabolismo energético y la función mitocondrial y sirve como un mimetizador de la restricción calórica, por lo menos en modelos animales de obesidad. Se ha demostrado que el resveratrol activa la cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), incrementa los niveles de las proteínas sirtuina 1 (SIRT 1) y coactivador del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) gamma 1 alfa (PGC-1a), incrementa la actividad de la citrato sintasa mitocondrial sin cambios en el contenido de la proteína y mejora la respiración mitocondrial en músculo. La actividad de la cinasa que activa a la AMPK, LKB1, es crítica para la regulación de la gluconeogénesis y consecuentemente de la homeostasis de la glucosa. En el músculo esquelético y el corazón, la actividad de la AMPK lleva a la fosforilación e inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Esta inhibición resulta en la disminución de los niveles de malonil-CoA que es en sí mismo, un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Con la disminución del inhibidor de la CPT I ocurre un incremento concomitante de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria. Un incremento en la oxidación de los ácidos grasos, así como de la glucólisis, llevará a un aumento de la producción de ATP. Adicionalmente, se ha demostrado que la AMPK fosforila y así regula las actividades de varias proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos como: la hidroximetil glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, lipasa sensible a hormonas (HSL), glicerol fosfato aciltransferasa, malonil-CoA descarboxilasa (MCD), sintasa de glucógeno y creatina cinasa (CK). Con lo cual se observa que la actividad de la AMPK afecta no sólo la homeostasis de la glucosa sino también la homeostasis de los ácidos grasos e incluso la homeostasis energética incluyendo el metabolismo del glucógeno y el metabolismo de colesterol y de la fosfocreatina. Adicionalmente la activación de la AMPK conduce a la disminución del nivel de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides-1 (SREBP-1), un factor de transcripción que es un regulador clave en la expresión de varias enzimas lipogénicas. Existe evidencia de que el resveratrol protege contra el estrés oxidante y la inflamación por medio del aumento de la expresión génica y actividad de AMPK en ratones diabéticos (Chang et al., 2011; Palsamy et al., 2011). Sin embargo, en el riñón no existe información suficiente sobre el impacto del resveratrol que permita evaluar su efecto sobre la disminución de la lipotoxicidad renal. Por otro lado, se ha demostrado que el resveratrol es un potente inductor de SIRT1 (Borra et al., 2005; Ajmo et al., 2008). En células de mamíferos, el resveratrol promueve la expresión celular de la proteína SIRT1 y estimula en forma dramática su actividad (Cohen et al., 2004). Sin embargo, aún no está claro el mecanismo molecular por medio del cual el resveratrol induce la actividad de SIRT1 *in vivo*. Se han demostrado que el resveratrol modula el metabolismo de lípidos principalmente por medio de la señalización de SIRT1 (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Picard et al., 2004; Rodgers et al., 2007).

En estudios recientes se ha explorado el posible efecto protector del resveratrol en el tejido renal durante el proceso de la obesidad. Sin embargo, no se ha descrito el impacto del resveratrol sobre la lipogénesis renal y sobre la inflamación y el estrés oxidante derivados de la misma. Consecuentemente, la SIRT1 y la AMPK representan objetivos atractivos en el desarrollo de terapias para prevenir la enfermedad renal inducida por la obesidad. Por lo tanto el presente estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto benéfico del resveratrol sobre la disminución de lípidos renales, inicio del proceso inflamatorio, estrés oxidante y disfunción renal en la obesidad.

Definición del problema:

El incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en México presenta una serie de nuevos retos tales como la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en el sector salud. La enfermedad crónica renal está relacionada directamente con la hipertensión, la diabetes y las dislipidemias, enfermedades que han alcanzado proporciones epidémicas en nuestro país. Para prevenir o retrasar estas complicaciones, es necesario que la gente se proteja mediante estilos de vida más saludables, que incluya ejercicio, evitar el consumo de sal y azúcar en exceso y que el consumo de grasas sea adecuado. Las modificaciones a las dietas, en el manejo de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se han enfocado tradicionalmente a evitar las grasas saturadas y el colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir basando dichas dietas únicamente en la reducción de grasas saturadas y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del metabolismo como un todo en el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En este sentido, existe evidencia que los antioxidantes como el resveratrol juegan un papel relevante en el mantenimiento niveles adecuados de glucosa, lípidos y parámetros adecuados de la tensión arterial. Por lo tanto, los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas.

Justificación:

El presente proyecto pretende demostrar que, en un modelo de obesidad y síndrome metabólico, la suplementación con resveratrol promueve una disminución de la lipogénesis a nivel renal y sistémico y que a su vez esta mejoría se reflejará en una disminución del proceso inflamatorio y de estrés oxidante a nivel renal lo cual podrá prevenir o disminuir el daño renal. Este

proyecto generará nuevo conocimiento acerca del papel que juega el resveratrol sobre la lipogénesis renal como herramienta para el mejoramiento del daño renal. Específicamente, el proyecto brindará información sobre la regulación del metabolismo energético del riñón con especial énfasis en el metabolismo de lípidos. Cabe mencionar que es un proyecto original con un enfoque integral que permitirá entender los cambios metabólicos que ocurren de manera global en el tejido renal sobre el mecanismo por el cual el resveratrol puede detener o mejorar el daño renal a nivel de metabolismo de lípidos. Los datos obtenidos permitirán que se publique un artículo original en una revista internacional arbitrada de alto impacto, así como la graduación de dos estudiantes de Licenciatura.

Hipótesis:

En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, el consumo de resveratrol reducirá en el riñón parámetros relacionados con el contenido de lípidos en tejido renal y disminuirá la síntesis endógena de lípidos y en forma concomitante reducirá el estrés oxidante, la inflamación y de manera concomitante el daño renal. La disminución de lípidos a nivel sistémico y renal será una consecuencia del aumento de las proteínas AMPK y SIRT1 que promueven la oxidación de lípidos. Adicionalmente, el resveratrol disminuirá el estrés oxidante y los marcadores de inflamación.

Fecha estimada de inicio: 17/06/2013

Fecha estimada de término: 19/06/2015

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?: Si

Investigadores participantes**(0) Comentarios**

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Tovar Palacio, Claudia Teresa	Investigador responsable	1	Sí

Población vulnerable**(0) Comentarios**

Población vulnerable vinculado al protocolo Ninguna de las anteriores

Otra población:: No aplica

Objetivos

(0) Comentarios

Objetivo: Determinar el efecto de una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol, sobre el metabolismo de lípidos (lipogénesis y oxidación de ácidos grasos), inflamación y estrés oxidante en el tejido renal de ratones.

Tipo de objetivo: General

- Objetivo:**
1. Determinar la ganancia de peso y consumo de alimento de los ratones antes y después del tratamiento dietario en los 6 grupos para observar el efecto del resveratrol utilizando diferentes concentraciones (400 mg/kg y 600 mg/kg).
 2. Analizar los parámetros bioquímicos en el modelo de obesidad inducida con las diferentes concentraciones de resveratrol (glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres).
 3. Analizar los parámetros hormonales en el modelo de obesidad inducida con las diferentes concentraciones de resveratrol (leptina, adiponectina, insulina y glucagon).
 4. Determinar la función renal en los ratones antes del tratamiento y posterior al tratamiento con una dieta donde se ha inducido la obesidad y se ha suplementado con diferentes concentraciones de resveratrol (urea y creatinina).
 5. Estudiar las características histológicas y morfológicas del tejido renal provenientes de ratones obesos alimentados con concentraciones de resveratrol (Tinción de rojo oleoso, hematoxilina-eosina).
 6. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de resveratrol en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y genes involucrados en el metabolismo de lípidos a nivel renal en las siguientes vías:
 1. **Lipogénesis en tejido renal:** SREBP-1c, ACC y sintasa de ácidos grasos (FAS).
 2. **Oxidación de ácidos grasos en tejido renal:** PPARa, CPT-1, acil CoA oxidasa (AOX), acil CoA^s deshidrogenasa (ACAD).
 3. **Lipólisis:** HSL, PPARg.
 4. **Balance energético:** AMPK, SIRT-1, LKB1, PGC1a.
 7. Analizar la abundancia y nivel de fosforilación de algunas proteínas involucradas en las siguientes rutas metabólicas:
 - a. **Lipogénesis en tejido renal:** SREBP-1c nuclear y total, ACC y p-ACC, FAS y p-FAS.
 - b. **Oxidación de ácidos grasos en tejido renal:** PPARa
 - c. **Lipólisis:** PPARg
 - d. **Balance energético:** AMPK, p-AMPK, SIRT-1, LKB1.
 8. Analizar el estado inflamatorio del tejido renal y a nivel sistémico en un modelo animal de obesidad el cual ha sido suplementado con resveratrol evaluando la expresión (ARNm) y los niveles de interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), y factor nuclear kappa B (NFkB).
 9. Evaluar el estrés oxidante en tejido renal en los animales obesos tratados con diferentes concentraciones de resveratrol midiendo la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en tejido renal y la excreción urinaria de H₂O₂. También se evaluará la expresión genica del factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), de su represor la proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH (Keap-1) y de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn y superóxido dismutasa dependiente de Mn). La transcripción de estas últimas enzimas depende de la activación del factor Nrf2.

Tipo de objetivo: Específico (s)

Metodología: Diseño general

(0) Comentarios

Metodología
gral: METODOLOGÍA CIENTÍFICA:

ANIMALES Y ALIMENTACIÓN:

Diseño del estudio:

Se utilizarán 48 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad provenientes de la compañía Charles River Laboratories, USA, que se mantendrán en microaisladores con un ciclo luz/oscuridad de 12 hrs., con consumo de alimento en polvo *ad libitum* en comederos de acero, con dieta estándar recomendada por AIN-93 (Reeves et al., 1993). Los animales se aclimatarán a la dieta durante tres días, y los tratamientos dietarios se administrarán durante un período de 12 semanas. Los animales tendrán acceso *ad libitum* a agua potable en bebederos de 250 mL. Durante el período de entrenamiento y las 12 semanas del estudio. La temperatura a la cual se mantendrán los ratones será de 20-22°C, con una humedad relativa del 40-60%. El alimento se mantendrá almacenado a 4°C. Cada vez que sea necesario se trasladará la cantidad suficiente de alimento por medio de su transporte en bolsas nuevas y dobles de plástico.

Descripción de la maniobra o intervención: Durante las 12 semanas del tratamiento dietario, se registrará el peso corporal y el consumo de los animales cada tercer día. Un día antes al sacrificio los animales se colocarán en cajas metabólicas con la finalidad de recolectar la orina de 24 h. Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción cardiaca previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre con tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, leptina, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres). Posteriormente, a los animales se les realizará necropsia para obtener los riñones para realizar las histologías, la extracción de RNA, de proteína total y de lípidos neutros renales. El tejido renal se almacenará a -80°C hasta su procesamiento. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

Tamaño de la muestra: El experimento se va a realizar con 5 grupos experimentales más un grupo control. Cada grupo estará constituido por 8 ratones, dando un total de 48 ratones. Será necesario contar con aproximadamente 5 animales más con la finalidad de estandarizar algunas técnicas. El cálculo del número de muestra (n) se realizó según la siguiente ecuación para muestras independientes: $n=2[(Z_{\alpha/2} - Z_p)^2 / \{(m_1-m_2) / d\}^2]$. Donde $\alpha= 0.05$, $Z_{\alpha/2}= 1.645$, $p= 0.95$ y $Z= -1.645$. Se utilizaron los datos del nivel mínimo y máximo de nitrógeno en sangre de un estudio previo (Champy et al., 2008). Tendremos un nivel de significancia de 5% y una frecuencia del 95% resultando en una n de 8 ratones por grupo.

Mecanismo de asignación del tratamiento: Cada grupo de 8 ratones se solicitará en una sola exhibición a la compañía Charles River, USA. con la finalidad de iniciar todos los tratamientos dietarios con los mismos tiempos.

Alimentación:

Las dietas (Tabla 1) están compuestas por: caseína libre de vitaminas (Harlan-teklan) al 19.87%, metionina al 0.14%, aceite de maíz al 5.16%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harland-Tekland) 1.89%, colina al 0.19%, mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Tekland) al 4.73%, celulosa al 2.84%, sacarosa al 32% o cuanto falte para alcanzar el 100% de la dieta, almidón 32.59% y resveratrol con las siguientes concentraciones: 0, 400, 600 mg/Kg de masa corporal para la dieta control con sus respectivas concentraciones de resveratrol.

Las dietas altas en grasa estarán compuestas por: caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad) al 24.14%, metionina al 0.17%, aceite de maíz al 5.75%, manteca al 17.72%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harland-Teklad) 2.99%, colina al 0,23%, mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Teklad) al 5.75%, celulosa al 1.72%, inulina al 1.72%, dextrina al 29.46% o cuanto falte para completar el 100% de la dieta, sacarosa al 10.35%. La concentración de resveratrol será de: 0, 400, 600 mg/Kg de peso corporal. Se establecieron estas dos diferentes concentraciones de resveratrol, considerando que en estudios previos (Kim et al., 2011; Lagouge et al., 2006) se demostraron efectos benéficos del resveratrol, a concentración de 400 mg/Kg de masa corporal, en ratones C57BL/6J los cuales son de la misma cepa que se utilizará en este diseño experimental. Adicionalmente se desea analizar el efecto que tiene este antioxidante si elevamos la concentración en un 50% ya que también está descrito en la literatura que no existe ningún efecto secundario a esta concentración.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta)

Porcentaje (%)	Control	Control + 400 mg/Kg resveratrol	Control + 600 mg/Kg resveratrol	Dieta alta en grasa	Dieta alta en grasa + 400 mg/Kg resveratrol	Dieta alta en grasa + 600 mg/Kg resveratrol

Caseína	19,87	19,87	19,87	24,14	24,14	24,14
Metionina	0,14	0,14	0,14	0,17	0,17	0,17
Aceite de maíz	5,16	5,16	5,16	5,75	5,75	5,75
Manteca	—	—	—	17,72	17,72	17,72
Vitaminas	1,89	1,89	1,89	2,99	2,99	2,99
Colina	0,19	0,19	0,19	0,23	0,23	0,23
Minerales	4,73	4,73	4,73	5,75	5,75	5,75
Celulosa	2,84	2,84	2,84	1,72	1,72	1,72
Inulina	—	—	—	1,72	1,72	1,72
Dextrina	—	—	—	29,46	29,44	29,44
Sacarosa	32,59	32,57	32,57	10,35	10,35	10,35
Almidón	32,59	32,59	32,59	0	0	0
Resveratrol	0	0,0124	0,0186	0	0,0124	0,0186
Total	100	100	100	100	100	100

Las dietas se administrarán de manera oral, *ad libitum*, colocando el alimento sobre la reja para que sea ingerido por los animales en cantidad suficiente para cada ratón.

Con estas dietas se cubren los requerimientos de proteínas y de grasas de los ratones en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, ya que el porcentaje de proteína que contienen es aproximadamente del 20% (los valores presentados ya están ajustados de acuerdo a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína), mientras que el requerimiento de grasa es del 5%. El resveratrol será incorporado y mezclado en las dietas experimentales.

MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y TEJIDOS: Al término de los 84 días experimentales, los animales se desangrarán por punción cardíaca previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre en tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos, hormonales y de función renal. Posteriormente, se obtendrá el tejido renal para realizar los estudios histológicos y morfométricos, la extracción de ARN total, proteína total y lípidos neutros renales. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

DETERMINACION DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: Las concentraciones de triglicéridos, colesterol y glucosa en suero se determinarán con estuches de reactivos de diagnóstico *in vitro* (DiaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). Los ácidos grasos libres en suero se determinarán con el kit NEFA C (Wako Chemicals).

ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES EN EL SUERO DE LOS ANIMALES. La glucosa se determinará por el método de la glucosa oxidasa usando el autoanalizador YSI 2700. La concentración de triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos libre y glicerol en suero se determinará usando ensayos enzimáticos-iméricos (diaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). Las concentraciones de insulina, glucagon, adiponectina y leptina en suero se determinará por medio de ELISA (Alpco Diagnosis ó Enzo Life Sciences).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO: Las muestras de tejido renal fijadas se deshidratarán en dos baños de etanol al 96%, dos baños de etanol al 100%, un baño de etanol-xilol, dos baños de xilenos y tres baños de parafina. Posteriormente se incluirán en cassetes con parafina. Se realizarán cortes de 4-6 micras y se teñirán con hematoxilina-eosina para identificar las estructuras generales de la célula, con ácido peryódico de Schiff para identificar componentes celulares que contienen hidratos de carbono y con tricrómico de Masson para visualizar claramente las fibras de colágeno. Adicionalmente se llevará a cabo una tinción con rojo oleoso que tiene como finalidad la de identificar depósitos de grasas neutras. Con la ayuda de la tinción de hematoxilina-eosina se calculará el tamaño de los glomérulos en los diferentes tratamientos dietarios. Se analizarán 10 campos por muestra para evaluar estadísticamente los cambios estructurales presentes.

EXTRACCIÓN DE ARN DEL RIÑÓN: El ARN total del riñón se obtendrá con el método descrito por Sambrook et al. (1987), el cual consiste en una digestión con TRIZOL, seguida de una extracción con cloroformo y una precipitación con isopropanol. Para evaluar la integridad del ARN, se separarán 5

mg de ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.2 M. El ARN se cuantificará por medio de espectrofotometría a 260 nm.

ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR TIEMPO REAL EN TEJIDO RENAL:

A partir de 3 mg de RNA se llevará a cabo la síntesis de ADNc a través de la reacción de la transcriptasa reversa M-MLV con oligo-d(T). Las reacción de PCR en tiempo real se llevará a cabo por triplicado con 150-300 ng de ADNc (dependiendo del rango dinámico para cada gen), en un equipo ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos siguiendo las instrucciones del fabricant (AB, User Bulletin no. 2) utilizando la mezcla "Taqman Universal PCR Master Mix" y los oligos/sondas Taqman para de ensayos de expresión para los siguientes genes (Tabla 2):

Tabla 2. Lista de genes a determinar por PCR en tiempo real

Lipogénesis	Oxidación de ácidos grasos	Balance energético	Inflamación	Defensa antioxidante
SREBP-1	PPAR α	AMPK	IL-6	Nrf2
ACC	PPAR γ	SIRT1	TNF α	Keap-1
FAS	CPT-1	LKB1	NF κ B	SOD (Mn)
	AOX	PGC1 α		SOD (Cu/Zn)
	HSL			GPx
	ACAD			GR

EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE METABOLISMO DE LÍPIDOS, ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN EN TEJIDO RENAL: El ARN obtenido de tejido renal se someterá a la acción de la transcriptasa reversa para obtener el ADNc. Este ADNc se someterá a un análisis por PCR de tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a amplificar (termociclador de tiempo real, 7000 sequence detection system, Applied Biosystems). Los genes a ser analizados se describen en la Tabla 2. Se utilizará a ciclofilina como gen constitutivo.

CALORIMETRÍA INDIRECTA: Los animales se alojarán de forma individual y se aclimatarán a las jaulas del calorímetro durante 24 horas antes de la recolección de intercambio de gases y los datos de consumo de alimentos. El consumo de oxígeno ($O_2 \cdot V$) y la descarga de dióxido de carbono ($CO_2 \cdot V$) se controlarán cada 3 minutos durante 24 horas. (Coleman, EUA). Se calcularán el cociente respiratorio ($V \cdot CO_2 / V \cdot O_2$), la tasa de consumo de energía ($3,816 \times V \cdot O_2 + 1,231 \times V \cdot CO_2$), la tasa de oxidación de grasas ($grasa / W, 1,67 \times (V \cdot O_2 - V \cdot CO_2) / PC$) y la tasa de oxidación de carbohidratos ($CHO / W, 4,51 \times 3,18 \times CO_2 - V \cdot O_2 / peso\ corporal$). Cuatro ratones de cada grupo se utilizarán en cada ensayo y el experimento se realizará por duplicado.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL: La función renal se evaluará mediante la determinación de la creatinina sérica, el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el aclaramiento de la creatinina. La creatinina en suero y en orina y el BUN se medirá con un autoanalizador. Las proteínas totales, tanto séricas como en orina, se determinarán de acuerdo a la técnica de Lowry et al. (1951).

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTO DE PROTEÍNA TOTAL: La proteína se extraerá con amortiguador de lisis Ripa (N-P40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y azida de sodio 1 nM disuelto en PBS) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasa durante 45 min a 4°C. El homogenizado se centrifugará a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. La porción de sobrenadante se recuperará y la concentración de proteína total se cuantificará por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-rad), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia.

ENSAYOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN A NIVEL RENAL POR MEDIO DE WESTERN BLOT: Para detectar la concentración, el estado de fosforilación y acetilación de las proteínas, el extracto de proteínas totales (20-60 mg) de las muestras de riñón se calentará a 85°C en solución amortiguadora de muestra para corrimiento (Bio-Rad) con 2-beta mercaptoetanol al 5%. Posteriormente las proteínas se separarán en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (8 al 12% según el tamaño de la proteína) y se transferirán a una membrana de PVDF. Se bloquearán con leche al 5% baja en grasa de y Tween 20 al 0.1%. Los inmunoblots se incubarán a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios de interés (SREBP-1, ACC, ACC fosforilado, FAS, FAS fosforilado, PPAR α , PPAR γ , AMPK, AMPK fosforilado, LKB1, SIRT 1), seguido de los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados con fluorescencia, para que posteriormente las bandas de expresión de cada proteína puedan ser detectadas y cuantificadas en un equipo de imagenología "BioSpectrum 500" (UVP). Los valores relativos obtenidos de las bandas de las proteínas de interés se dividirán entre los valores de la proteína con expresión constitutiva (actina).

CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS EN RIÑÓN: Se obtendrán los lípidos totales en riñón por el método de Okuno (1998). Se homogenizará el tejido congelado durante un minuto en NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.1% y Tris 10 mM precalentado a 45°C. Se tomará una alícuota del homogenizado para la cuantificación de triglicéridos usando un ensayo enzimático-imétrico (DiaSys Diagnostic Systems). Se extraerá el ADN del resto del homogenado para normalizar el contenido de triglicéridos por célula. Esta extracción se realizará por medio de una incubación con SDS al 0.1%, proteinasa K 100 mg/mL y EDTA 10 mM, seguida de extracciones de fenol:cloroformo:isoamillico y precipitación con acetato de sodio (Okuno, 1998). Finalmente las muestras de ADN se resuspenden en amortiguador TE, pH 8 con ribonucleasa A para su cuantificación y pureza a 260 y 280 nm, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Los resultados se expresarán como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, ingestión de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales, se evaluarán por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La diferencia significativa entre los grupos control y problemas se determinará mediante la prueba de Fisher usando el programa (programa de análisis estadístico JMP 6.0.3. de SAS).

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: No aplica

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio:

El incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en México presenta una serie de nuevos retos tales como la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en el sector salud. La enfermedad crónica renal está relacionada directamente con la hipertensión, la diabetes y las dislipidemias, enfermedades que han alcanzado proporciones epidémicas en nuestro país. Para prevenir o retrasar estas complicaciones, es necesario que la gente se proteja mediante estilos de vida más saludables, que incluya ejercicio, evitar el consumo de sal y azúcar en exceso y que el consumo de grasas sea adecuado. Las modificaciones a las dietas, en el manejo de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se han enfocado tradicionalmente a evitar las grasa saturada y el colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir basando dichas dietas únicamente en la reducción de grasa saturada y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del metabolismo como un todo en el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En este sentido, existe evidencia que los antioxidantes como el resveratrol juegan un papel relevante en el mantenimiento niveles adecuados de glucosa, lípidos y parámetros adecuados de la tensión arterial. Por lo tanto, los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas.

Tipo de beneficio:

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: No aplica

Manejo de confidencialidad**(0) Comentarios**

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto**(0) Comentarios**

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: No aplica

Riesgo (s) del estudio**(0) Comentarios**

Molestias generadas por el estudio: no aplica

Complicaciones del procedimiento: no aplica

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: no aplica

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: no aplica

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: no aplica

Otro tipo de riesgo: no aplica

Consentimiento informado**(0) Comentarios**

Hoja de informe al paciente: No aplica.doc

Carta de consentimiento informado: No aplica.doc

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de
investigadores::

[Declaración investigador.PDF](#)

© 2009 Portal INNSZ Instituto
Nacional de Ciencias Medicas y
Nutricion Salvador Zubiran Vasco
de Quiroga 15, Colonia Seccion
XVI, Tlalpan C.P. 14000, Mexico
D.F., MEXICO Telefono: (52 55)
5487 0900

© 2009 LATIS. All rights
Reserved.
LATIS development, The power of
the information



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

Folio del registro: NMM-921-13/15-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2743

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto:

“EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOGÉNESIS RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO”

Tipo de proyecto:

Investigación Experimental

Antecedentes:

Entre las consecuencias metabólicas más importantes de la obesidad, se encuentran las alteraciones del metabolismo de lípidos. Estas alteraciones dan como resultado hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hiperglicemia y enfermedades cardiovasculares (Listenberger et al., 2003). En forma específica se ha sugerido la hiperlipidemia que puede cursar con el deterioro renal mediado por anomalías del metabolismo de lípidos (Praga, 2002). En varios estudios, tanto en seres humanos como en animales experimentales con diabetes, se ha demostrado una correlación entre los lípidos del suero, lípidos renales y proteinuria y una progresión en el deterioro de la función renal (Spencer et al., 2004; Bonnet et al., 2000; Gin et al., 2000; Sun et al., 2002). La insuficiencia renal crónica es un proceso fisiopatológico de múltiples etiologías, resultando en una inexorable disminución del número y función de las nefronas (Schrier, 2004). La enfermedad crónica renal evoluciona hacia la falla renal para lo cual es necesario el tratamiento dialítico o trasplante para el mantenimiento de la vida (K/DOQI, 2002; He et al., 1999; Foley et al., 1998; Munter et al., 2002; Gerstein et al., 2001).

El incremento en la prevalencia de individuos con síndrome metabólico se ha asociado fuertemente como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad crónica renal así como de la enfermedad renal terminal (Hsu, 2006; Iseki, 2004). Recientemente se ha demostrado el papel que juegan los lípidos intrarrenales en la enfermedad renal inducida por obesidad (Jiang et al., 2005). Por lo tanto, la acumulación de lípidos parece tener un papel muy importante en la patogénesis renal, produciendo en sus primeras etapas cambios estructurales y funcionales en el riñón. Inicialmente se asumió que la formación de depósitos de lípidos en los riñones obedecía a los niveles elevados de estos en suero. Recientemente se ha encontrado que la síntesis endógena de lípidos juega un papel fundamental en el desarrollo de estos depósitos en el riñón. El mecanismo por el cual la obesidad causa daño renal no se ha esclarecido completamente y es muy probable que involucre toda una combinación de anomalías tanto hemodinámicas como metabólicas (Tesauro et al., 2011). La progresión de la enfermedad renal crónica se encuentra usualmente acompañada por inflamación, hipertrofia, estrés oxidante y anomalías del metabolismo de lípidos y de la glucosa. Por lo tanto, se deberán analizar las alternativas que puedan revertir dichos procesos para la prevención o tratamiento de la enfermedad renal crónica y la enfermedad renal terminal. Los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas. El resveratrol es un antioxidante natural con una amplia gama de reportes sobre sus beneficios metabólicos. El resveratrol es una fitoalexina polifenólica que se encuentra en forma natural en muchas especies de plantas, incluyendo vides de uva y bayas. Presenta una amplia gama de beneficios para la salud desde el punto de vista farmacológico como antioxidante, antimutagénico, anti-inflamatorio, estrogénico, anticancerígeno y

cardioprotector. Aun más, se ha pensado que el resveratrol es el responsable de que el consumo moderado de vino tinto se asocie con una disminución de la mortalidad secundaria a la enfermedad coronaria (Kopp et al., 1998). En estudios recientes se ha reforzado esta teoría lo cual ha conducido a postular que el resveratrol tiene un papel crucial en la protección cardiovascular otorgada por las uvas y el vino (Bertelli y Das, 2009). Los estudios mas recientes conducidos en animales han abierto una perspectiva prometedora del potencial uso del resveratrol en la prevención y el tratamiento de desórdenes metabólicos serios como la obesidad.

El resveratrol es un compuesto natural que afecta el metabolismo energético y la función mitocondrial y sirve como un mimetizador de la restricción calórica, por lo menos en modelos animales de obesidad. Se ha demostrado que el resveratrol activa la cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), incrementa los niveles de las proteínas sirtuina 1 (SIRT 1) y coactivador del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) gamma 1 alfa (PGC-1a), incrementa la actividad de la citrato sintasa mitocondrial sin cambios en el contenido de la proteína y mejora la respiración mitocondrial en músculo. La actividad de la cinasa que activa a la AMPK, LKB1, es crítica para la regulación de la gluconeogénesis y consecuentemente de la homeostasis de la glucosa. En el músculo esquelético y el corazón, la actividad de la AMPK lleva a la fosforilación e inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Esta inhibición resulta en la disminución de los niveles de malonil-CoA que es en sí mismo, un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Con la disminución del inhibidor de la CPT I ocurre un incremento concomitante de la b-oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria. Un incremento en la oxidación de los ácidos grasos, así como de la glucólisis, llevará a un aumento de la producción de ATP. Adicionalmente, se ha demostrado que la AMPK fosforila y así regula las actividades de varias proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos como: la hidroximetil glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, lipasa sensible a hormonas (HSL), glicerol fosfato aciltransferasa, malonil-CoA descarboxilasa (MCD), sintasa de glucógeno y creatina cinasa (CK). Con lo cual se observa que la actividad de la AMPK afecta no sólo la homeostasis de la glucosa sino también la homeostasis de los ácidos grasos e incluso la homeostasis energética incluyendo el metabolismo del glucógeno y el metabolismo de colesterol y de la fosfocreatina. Adicionalmente la activación de la AMPK conduce a la disminución del nivel de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides-1 (SREBP-1), un factor de transcripción que es un regulador clave en la expresión de varias enzimas lipogénicas. Existe evidencia de que el resveratrol protege contra el estrés oxidante y la inflamación por medio del aumento de la expresión génica y actividad de AMPK en ratones diabéticos (Chang et al., 2011; Palsamy et al., 2011). Sin embargo, en el riñón no existe información suficiente sobre el impacto del resveratrol que permita evaluar su efecto sobre la disminución de la lipotoxicidad renal. Por otro lado, se ha demostrado que el resveratrol es un potente inductor de SIRT1 (Borra et al., 2005; Ajmo et al., 2008). En células de mamíferos, el resveratrol promueve la expresión celular de la proteína SIRT1 y estimula en forma dramática su actividad (Cohen et al., 2004). Sin embargo, aún no está claro el mecanismo molecular por medio del cual el resveratrol induce la actividad de SIRT1 *in vivo*. Se han demostrado que el resveratrol modula el metabolismo de lípidos principalmente por medio de la señalización de SIRT1 (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Picard et al., 2004; Rodgers et al., 2007).

En estudios recientes se ha explorado el posible efecto protector del resveratrol en el tejido renal durante el proceso de la obesidad. Sin embargo, no se ha descrito el impacto del resveratrol sobre la lipogénesis renal y sobre la inflamación y el estrés oxidante derivados de la misma. Consecuentemente, la SIRT1 y la AMPK representan objetivos atractivos en el desarrollo de terapias para prevenir la enfermedad renal inducida por la obesidad. Por lo tanto el presente estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto benéfico del resveratrol sobre la disminución de lípidos renales, inicio del proceso inflamatorio, estrés oxidante y disfunción renal en la obesidad.

Definición del problema:

El incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en México presenta una serie de nuevos retos tales como la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en el sector salud. La enfermedad crónica renal está relacionada directamente con la hipertensión, la diabetes y las dislipidemias, enfermedades que han alcanzado proporciones epidémicas en nuestro país. Para prevenir o retrasar estas complicaciones, es necesario que la gente se proteja mediante estilos de vida más saludables, que incluya ejercicio, evitar el consumo de sal y azúcar en exceso y que el consumo de grasas sea adecuado. Las modificaciones a las dietas, en el manejo de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se han enfocado tradicionalmente a evitar las grasa saturada y el colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir basando dichas dietas únicamente en la reducción de grasa saturada y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del metabolismo como un todo en el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En este sentido, existe evidencia que los antioxidantes como el resveratrol juegan un papel relevante en el mantenimiento niveles adecuados de glucosa, lípidos y parámetros adecuados de la tensión arterial. Por lo tanto, los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas.

Justificación:

El presente proyecto pretende demostrar que, en un modelo de obesidad y síndrome metabólico, la suplementación con resveratrol promueve una disminución de la lipogénesis a nivel renal y sistémico y que a su vez esta mejoría se reflejará en una disminución del proceso inflamatorio y de estrés oxidante a nivel renal lo cual podrá prevenir o disminuir el daño renal. Este

proyecto generará nuevo conocimiento acerca del papel que juega el resveratrol sobre la lipogénesis renal como herramienta para el mejoramiento del daño renal. Específicamente, el proyecto brindará información sobre la regulación del metabolismo energético del riñón con especial énfasis en el metabolismo de lípidos. Cabe mencionar que es un proyecto original con un enfoque integral que permitirá entender los cambios metabólicos que ocurren de manera global en el tejido renal sobre el mecanismo por el cual el resveratrol puede detener o mejorar el daño renal a nivel de metabolismo de lípidos. Los datos obtenidos permitirán que se publique un artículo original en una revista internacional arbitrada de alto impacto, así como la graduación de dos estudiantes de Licenciatura.

Hipótesis:

En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, el consumo de resveratrol reducirá en el riñón parámetros relacionados con el contenido de lípidos en tejido renal y disminuirá la síntesis endógena de lípidos y en forma concomitante reducirá el estrés oxidante, la inflamación y de manera concomitante el daño renal. La disminución de lípidos a nivel sistémico y renal será una consecuencia del aumento de las proteínas AMPK y SIRT1 que promueven la oxidación de lípidos. Adicionalmente, el resveratrol disminuirá el estrés oxidante y los marcadores de inflamación.

Fecha estimada de inicio: 17/06/2013

Fecha estimada de término: 19/06/2015

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?: Si

Investigadores participantes**(0) Comentarios**

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Tovar Palacio, Claudia Teresa	Investigador responsable	1	Sí

Población vulnerable**(0) Comentarios**

Población vulnerable vinculado al protocolo Ninguna de las anteriores

Otra población:: No aplica

Objetivos

(0) Comentarios

Objetivo: Determinar el efecto de una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol, sobre el metabolismo de lípidos (lipogénesis y oxidación de ácidos grasos), inflamación y estrés oxidante en el tejido renal de ratones.

Tipo de objetivo: General

Objetivo:

1. Determinar la ganancia de peso y consumo de alimento de los ratones antes y después del tratamiento dietario en los 6 grupos para observar el efecto del resveratrol utilizando diferentes concentraciones (400 mg/kg y 600 mg/kg).
2. Analizar los parámetros bioquímicos en el modelo de obesidad inducida con las diferentes concentraciones de resveratrol (glucosa, triglicéridos, colesterol y ácidos grasos libres).
3. Analizar los parámetros hormonales en el modelo de obesidad inducida con las diferentes concentraciones de resveratrol (leptina, adiponectina, insulina y glucagón).
4. Determinar la función renal en los ratones antes del tratamiento y posterior al tratamiento con una dieta donde se ha inducido la obesidad y se ha suplementado con diferentes concentraciones de resveratrol (urea y creatinina).
5. Estudiar las características histológicas y morfológicas del tejido renal provenientes de ratones obesos alimentados con concentraciones de resveratrol (Tinción de rojo oleoso, hematoxilina-eosina).
6. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de resveratrol en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y genes involucrados en el metabolismo de lípidos a nivel renal en las siguientes vías:

1. **Lipogénesis en tejido renal:** SREBP-1c, ACC y sintasa de ácidos grasos (FAS).
2. **Oxidación de ácidos grasos en tejido renal:** PPARα, CPT-1, acil CoA oxidasa (AOX), acil CoA deshidrogenasa (ACAD).
3. **Lipólisis:** HSL, PPARγ.
4. **Balance energético:** AMPK, SIRT-1, LKB1, PGC1α.

7. Analizar la abundancia y nivel de fosforilación de algunas proteínas involucradas en las siguientes rutas metabólicas:

- a. **Lipogénesis en tejido renal:** SREBP-1c nuclear y total, ACC y p-ACC, FAS y p-FAS.
- b. **Oxidación de ácidos grasos en tejido renal:** PPARα
- c. **Lipólisis:** PPARγ
- d. **Balance energético:** AMPK, p-AMPK, SIRT-1, LKB1.

8. Analizar el estado inflamatorio del tejido renal y a nivel sistémico en un modelo animal de obesidad el cual ha sido suplementado con resveratrol evaluando la expresión (ARNm) y los niveles de interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), y factor nuclear kappa B (NFκB).

9. Evaluar el estrés oxidante en tejido renal en los animales obesos tratados con diferentes concentraciones de resveratrol midiendo la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas en tejido renal y la excreción urinaria de H₂O₂. También se evaluará la expresión genica del factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), de su represor la proteína 1 asociada a Kelch y parecida a ECH (Keap-1) y de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn y superóxido dismutasa dependiente de Mn). La transcripción de estas últimas enzimas depende de la activación del factor Nrf2.

Tipo de objetivo: Específico (s)

Metodología: Diseño general

(0) ComentariosMetodología
general:

METODOLOGÍA CIENTÍFICA:

ANIMALES Y ALIMENTACIÓN:

Diseño del estudio:

Se utilizarán 48 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad provenientes de la compañía Charles River Laboratories, USA, que se mantendrán en microaisladores con un ciclo luz/oscuridad de 12 hrs., con consumo de alimento en polvo *ad libitum* en comederos de acero, con dieta estándar recomendada por AIN-93 (Reeves et al., 1993). Los animales se aclimatarán a la dieta durante tres días, y los tratamientos dietarios se administrarán durante un periodo de 12 semanas. Los animales tendrán acceso *ad libitum* a agua potable en bebederos de 250 mL. Durante el período de entrenamiento y las 12 semanas del estudio. La temperatura a la cual se mantendrán los ratones será de 20-22°C, con una humedad relativa del 40-60%. El alimento se mantendrá almacenado a 4°C. Cada vez que sea necesario se trasladará la cantidad suficiente de alimento por medio de su transporte en bolsas nuevas y dobles de plástico.

Descripción de la maniobra o intervención: Durante las 12 semanas del tratamiento dietario, se registrará el peso corporal y el consumo de los animales cada tercer día. Un día antes al sacrificio los animales se colocarán en cajas metabólicas con la finalidad de recolectar la orina de 24 h. Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción cardiaca previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre con tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, leptina, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres). Posteriormente, a los animales se les realizará necropsia para obtener los riñones para realizar las histologías, la extracción de RNA, de proteína total y de lípidos neutros renales. El tejido renal se almacenará a -80°C hasta su procesamiento. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

Tamaño de la muestra: El experimento se va a realizar con 5 grupos experimentales más un grupo control. Cada grupo estará constituido por 8 ratones, dando un total de 48 ratones. Será necesario contar con aproximadamente 5 animales más con la finalidad de estandarizar algunas técnicas. El cálculo del número de muestra (n) se realizó según la siguiente ecuación para muestras independientes: $n=2[(Z_{\alpha/2} - Z_p)^2 / \{(m1-m2) / d\}^2]$. Donde $\alpha=0.05$, $Z_{\alpha/2}=1.645$, $p=0.95$ y $Z=-1.645$. Se utilizaron los datos del nivel mínimo y máximo de nitrógeno en sangre de un estudio previo (Champy et al., 2008). Tendremos un nivel de significancia de 5% y una frecuencia del 95% resultando en una n de 8 ratones por grupo.

Mecanismo de asignación del tratamiento: Cada grupo de 8 ratones se solicitará en una sola exhibición a la compañía Charles River, USA. con la finalidad de iniciar todos los tratamientos dietarios con los mismos tiempos.

Alimentación:

Las dietas (**Tabla 1**) están compuestas por: caseína libre de vitaminas (Harlan-teklan) al 19.87%, metionina al 0.14%, aceite de maíz al 5.16%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harland-Tekland) 1.89%, colina al 0.19%, mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Tekland) al 4.73%, celulosa al 2.84%, sacarosa al 32% o cuanto falte para alcanzar el 100% de la dieta, almidón 32.59% y resveratrol con las siguientes concentraciones: 0, 400, 600 mg/Kg de masa corporal para la dieta control con sus respectivas concentraciones de resveratrol.

Las dietas altas en grasa estarán compuestas por: caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad) al 24.14%, metionina al 0.17%, aceite de maíz al 5.75%, manteca al 17.72%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harland-Teklad) 2.99%, colina al 0.23%, mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Teklad) al 5.75%, celulosa al 1.72%, inulina al 1.72%, dextrina al 29.46% o cuanto falte para completar el 100% de la dieta, sacarosa al 10.35%. La concentración de resveratrol será de: 0, 400, 600 mg/Kg de peso corporal. Se establecieron estas dos diferentes concentraciones de resveratrol, considerando que en estudios previos (Kim et al., 2011; Lagouge et al., 2006) se demostraron efectos benéficos del resveratrol, a concentración de 400 mg/Kg de masa corporal, en ratones C57BL/6J los cuales son de la misma cepa que se utilizará en este diseño experimental. Adicionalmente se desea analizar el efecto que tiene este antioxidante si elevamos la concentración en un 50% ya que también está descrito en la literatura que no existe ningún efecto secundario a esta concentración.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales (g/100 g dieta)

Porcentaje (%)	Control	Control + 400 mg/Kg resveratrol	Control + 600 mg/Kg resveratrol	Dieta alta en grasa	Dieta alta en grasa + 400 mg/Kg resveratrol	Dieta alta en grasa + 600 mg/Kg resveratrol

Caseína	19,87	19,87	19,87	24,14	24,14	24,14
Metionina	0,14	0,14	0,14	0,17	0,17	0,17
Aceite de maíz	5,16	5,16	5,16	5,75	5,75	5,75
Manteca	—	—	—	17,72	17,72	17,72
Vitaminas	1,89	1,89	1,89	2,99	2,99	2,99
Colina	0,19	0,19	0,19	0,23	0,23	0,23
Minerales	4,73	4,73	4,73	5,75	5,75	5,75
Celulosa	2,84	2,84	2,84	1,72	1,72	1,72
Inulina	—	—	—	1,72	1,72	1,72
Dextrina	—	—	—	29,46	29,44	29,44
Sacarosa	32,59	32,57	32,57	10,35	10,35	10,35
Almidón	32,59	32,59	32,59	0	0	0
Resveratrol	0	0,0124	0,0186	0	0,0124	0,0186
Total	100	100	100	100	100	100

Las dietas se administrarán de manera oral, *ad libitum*, colocando el alimento sobre la reja para que sea ingerido por los animales en cantidad suficiente para cada ratón.

Con estas dietas se cubren los requerimientos de proteínas y de grasas de los ratones en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, ya que el porcentaje de proteína que contienen es aproximadamente del 20% (los valores presentados ya están ajustados de acuerdo a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína), mientras que el requerimiento de grasa es del 5%. El resveratrol será incorporado y mezclado en las dietas experimentales.

MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y TEJIDOS: Al término de los 84 días experimentales, los animales se desangrarán por punción cardíaca previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre en tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos, hormonales y de función renal. Posteriormente, se obtendrá el tejido renal para realizar los estudios histológicos y morfométricos, la extracción de ARN total, proteína total y lípidos neutros renales. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

DETERMINACION DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: Las concentraciones de triglicéridos, colesterol y glucosa en suero se determinarán con estuches de reactivos de diagnóstico *in vitro* (DiaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). Los ácidos grasos libres en suero se determinarán con el kit NEFA C (Wako Chemicals).

ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES EN EL SUERO DE LOS ANIMALES. La glucosa se determinará por el método de la glucosa oxidasa usando el autoanalizador YSI 2700. La concentración de triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos libre y glicerol en suero se determinará usando ensayos enzimáticos-iméricos (diaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). Las concentraciones de insulina, glucagon, adiponectina y leptina en suero se determinará por medio de ELISA (Alpco Diagnosis ó Enzo Life Sciences).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO: Las muestras de tejido renal fijadas se deshidratarán en dos baños de etanol al 96%, dos baños de etanol al 100%, un baño de etanol-xilol, dos baños de xilenos y tres baños de parafina. Posteriormente se incluirán en cassettes con parafina. Se realizarán cortes de 4-6 micras y se teñirán con hematoxilina-eosina para identificar las estructuras generales de la célula, con ácido peryódico de Schiff para identificar componentes celulares que contienen hidratos de carbono y con tricrómico de Masson para visualizar claramente las fibras de colágeno. Adicionalmente se llevará a cabo una tinción con rojo oleoso que tiene como finalidad la de identificar depósitos de grasas neutras. Con la ayuda de la tinción de hematoxilina-eosina se calculará el tamaño de los glomérulos en los diferentes tratamientos dietarios. Se analizarán 10 campos por muestra para evaluar estadísticamente los cambios estructurales presentes.

EXTRACCIÓN DE ARN DEL RIÑÓN: El ARN total del riñón se obtendrá con el método descrito por Sambrook et al. (1987), el cual consiste en una digestión con TRIZOL, seguida de una extracción con cloroformo y una precipitación con isopropanol. Para evaluar la integridad del ARN, se separarán 5

mg de ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.2 M. El ARN se cuantificará por medio de espectrofotometría a 260 nm.

ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR TIEMPO REAL EN TEJIDO RENAL:

A partir de 3 mg de RNA se llevará a cabo la síntesis de ADNc a través de la reacción de la transcriptasa reversa M-MLV con oligo-d(T). Las reacción de PCR en tiempo real se llevará a cabo por triplicado con 150-300 ng de ADNc (dependiendo del rango dinámico para cada gen), en un equipo ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos siguiendo las instrucciones del fabricant (AB, User Bulletin no. 2) utilizando la mezcla "Taqman Universal PCR Master Mix" y los oligos/sondas Taqman para de ensayos de expresión para los siguientes genes (**Tabla 2**):

Tabla 2. Lista de genes a determinar por PCR en tiempo real

Lipogénesis	Oxidación de ácidos grasos	Balance energético	Inflamación	Defensa antioxidante
SREBP-1	PPAR α	AMPK	IL-6	Nrf2
ACC	PPAR γ	SIRT1	TNF α	Keap-1
FAS	CPT-1	LKB1	NF κ B	SOD (Mn)
	AOX	PGC1 α		SOD (Cu/Zn)
	HSL			GPx
	ACAD			GR

EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE METABOLISMO DE LÍPIDOS, ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN EN TEJIDO RENAL:

El ARN obtenido de tejido renal se someterá a la acción de la transcriptasa reversa para obtener el ADNc. Este ADNc se someterá a un análisis por PCR de tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a amplificar (termociclador de tiempo real, 7000 sequence detection system, Applied Biosystems). Los genes a ser analizados se describen en la Tabla 2. Se utilizará a ciclofilina como gen constitutivo.

CALORIMETRÍA INDIRECTA: Los animales se alojarán de forma individual y se aclimatarán a las jaulas del calorímetro durante 24 horas antes de la recolección de intercambio de gases y los datos de consumo de alimentos. El consumo de oxígeno ($O_2 \cdot V$) y la descarga de dióxido de carbono ($CO_2 \cdot V$) se controlarán cada 3 minutos durante 24 horas. (Coleman, EUA). Se calcularán el cociente respiratorio ($V \cdot CO_2 / V \cdot O_2$), la tasa de consumo de energía ($3,816 \times V \cdot O_2 + 1,231 \times V \cdot CO_2$), la tasa de oxidación de grasas ($grasa / W, 1,67 \times (V \cdot O_2 - V \cdot CO_2) / PC$) y la tasa de oxidación de carbohidratos ($CHO / W, 4,51 \times 3,18 \times CO_2 - V \cdot O_2 / peso\ corporal$). Cuatro ratones de cada grupo se utilizarán en cada ensayo y el experimento se realizará por duplicado.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL: La función renal se evaluará mediante la determinación de la creatinina sérica, el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el aclaramiento de la creatinina. La creatinina en suero y en orina y el BUN se medirá con un autoanalizador. Las proteínas totales, tanto séricas como en orina, se determinarán de acuerdo a la técnica de Lowry et al. (1951).

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTO DE PROTEINA TOTAL: La proteína se extraerá con amortiguador de lisis Ripa (N-P40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y azida de sodio 1 mM disuelto en PBS) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasa durante 45 min a 4°C. El homogenizado se centrifugará a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. La porción de sobrenadante se recuperará y la concentración de proteína total se cuantificará por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-rad), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia.

ENSAYOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS ESPECÍFICAS, SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN A NIVEL RENAL POR MEDIO DE WESTERN BLOT: Para detectar la concentración, el estado de fosforilación y acetilación de las proteínas, el extracto de proteínas totales (20-60 mg) de las muestras de riñón se calentará a 85°C en solución amortiguadora de muestra para corrimiento (Bio-Rad) con 2-beta mercaptoetanol al 5%. Posteriormente las proteínas se separarán en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (8 al 12% según el tamaño de la proteína) y se transferirán a una membrana de PVDF. Se bloquearán con leche al 5% baja en grasa de y Tween 20 al 0.1%. Los inmunoblots se incubarán a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios de interés (SREBP-1, ACC, ACC fosforilado, FAS, FAS fosforilado, PPAR α , PPAR γ , AMPK, AMPK fosforilado, LKB1, SIRT 1), seguido de los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados con fluorescencia, para que posteriormente las bandas de expresión de cada proteína puedan ser detectadas y cuantificadas en un equipo de imagenología "BioSpectrum 500" (UVP). Los valores relativos obtenidos de las bandas de las proteínas de interés se dividirán entre los valores de la proteína con expresión constitutiva (actina).

CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS EN RIÑÓN: Se obtendrán los lípidos totales en riñón por el método de Okuno (1998). Se homogenizará el tejido congelado durante un minuto en NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.1% y Tris 10 mM precalentado a 45°C. Se tomará una alícuota del homogenizado para la cuantificación de triglicéridos usando un ensayo enzimático-imétrico (DiaSys Diagnostic Systems). Se extraerá el ADN del resto del homogenado para normalizar el contenido de triglicéridos por célula. Esta extracción se realizará por medio de una incubación con SDS al 0.1%, proteinasa K 100 mg/mL y EDTA 10 mM, seguida de extracciones de fenol:cloroformo:isoamilico y precipitación con acetato de sodio (Okuno, 1998). Finalmente las muestras de ADN se resuspenden en amortiguador TE, pH 8 con ribonucleasa A para su cuantificación y pureza a 260 y 280 nm, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Los resultados se expresarán como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, ingestión de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales, se evaluarán por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La diferencia significativa entre los grupos control y problemas se determinará mediante la prueba de Fisher usando el programa (programa de análisis estadístico JMP 6.0.3. de SAS).

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo: No aplica

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio:

El incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en México presenta una serie de nuevos retos tales como la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en el sector salud. La enfermedad crónica renal está relacionada directamente con la hipertensión, la diabetes y las dislipidemias, enfermedades que han alcanzado proporciones epidémicas en nuestro país. Para prevenir o retrasar estas complicaciones, es necesario que la gente se proteja mediante estilos de vida más saludables, que incluya ejercicio, evitar el consumo de sal y azúcar en exceso y que el consumo de grasas sea adecuado. Las modificaciones a las dietas, en el manejo de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se han enfocado tradicionalmente a evitar las grasas saturadas y el colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir basando dichas dietas únicamente en la reducción de grasas saturadas y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del metabolismo como un todo en el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En este sentido, existe evidencia que los antioxidantes como el resveratrol juegan un papel relevante en el mantenimiento de niveles adecuados de glucosa, lípidos y parámetros adecuados de la tensión arterial. Por lo tanto, los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas.

Tipo de beneficio:

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: No aplica

Manejo de confidencialidad**(0) Comentarios**

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto**(0) Comentarios**

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: No aplica

Riesgo (s) del estudio**(0) Comentarios**

Molestias generadas por el estudio: no aplica

Complicaciones del procedimiento: no aplica

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: no aplica

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: no aplica

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: no aplica

Otro tipo de riesgo: no aplica

Consentimiento informado**(0) Comentarios**

Hoja de informe al paciente: No aplica.doc

Carta de consentimiento informado: No aplica.doc

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de
investigadores::

[Declaración investigador.PDF](#)

© 2009 Portal INNSZ Instituto
Nacional de Ciencias Medicas y
Nutricion Salvador Zubiran Vasco
de Quiroga 15, Colonia Seccion
XVI, Tlalpan C.P.14000, Mexico
D.F., MEXICO Telefono: (52 55)
5487 0900

© 2009 LATIS. All rights
Reserved.
LATIS development, The power of
the information



**Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán**

INSTITUTO
NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN

SALVADOR
ZUBIRAN

Dirección de
Investigación

FORMA ÚNICA PARA
REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 03/04/2013

CLAVE: NMM-921-13/15-1

TÍTULO: ¿EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOGÉNESIS RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO?

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Tovar Palacio Claudia Teresa

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA Y METABOLISMO MINERAL

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Investigación Experimental

PATROCINADORES:

Patrocinador

Cantidad

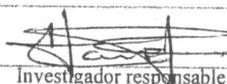
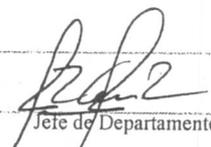
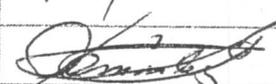
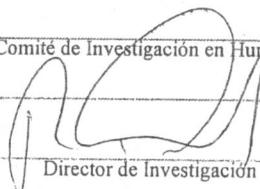
VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 17/06/2013 al 19/06/2015

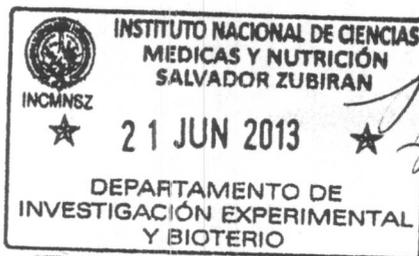
Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES			
Personal	\$ 0.00				
(sueldos y sobresueldos al personal)					
Equipos	\$ 0.00	FIRMAS			
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		 Investigador responsable		 Jefe de Departamento	
Materiales	\$ 0.00				
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Comité de Investigación en Humanos		 Comité de Investigación en Animales	
Animales	\$ 0.00				
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		 Director de Investigación		 Director General	
Estudios	\$ 0.00				
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)					
Viaticos	\$ 0.00	Fecha de resolución 11-ABRIL-2014			
(reuniones científicas y trabajo de campo)					



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

COMITÉ
INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE
EVALUACIÓN
DE PROYECTO
DE
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: NMM-921-13/15-1

1. Título del proyecto

“EFECTO DEL RESVERATROL EN LA LIPOGÉNESIS RENAL, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDANTE EN EL ES
DE LA OBESIDAD Y EL SÍNDROME METABÓLICO”

2. Investigadores

2a. Identificación

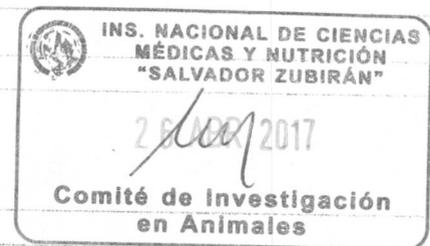
INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
TOVAR PALACIO CLAUDIA TERESA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador responsable		tovarpal@avantel.net

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores



4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación en investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

Entre las consecuencias metabólicas más importantes de la obesidad, se encuentran las alteraciones del metabolismo (alteraciones dan como resultado hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hiperglicemia y enfermedades cardiovasculares 2003). En forma específica se ha sugerido la hiperlipidemia que puede cursar con el deterioro renal mediado por metabolismo de lípidos (Praga, 2002). En varios estudios, tanto en seres humanos como en animales experimentales demostrado una correlación entre los lípidos del suero, lípidos renales y proteinuria y una progresión en el deterioro (Spencer et al., 2004; Bonnet et al., 2000; Gin et al., 2000; Sun et al., 2002).

La insuficiencia renal crónica es un proceso fisiopatológico de múltiples etiologías, resultando en una inexorable disminución de la función de las nefronas (Schrier, 2004). La enfermedad crónica renal evoluciona hacia la falla renal para lo cual es necesario diálisis o trasplante para el mantenimiento de la vida (K/DOQ1, 2002; He et al., 1999; Foley et al., 1998; Munter et al., 2

2001).

El incremento en la prevalencia de individuos con síndrome metabólico se ha asociado fuertemente como un factor de desarrollo de la enfermedad crónica renal así como de la enfermedad renal terminal (Hsu, 2006; Iseki, 2004). Recientemente se ha demostrado el papel que juegan los lípidos intrarrenales en la enfermedad renal inducida por obesidad (Jiang et al., 2007). La acumulación de lípidos parece tener un papel muy importante en la patogénesis renal, produciendo en sus primeras etapas alteraciones estructurales y funcionales en el riñón. Inicialmente se asumió que la formación de depósitos de lípidos en los riñones estaba asociada a niveles elevados de estos en suero. Recientemente se ha encontrado que la síntesis endógena de lípidos juega un papel fundamental en la formación de estos depósitos en el riñón. El mecanismo por el cual la obesidad causa daño renal no se ha esclarecido completamente y es probable que involucre toda una combinación de anomalías tanto hemodinámicas como metabólicas (Tesouro et al., 2011). La enfermedad renal crónica se encuentra usualmente acompañada por inflamación, hipertrofia, estrés oxidante y alteraciones del metabolismo de lípidos y de la glucosa. Por lo tanto, se deberán analizar las alternativas que puedan revertir dichos procesos o el tratamiento de la enfermedad renal crónica y la enfermedad renal terminal. Los antioxidantes naturales son una de las alternativas que puedan ayudar en el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas. El resveratrol es un antioxidante natural con una amplia gama de reportes sobre sus beneficios metabólicos. El resveratrol es una fitoalexina polifenólica que se encuentra en muchas especies de plantas, incluyendo vides de uva y bayas. Presenta una amplia gama de beneficios para la salud desde un punto de vista farmacológico como antioxidante, antimutagénico, anti-inflamatorio, estrogénico, anticancerígeno y cardioprotector. Aunque el resveratrol es el responsable de que el consumo moderado de vino tinto se asocie con una disminución de la mortalidad por enfermedad coronaria (Kopp et al., 1998). En estudios recientes se ha reforzado esta teoría lo cual ha conducido a postular que el resveratrol tiene un papel crucial en la protección cardiovascular otorgada por las uvas y el vino (Bertelli y Das, 2009). Los estudios realizados en animales han abierto una perspectiva prometedora del potencial uso del resveratrol en la prevención de trastornos metabólicos serios como la obesidad.

El resveratrol es un compuesto natural que afecta el metabolismo energético y la función mitocondrial y sirve como un agente de restricción calórica, por lo menos en modelos animales de obesidad. Se ha demostrado que el resveratrol activa la cinasa activada por AMPK, incrementa los niveles de las proteínas sirtuina 1 (SIRT 1) y coactivador del receptor activado por ligando de tipo gamma 1 alfa (PPAR) gamma 1 alfa (PGC-1 α), incrementa la actividad de la citrato sintasa mitocondrial sin cambios en la expresión de la proteína y mejora la respiración mitocondrial en músculo. La actividad de la cinasa que activa a la AMPK, LKB1, es crítica para la regulación de la gluconeogénesis y consecuentemente de la homeostasis de la glucosa. En el músculo esquelético y el corazón, la actividad de la LKB1 lleva a la fosforilación e inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACC). Esta inhibición resulta en la disminución de los niveles de acetil-CoA que es en sí mismo, un inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I). Con la disminución del inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa I se produce un incremento concomitante de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria. Un incremento en la oxidación de los ácidos grasos como de la glucólisis, llevará a un aumento de la producción de ATP. Adicionalmente, se ha demostrado que la AMPK afecta las actividades de varias proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos como: la hidroximetil glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa sensible a hormonas (HSL), glicerol fosfato aciltransferasa, malonil-CoA descarboxilasa (MCD), sintasa de glucógeno y cAMP dependiente (PKA). Con lo cual se observa que la actividad de la AMPK afecta no sólo la homeostasis de la glucosa sino también la homeostasis de los lípidos y los ácidos grasos e incluso la homeostasis energética incluyendo el metabolismo del glucógeno y el metabolismo de colesterol y triglicéridos. Adicionalmente la activación de la AMPK conduce a la disminución del nivel de la proteína de unión al elemento de respuesta a la grasa (SREBP-1), un factor de transcripción que es un regulador clave en la expresión de varias enzimas lipogénicas. Existe evidencia que el resveratrol protege contra el estrés oxidante y la inflamación por medio del aumento de la expresión génica y actividad de

diabéticos (Chang et al., 2011; Palsamy et al., 2011). Sin embargo, en el riñón no existe información suficiente sobre el impacto que permita evaluar su efecto sobre la disminución de la lipotoxicidad renal. Por otro lado, se ha demostrado que el resveratrol es un inductor de SIRT1 (Borra et al., 2005; Ajmo et al., 2008). En células de mamíferos, el resveratrol promueve la expresión de SIRT1 y estimula en forma dramática su actividad (Cohen et al., 2004). Sin embargo, aún no está claro el mecanismo molecular por el cual el resveratrol induce la actividad de SIRT1 *in vivo*. Se han demostrado que el resveratrol modula el metabolismo de lípidos por medio de la señalización de SIRT1 (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006; Picard et al., 2004; Rodgers et al., 2007).

En estudios recientes se ha explorado el posible efecto protector del resveratrol en el tejido renal durante el proceso de la obesidad. No se ha descrito el impacto del resveratrol sobre la lipogénesis renal y sobre la inflamación y el estrés oxidante. Consecuentemente, la SIRT1 y la AMPK representan objetivos atractivos en el desarrollo de terapias para prevenir la enfermedad renal por la obesidad. Por lo tanto el presente estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto benéfico del resveratrol sobre los lípidos renales, inicio del proceso inflamatorio, estrés oxidante y disfunción renal en la obesidad.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

El incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas en México presenta una serie de nuevos retos tales como la necesidad de nuevas alternativas para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en el sector salud. La enfermedad crónica renal está directamente relacionada con la hipertensión, la diabetes y las dislipidemias, enfermedades que han alcanzado proporciones epidémicas. Para prevenir o retrasar estas complicaciones, es necesario que la gente se proteja mediante estilos de vida más saludables: ejercicio, evitar el consumo de sal y azúcar en exceso y que el consumo de grasas sea adecuado. Las modificaciones a las dietas de la obesidad y en forma particular en el mejoramiento del perfil lipídico se han enfocado tradicionalmente a evitar las dietas ricas en colesterol. Sin embargo, estudios actuales están mostrando que el manejo de los lípidos ha sido sobresimplificado, es decir, se ha centrado únicamente en la reducción de grasa saturada y colesterol. Específicamente, se ha dejado a un lado la correlación del colesterol con el entendimiento de los efectos benéficos o tóxicos en diversas patologías tales como la insuficiencia renal. En la evidencia que los antioxidantes como el resveratrol juegan un papel relevante en el mantenimiento de niveles adecuados de parámetros de la tensión arterial. Por lo tanto, los antioxidantes naturales son una de las alternativas que permiten el tratamiento y prevención de esta constelación de alteraciones fisiológicas.

JUSTIFICACION :

El presente proyecto pretende demostrar que, en un modelo de obesidad y síndrome metabólico, la suplementación con resveratrol resulta en una disminución de la lipogénesis a nivel renal y sistémico y que a su vez esta mejoría se reflejará en una disminución del estrés oxidante y de la inflamación a nivel renal lo cual podrá prevenir o disminuir el daño renal. Este proyecto generará nuevo conocimiento que juega el resveratrol sobre la lipogénesis renal como herramienta para el mejoramiento del daño renal. Específicamente, se brindará información sobre la regulación del metabolismo energético del riñón con especial énfasis en el metabolismo de lípidos. Se mencionará que es un proyecto original con un enfoque integral que permitirá entender los cambios metabólicos que ocurren en el tejido renal sobre el mecanismo por el cual el resveratrol puede detener o mejorar el daño renal a nivel de metabolitos. Los datos obtenidos permitirán que se publique un artículo original en una revista internacional arbitrada de alto impacto, así como de dos estudiantes de Licenciatura.

6a. Hipótesis

En ratones alimentados con una dieta alta en grasa, el consumo de resveratrol reducirá en el riñón parámetros relacionados con la lipogénesis, lípidos en tejido renal y disminuirá la síntesis endógena de lípidos y en forma concomitante reducirá el estrés oxidante,

manera concomitante el daño renal. La disminución de lípidos a nivel sistémico y renal será una consecuencia del aumento de AMPK y SIRT1 que promueven la oxidación de lípidos. Adicionalmente, el resveratrol disminuirá el estrés oxidante y la inflamación.

6b. Objetivos.

Determinar el efecto de una dieta alta en grasa suplementada con resveratrol, sobre el metabolismo de lípidos (lipogénesis y oxidación de grasos), inflamación y estrés oxidante en el tejido renal de ratones.

7. Metodología: Diseño general.

METODOLOGÍA CIENTÍFICA:

ANIMALES Y ALIMENTACIÓN:

Diseño del estudio:

Se utilizarán 48 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad provenientes de la compañía Charles River Laboratories. Los animales se mantendrán en microaisladores con un ciclo luz/oscuridad de 12 hrs., con consumo de alimento en polvo *ad libitum* en combinación con una dieta estándar recomendada por AIN-93 (Reeves et al., 1993). Los animales se aclimatarán a la dieta durante tres días antes del inicio del estudio. Los dietarios se administrarán durante un periodo de 12 semanas. Los animales tendrán acceso *ad libitum* a agua potable en botellas. Durante el periodo de entrenamiento y las 12 semanas del estudio. La temperatura a la cual se mantendrán los ratones será de 22°C y la humedad relativa del 40-60%. El alimento se mantendrá almacenado a 4°C. Cada vez que sea necesario se trasladará el alimento por medio de su transporte en bolsas nuevas y dobles de plástico.

Descripción de la maniobra o intervención: Durante las 12 semanas del tratamiento dietario, se registrará el peso corporal de los animales cada tercer día. Un día antes al sacrificio los animales se colocarán en cajas metabólicas con la finalidad de recolectar muestras de sangre. Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción cardiaca por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Para la recolección de la sangre se utilizarán tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres). Posteriormente, a los animales se les realizará necropsia para obtener los riñones para análisis histológicos, la extracción de RNA, de proteína total y de lípidos neutros renales. El tejido renal se almacenará a -80°C hasta el análisis. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

Tamaño de la muestra: El experimento se va a realizar con 5 grupos experimentales más un grupo control. Cada grupo estará conformado por 8 ratones, dando un total de 48 ratones. Será necesario contar con aproximadamente 5 animales más con la finalidad de cubrir las pérdidas técnicas. El cálculo del número de muestra (n) se realizó según la siguiente ecuación para muestras independientes: $n = 2 \left[\frac{Z}{\delta} \right]^2$. Donde $\alpha = 0.05$, $Z_{\alpha/2} = 1.645$, $\pi = 0.95$ y $Z = -1.645$. Se utilizaron los datos del nivel mínimo y máximo de nitrógeno en el tejido renal previo (Champy et al., 2008). Tendremos un nivel de significancia de 5% y una frecuencia del 95% resultando en una n de 8.

Mecanismo de asignación del tratamiento: Cada grupo de 8 ratones se solicitará en una sola exhibición a la compañía Charles River Laboratories.

Aceite de maíz	5,16	5,16	5,16	5,75	5,75
Manteca	—	—	—	17,72	17,72
Vitaminas	1,89	1,89	1,89	2,99	2,99
Colina	0,19	0,19	0,19	0,23	0,23
Minerales	4,73	4,73	4,73	5,75	5,75
Celulosa	2,84	2,84	2,84	1,72	1,72
Inulina	—	—	—	1,72	1,72
Dextrina	—	—	—	29,46	29,44
Sacarosa	32,59	32,57	32,57	10,35	10,35
Almidón	32,59	32,59	32,59	0	0
Resveratrol	0	0,0124	0,0186	0	0,0124
Total	100	100	100	100	100

Las dietas se administrarán de manera oral, *ad libitum*, colocando el alimento sobre la reja para que sea ingerido por los ratones suficiente para cada ratón.

Con estas dietas se cubren los requerimientos de proteínas y de grasas de los ratones en base a la Norma Oficial Mexicana 1999, ya que el porcentaje de proteína que contienen es aproximadamente del 20% (los valores presentados ya están ajustados a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína), mientras que el requerimiento de grasa es del 5%. El resveratrol está mezclado en las dietas experimentales.

MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y TEJIDOS: Al término de los 84 días experimentales, los animales se desangrarán y serán eutanasiados por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener sangre. Se recolectará la sangre en tubos con gel separador para la determinación de parámetros bioquímicos, hormonales. Posteriormente, se obtendrá el tejido renal para realizar los estudios histológicos y morfométricos, la extracción de ARN y lípidos neutros renales. Para el análisis histológico, una porción de los tejidos se fijará en formalina al 10% a 4°C.

DETERMINACION DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS: Las concentraciones de triglicéridos, colesterol y glicemia se determinarán con estuches de reactivos de diagnóstico *in vitro* (DiaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). Los ácidos grasos se determinarán con el kit NEFA C (Wako Chemicals).

ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES EN EL SUERO DE LOS ANIMALES. La glucosa se determinará por el método de la glucosa oxidasa usando el autoanalizador YSI 2700. La concentración de triglicéridos, colesterol total, glicerol en suero se determinará usando ensayos enzimáticos-iméricos (diaSys Diagnostic Systems, Roche y Sigma). La insulina, glucagon, adiponectina y leptina en suero se determinará por medio de ELISA (Alpco Diagnosis ó Enzo Life Sciences).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO: Las muestras de tejido renal fijadas se deshidratarán en dos baños de etanol al 96%, al 100%, un baño de etanol-xilol, dos baños de xilenos y tres baños de parafina. Posteriormente se incluirán en casetes y se realizarán cortes de 4-6 micras y se teñirán con hematoxilina-eosina para identificar las estructuras generales de la célula, con PAS de Schiff para identificar componentes celulares que contienen hidratos de carbono y con tricrómico de Masson para visualizar fibras de colágeno. Adicionalmente se llevará a cabo una tinción con rojo oleoso que tiene como finalidad la de identificar fibras neutras. Con la ayuda de la tinción de hematoxilina-eosina se calculará el tamaño de los glomérulos en los diferentes tratamientos. Se analizarán 10 campos por muestra para evaluar estadísticamente los cambios estructurales presentes.

EXTRACCIÓN DE ARN DEL RIÑÓN: El ARN total del riñón se obtendrá con el método descrito por Sambrook et al. (1989) que consiste en una digestión con TRIZOL, seguida de una extracción con cloroformo y una precipitación con isopropanol. Para la integridad del ARN, se separarán 5 µg de ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído 2.2 M. El ARN se cuantificará por medio de espectrofotometría a 260 nm.

ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR TIEMPO REAL EN TEJIDO RENAL:

A partir de 3 µg de RNA se llevará a cabo la síntesis de ADNc a través de la reacción de la transcriptasa reversa M-MLV. La reacción de PCR en tiempo real se llevará a cabo por triplicado con 150-300 ng de ADNc (dependiendo del rango dinámico) en un equipo ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos siguiendo las instrucciones (AB, User Bulletin no. 2) utilizando la mezcla "Taqman Universal PCR Master Mix" y los oligos/sondas Taqman para determinar la expresión de los genes para los siguientes genes (**Tabla 2**):

Tabla 2. Lista de genes a determinar por PCR en tiempo real

Lipogénesis	Oxidación de ácidos grasos	Balance energético	Inflamación	Defensa antioxidante
SREBP-1	PPAR α	AMPK	IL-6	Nrf2
ACC	PPAR γ	SIRT1	TNF α	Keap-1
FAS	CPT-1	LKB1	NF κ B	SOD (Mn)
	AOX	PGC1 α		SOD (Cu/Zn)
	HSL			GPx
	ACAD			GR

TRANSCRIPCIÓN DE METABOLISMO DE LÍPIDOS, ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN EN TEJIDO

obtenido de tejido renal se someterá a la acción de la transcriptasa reversa para obtener el ADNc. Este ADNc se someterá a de tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a amplificar (termociclador de tiempo detection system, Applied Biosystems). Los genes a ser analizados se describen en la Tabla 2. Se utilizará a ciclofilina como

CALORIMETRÍA INDIRECTA: Los animales se alojarán de forma individual y se aclimatarán a las jaulas del calorímetro antes de la recolección de intercambio de gases y los datos de consumo de alimentos. El consumo de oxígeno ($O_2 \cdot V$) y la de carbono ($CO_2 \cdot V$) se controlarán cada 3 minutos durante 24 horas. (Coleman, EUA). Se calcularán el cociente respiratorio (RQ), la tasa de consumo de energía ($3,816 \times V \cdot O_2 + 1,231 \times V \cdot CO_2$), la tasa de oxidación de grasas (grasa / W, $1,67 \times (V \cdot O_2 - RQ \cdot V \cdot CO_2)$) y la tasa de oxidación de carbohidratos (CHO / W, $4,51 \times (RQ - 0,7) \cdot V \cdot CO_2$). Cuatro ratones de cada grupo de ensayo y el experimento se realizará por duplicado.

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN RENAL: La función renal se evaluará mediante la determinación de la creatinina sérica, en sangre (BUN) y el aclaramiento de la creatinina. La creatinina en suero y en orina y el BUN se medirá con un autoanálisis de creatinina, tanto séricas como en orina, se determinarán de acuerdo a la técnica de Lowry et al. (1951).

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTO DE PROTEÍNA TOTAL: La proteína se extraerá con amortiguador (N-P40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y azida de sodio 1 mM disuelto en PBS) en presencia de inhibidores de fosfatasa durante 45 min a 4°C. El homogenizado se centrifugará a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. La porción de sobrenadante se cuantificará por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-rad), utilizando albúmina de suero de ratón (Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia.

ENSAYOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN POR MEDIO DE WESTERN BLOT: Para detectar la concentración, el estado de fosforilación y acetilación de las pro

proteínas totales (20-60 µg) de las muestras de riñón se calentará a 85°C en solución amortiguadora de muestra para corrimiento de 2-beta mercaptoetanol al 5%. Posteriormente las proteínas se separarán en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (8 al 1 de la proteína) y se transferirán a una membrana de PVDF). Se bloquearán con leche al 5% baja en grasa de y Tween 20. Los inmunoblots se incubarán a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios de interés (SREBP-1, ACC, ACC fosforilado, PPARα, PPARγ, AMPK, AMPK fosforilado, LKB1, SIRT 1), seguido de los anticuerpos secundarios correspondientes con fluorescencia, para que posteriormente las bandas de expresión de cada proteína puedan ser detectadas y cuantificadas por imagenología "BioSpectrum 500" (UVP). Los valores relativos obtenidos de las bandas de las proteínas de interés se dividirán de la proteína con expresión constitutiva (actina).

CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS EN RIÑÓN: Se obtendrán los lípidos totales en riñón por el método de homogenizar el tejido congelado durante un minuto en NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.1% y Tris 10 mM precalentado a 37°C. Una alícuota del homogenizado para la cuantificación de triglicéridos usando un ensayo enzimático-imétrico (DiaSys Diagnostica) extraerá el ADN del resto del homogenado para normalizar el contenido de triglicéridos por célula. Esta extracción se realizará por incubación con SDS al 0.1%, proteinasa K 100 µg/mL y EDTA 10 mM, seguida de extracciones de fenol:cloroformo:isoamyl alcohol con acetato de sodio (Okuno, 1998). Finalmente las muestras de ADN se resuspenderán en amortiguador TE, pH 8 con RNasease para la cuantificación y pureza a 260 y 280 nm, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Los resultados se expresarán como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ingestión de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales, se evaluarán por ANOVA de dos vías con un nivel de significancia de p (programa de análisis estadístico JMP 6.0.3. de SAS).

8. Metodología: Criterios de selección

No aplica

9. Metodología: Desenlaces y variables

No aplica

10. Riesgos y beneficios del estudio

RIESGOS:

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN

Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Fondo de apoyo	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, and You M. 2008. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *physiology Gastrointestinal and liver physiology* 295(4):G833-842.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K et al improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444(7117):337-342.
- Bertelli AA, and Das DK. 2009. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of cardiovascular pharmacology* 54(6):684-689.
- Bonnet JM, Boivin R, Bernard N, and Sassard J. 2000. Extrarenal renin-angiotensin systems are unable to maintain blood pressure. *Exp Pharmacol Physiol* 27(9):684-689.
- Borra MT, Smith BC, and Denu JM. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 280(17):17187-17195.
- Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, and Hung LM. 2011. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *Journal of biomedical science* 134(9):2455S-2463S.
- Cohen P, and Friedman JM. 2004. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *The Journal of biological chemistry* 279(13):12455-12463.
- Foley RN, Parfrey PS, and Sarnak MJ. 1998. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 32(5 Suppl 3):S112-119.
- Gerstein HC. 2001. Diabetes and the HOPE study: implications for macrovascular and microvascular disease. *Int J Clin Pract* 55(12):1005-1010.
- Gin H, Rigalleau V, and Aparicio M. 2000. Lipids, protein intake, and diabetic nephropathy. *Diabetes & metabolism* 26 Suppl 1:13-17.
- He J, and Whelton PK. 1999. Elevated systolic blood pressure as a risk factor for cardiovascular and renal disease. *J Hypertens* 17(1):13-17.
- Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, and Go AS. 2006. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Journal of the American Medical Association* 296(1):21-28.
- Iseki K, Ikemiya Y, Kinjo K, Inoue T, Iseki C, and Takishita S. 2004. Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney international* 65(5):1870-1876.
- Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, Lucia MS, Li J, and Levi M. 2005. Diet-induced obesity causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *Journal of biological chemistry* 280(37):32317-32325.
- Kopp P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'. *Journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 138(6):619-620.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P et al improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127(6):1301-1310.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, and Schaffer JE. 2003. Triglyceride accumulation requires SREBP1c and is independent of dietary intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(6):3077-3082.
- Mydlo JH, and Gerstein M. 2001. Patients with urologic cancer and other nonurologic malignancies: analysis of a sample. *Urology* 58(6):864-869.
- Palsamy P, and Subramanian S. 2011. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1812(7):719-731.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, and Guarente L. 2004. Sirtuin 1 regulates metabolism by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429(6993):771-776.
- Praga M. 2002. Obesity--a neglected culprit in renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Renal Association - European Renal Association* 17(7):1157-1159.
- Reeves PG, Nielsen FH, and Fahey GC, Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American

- ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123(11):1939-1951.
- Schrier RW, Wang W, Poole B, and Mitra A. 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *T investigation* 114(1):5-14.
- Spencer MW, Muhlfeld AS, Segerer S, Hudkins KL, Kirk E, LeBoeuf RC, and Alpers CE. 2004. Hyperglycemia and synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice. *Am J Nephrol* 24(1):20-31.
- Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, and Levi M. 2002. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in renal metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *The Journal of biological chemistry* 277(21):18919-18927.
- Tesauro M, Canale MP, Rodia G, Di Daniele N, Lauro D, Scuteri A, and Cardillo C. 2011. Metabolic syndrome, cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiology research and practice* 2011:653182.