



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 01 de agosto de 2018


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

Estimada Dra. Bobadilla

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "**Intervención nutricional en la obesidad materna de la rata: beneficio en la función reproductiva de las crías macho**" con registro **CINVA: 1555**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente


Dra. Elena Zambrano González
Investigador en Ciencias Médicas F
Biología de la Reproducción



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 01 de agosto de 2018

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

A continuación, encontrará el informe final del **“Intervención nutricional en la obesidad materna de la rata: beneficio en la función reproductiva de las crías macho”** con registro **CINVA: 1555**. Los cambios en los patrones de alimentación y de actividad física han incrementado el desarrollo de la obesidad; dentro de los sectores de la población afectados se encuentran las mujeres en edad reproductiva. La obesidad materna desencadena en la progenie alteraciones tanto metabólicas como reproductivas e incremento en el estrés oxidante. En el presente proyecto se evaluó si la intervención nutricional antes y durante la gestación revierte los efectos adversos de la obesidad materna en el estrés oxidante, calidad espermática y fertilidad de la descendencia. Los resultados mostraron que la obesidad materna modifica en los testículos de las crías la actividad del sistema de defensa antioxidante e incrementa en los espermatozoides los biomarcadores de estrés oxidante y disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes, la calidad espermática y la función reproductiva. La intervención materna logró prevenir el daño oxidante y mejora la función reproductiva. Los resultados obtenidos sirvieron para la titulación de alumnos a nivel licenciatura y para la publicación de artículos en revistas indexadas. Actualmente hay un artículo en proceso de publicación.

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**

Es importante señalar que pueden existir discrepancias entre las fechas de los trabajos publicados y la aprobación del proyecto; esto debido a que la parte experimental se inició antes de las nuevas normas de la CICUAL, por lo que para la realización del proyecto se utilizaron las crías generadas en el BRE-112 (07/09 – 01/15).

Se optó por no enviar un adendum ya que, si bien era el mismo tipo de intervención materna, los estudios a realizar en las crías macho eran únicamente reproductivos y también a que el proyecto "Intervención nutricional en la obesidad materna de la rata: beneficio en la función reproductiva de las crías macho" fue enviado para su evaluación a la convocatoria de Investigación Científica Básica 2016 (CONACyT), la cual desafortunadamente no resultó financiada.

Tesis:

Palma Daniela Lovera Flores (2015) Grado: Licenciatura

Impacto de la obesidad materna de la rata en el proceso de envejecimiento testicular de su cría macho.

Directora de tesis: Dra. Elena Zambrano

Artículos:

Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. Bautista CJ; Rodríguez-González GL, Morales A, Lomas-Soria C, Cruz-Pérez F, Reyes-Castro LA, Zambrano E. *Reprod Fertil Dev.* **2017;29:1950-1957.** ISSN: 1031-3613. doi: 10.1071/RD16277.

Autor correspondiente: Dra. Elena Zambrano

Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.


Dra. Elena Zambrano González

Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system

Claudia J. Bautista^A, Guadalupe L. Rodríguez-González^A, Angélica Morales^A,
Consuelo Lomas-Soria^A, Fabiola Cruz-Pérez^A, Luis A. Reyes-Castro^A
and Elena Zambrano^{A,B}

^AInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez, Tlalpan, 14080, México, D.F. México.

^BCorresponding author. Email: zamgon@yahoo.com.mx

Abstract. A high-fat diet during intrauterine development predisposes offspring (F₁) to phenotypic alterations, such as lipid synthesis imbalance and increased oxidative stress, causing changes in male fertility. The objective of this study was to evaluate the effects of maternal obesity during pregnancy and lactation on antioxidant enzymes in the F₁ testes. Female Wistar rats (F₀) were fed either a control (C, 5% fat) or an obesogenic (MO, maternal obesity, 25% fat) diet from weaning and throughout subsequent pregnancy and lactation. F₁ offspring were weaned to the control diet. Testes were retrieved at 110, 450 and 650 postnatal days (PND) for real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemical (IHC) antioxidant enzyme analyses. Catalase was similar between groups by RT-qPCR, whereas by IHC it was higher in the MO group at all ages than in the C group. Superoxide dismutase 1 (*SOD1*) had lower expression at PND 110 in MO than in C by both techniques; at PND 450 and 650 by immunoanalysis *SOD1* was higher in MO than in C. Glutathione peroxidase 1 (*GPX1*), *GPX2* and *GPX4* by RT-qPCR were similar between groups and ages; by IHC *GPX1/2* was higher in MO than in C, whereas *GPX4* showed the opposite result at PND 110 and 450. In conclusion, antioxidant enzymes in the rat testes are modified with age. Maternal obesity negatively affects the F₁ testicular antioxidant defence system, which, in turn, can explain the decrease in reproductive capacity.

Additional keywords: catalase, glutathione peroxidase, reproductive programming, superoxide dismutase, testes function.

Received 25 November 2015, accepted 15 November 2016, published online 9 January 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPACTO DE LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA EN EL
PROCESO DE ENVEJECIMIENTO TESTICULAR DE SU CRÍA
MACHO**

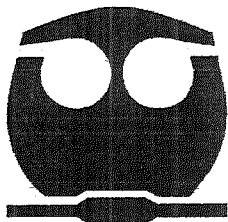
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

CE



**MÉXICO, D.F. EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA 2015**

JURADO ASIGNADO:

PRÉSIDENTE: ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

VOCAL: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ

SECRETARIO: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

1er. SUPLENTE: ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS

2do. SUPLENTE: CAROLINA GUZMÁN ARRIAGA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

ASESOR DEL TEMA:


DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:


DRA. CLAUDIA JANET BAUTISTA CARBAJAL

SUSTENTANTE:

Ó

CE



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Acuse

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 072-18

Dra. Elena Zambrano Gonzalez
Depto. Biología de la Reproducción
Presente.

Estimada Dra. Zambrano.:

Por este conducto le informo que su proyecto con título "INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA: BENEFICIO EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LAS CRÍAS MACHO". con registro CINVA 1555-15/18-1 finalizara en mayo 2018. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

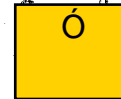
1. Informe final
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

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

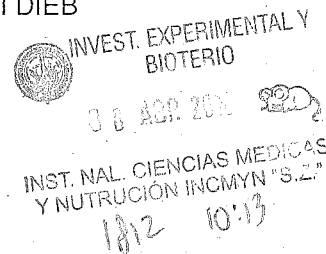
*Anulio Original
30/07/2018*



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

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

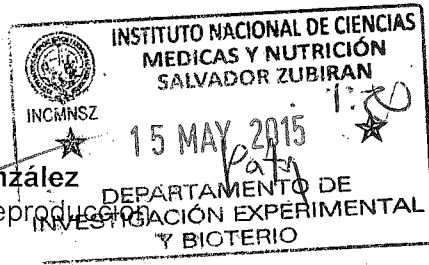




Acuse

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

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



México, D. F., a 15 de mayo de 2015.

Dra. Elena Zambrano González

Depto. de Biología de la Reproducción
Presente

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL Y BIOTERIO

REF: CINVA 1555, Clave: BRE-1555-15/18-1

Estimado Dra. Zambrano:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Intervención nutricional en la obesidad materna de la rata: Beneficio en la función reproductiva de las crías macho."

Este comité ha dictaminado **Aprobarlo** a partir de esta fecha, con las siguientes **observaciones**:

1. Mencionar cual es la edad reproductiva de la rata y justificar por qué se pretende estudiar la función reproductiva en machos viejos (650 días) y cuál sería el impacto de estos resultados.
2. Corroborar si existe espacio en el bioterio para realizar este proyecto.

Es importante que las correcciones las haga en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo modificado en el sistema Latis deberá entregarse en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y nayelort@hotmail.com.

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

Recibido
15/05/15





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: 10/04/2015

CLAVE: BRE-1555-15/18-1

TÍTULO: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA: BENEFICIO EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LAS CRIAS MACHO.

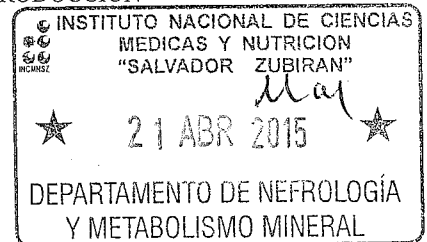
INVESTIGADOR RESPONSABLE: ZAMBRANO GONZALEZ ELENA

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad



VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 01/06/2015 al 01/06/2018

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		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		FIRMAS	
Materiales	\$ 0.00	Ó	Ó
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)		Investigador responsable	Jefe de Departamento
Animales	\$ 0.00		Ó
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)		Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
Estudios	\$ 0.00		
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)		Director de Investigación	Director General
Viaticos	\$ 0.00		
(reuniones científicas y trabajo de campo)		Fecha de resolución	
Publicaciones	\$ 0.00		
costo directos de publicación, sobregiro)			



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: BRE-1555-15/18-1

Fecha de registro del Protocolo: 15 de Abril del 2015

Título del Protocolo: INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA: BENEFICIO EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LAS CRÍAS MACHO.

Propuesta: a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Elena Zambrano González
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Biología de la Reproducción
Teléfono	54 87 09 00 ext 2417
Correo electrónico	zamgon@yahoo.com.mx

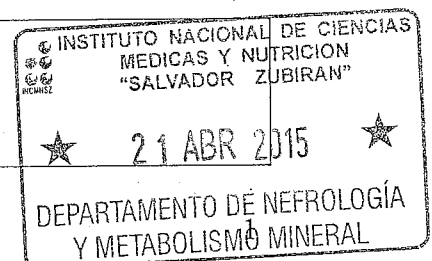
Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Guadalupe Leticia Rodríguez González	INCMNSZ	Maestría	54870900 Ext 2417	[REDACTED]
Luis Antonio Reyes Castro	INCMNSZ	EBC	54870900 Ext 2417	[REDACTED]
Lourdes Boeck Quirasco	INCMNSZ	QFB	54870900 Ext 2417	[REDACTED]

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	INCMNSZ y Facultad de Química, UNAM	Doctorado	54870900 Ext 2417	[REDACTED]

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	Junio	2015
Fecha tentativa de finalización.	01	Junio	2018

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán





FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo general

Evaluar si la intervención nutricional antes y durante la gestación previene los efectos adversos de la obesidad materna en el estrés oxidante, calidad espermática y fertilidad de las ratas macho y sus efectos en futuras generaciones.

Objetivos específicos

- Registrar el peso corporal y determinar el índice de adiposidad de las crías de madres obesas.
- Analizar las concentraciones de colesterol, triglicéridos, insulina, leptina, LH y testosterona.
- Determinar biomarcadores de estrés oxidante tanto en el testículo como en el espermatozoide y examinar la calidad espermática.
- Evaluar en el testículo daño al DNA y modificación de histonas como mecanismos por los cuales la obesidad paterna puede programar a su descendencia.
- Evaluar la tasa de fertilidad.
- Obtención de crías de segunda generación y determinación de calidad espermática y estrés oxidante.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Justificación

La obesidad en mujeres en edad reproductiva tiene el potencial de dar lugar a un ciclo intergeneracional de obesidad y alteraciones metabólicas y reproductivas, ya que los descendientes de madres obesas tienen el riesgo de ser obesos durante sus años reproductivos, perpetuando así el ciclo y los efectos de la programación. Si bien el embarazo es un periodo de vulnerabilidad para la predisposición a enfermedades en la vida postnatal, también es una ventana de oportunidades para implementar modificaciones en el estilo de vida que podrían ser el pivote para prevenir los efectos adversos tanto en la madre como en la descendencia, por lo que promover estilos de vida saludables durante la gestación es de suma importancia. El uso de roedores en estudios de intervención materna es muy conveniente no sólo por razones prácticas, económicas o debido a que la obtención y manipulación de las crías se da en un corto plazo, sino también porque nos permite estudiar los mecanismos por los cuales se da una mala programación en la descendencia. El presente proyecto es una continuación de nuestros estudios de intervención nutricional en la obesidad materna y representa un ejemplo de los esfuerzos por contribuir en la prevención de condiciones adversas tales como sobrepeso, obesidad y alteraciones de la fertilidad como resultado de un ambiente intrauterino adverso y su paso a futuras generaciones.

Procedimientos en el uso de animales

Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo condiciones controladas de luz-obscuridad (de 7:00 a 19:00 h), de humedad relativa (40-70%) y temperatura (22-23°C).

Modelo de obesidad

Se inducirá obesidad (O) en ratas hembra recién destetadas de la estirpe Wistar (F0) con una dieta obesogénica la cual contiene 23.5% proteína, 20.0% manteca de cerdo, 5.0% grasa,



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

20.2% polisacáridos, 20.2% azúcares simples, 5.0% fibra, 5.0% mezcla de minerales y 1.0% mezcla de vitaminas (w/w), energía 4.9 kcal/g; la cual se les proporcionará desde el destete, incluyendo apareamiento (120 días), gestación y lactancia. Esta dieta se elaborará en la planta piloto del Instituto donde se pesan y mezclan las materias primas; para su conservación se mantendrá en el cuarto frío del departamento de Biología de la Reproducción.

El grupo control (C) será alimentado durante el mismo periodo con una dieta comercial para roedores (Zeigler Rodent RQ22-5) que contiene 22.0% proteína, 5.0% grasa, 31.0% polisacáridos, 31.0% azúcares simples, 4.0% fibra, 6.0% minerales y 1.0% vitaminas (w/w), energía 4.0 kcal/g. El agua y alimento serán *ad libitum*.

Intervención materna previa a la gestación

La mitad de las hembras F0 serán intervenidas nutricionalmente a los 90 días es decir un mes previo a la gestación (IPG). La alimentación de las ratas será sustituida por dieta control y continuarán con esta dieta durante la gestación y la lactancia. El grupo control seguirá con la dieta chow durante todo el estudio.

Apareamiento de las hembras

A los 120 días de edad las hembras serán apareadas con machos de la misma estirpe no experimentales. Las ratas tendrán partos naturales. Al nacimiento de las crías se obtendrá el tamaño de la camada, su peso corporal. Para la determinación del sexo, se medirá la distancia ano-genital empleando una regla Vernier. Nuestros datos (**J Physiol. 2005;566:225-36**) indican que las crías hembras al nacimiento tienen una distancia ano genital de 1.67 ± 0.128 mm y los machos 3.26 ± 0.22 mm. De tal forma que 2.5 mm es más de 2 DE de la media de cada grupo. Por tanto, el sexo será determinado de acuerdo a la distancia ano-genital > (machos) o < (hembras) 2.5 mm. Para asegurar homogeneidad en el estudio, camadas de 10 a 14 crías serán ajustadas al nacimiento a 10 crías por madre tratando de mantener una relación de sexo de 1:1. Las ratas sobrantes estarán disponibles para el bioterio como animales fuera de protocolo. Al destete todas las crías de los diferentes grupos experimentales serán alimentadas con dieta control hasta el momento del sacrificio.

Los tres grupos experimentales se esquematizan en la siguiente figura 1, donde se muestra el tipo de dieta que las madres y las crías consumirán en el estudio:

Grupos	Madres (F0)				Crías (F1)
	21-90 d <small>Intervención</small>	90-120 d <small>Apareamiento</small>	Gestación	Lactancia <small>Destete</small>	Crecimiento
Control (C)	Control				Control
Obesidad materna (O)	Hiperlipídica (HL)				
Intervención previa a la gestación (IPG)	HL	Control			

Crías

Las crías serán estudiadas

- 1) Nacimiento: características antropométricas.
- 2) Destete (21 d): peso, descenso de testículos, retracción del prepucio
- 3) Diferentes días postnatales (110, 450 y 650): peso y grasa corporal; concentraciones en suero de leptina, insulina, LH, testosterona; biomarcadores de estrés oxidante en testículos y espermatozoides; calidad espermática y tasa de fertilidad.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", replazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se utilizarán 50 hembras de la estirpe Wistar las cuales se distribuirán de la siguiente forma: 10 ratas para el grupo control, 20 el grupo de obesidad y 20 para el intervenido. Se utilizará este número de muestra tomando en cuenta a las posibles ratas que serán excluidas del proyecto por diversas razones como un número de camada mayor de 14 o menor de 10, o que no queden preñadas. De acuerdo a nuestra experiencia en proyectos anteriores, la tasa de fertilidad de las ratas del Bioterio del INCMNSZ es del 80% y de las ratas obesas del 40% (**Int J Obes (Lond). 2013 Aug 16; doi: 10.1038/ijo.2013.150**) por lo que se espera que al menos 8 ratas queden preñadas por grupo y que al menos 6 puedan ser incluidas en el estudio, por lo que se estima que al finalizar el experimento quedará una "n" de 6-8 madres por grupo. Las ratas excluidas estarán disponibles para el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio como animales fuera del protocolo.

Para este estudio, la "n" también se calculó matemáticamente (**ILAR J 2002;43:207-13**) de acuerdo al algoritmo de la prueba de porcentaje de éxito y error (por grupo/por prueba) el cual se presenta a continuación.

$$n = \log B / \log p$$



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

B = poder de la prueba estadística = 1-B
 donde B es el poder de la prueba = (0.05)

p = proporción de animales en la colonia (evento esperado)

$$n = \frac{\log(0.05)}{\log(0.70)} = 8.39 \text{ por grupo/por prueba}$$

En cada edad postnatal de estudio (110, 450 y 650) se utilizará por camada una cría por sexo por grupo/camada. De tener de 6 a 8 madres por grupo, se tendrá un total de 18 a 24 crías por cada sexo/edad. Este número de animales ha sido previamente manejado por nuestro grupo sin problema alguno, el bioterio del Instituto nos ha ofrecido las facilidades para experimentos a largo plazo. Para este proyecto nosotros trabajaremos únicamente con las crías macho; sin embargo las hembras no se descartaran ya que serán utilizadas por otros investigadores pertenecientes al grupo de trabajo.

Cabe mencionar que los procedimientos que realizaremos en los animales de experimentación son técnicas estandarizadas y avaladas por comités de ética internos y a nivel mundial donde se establece que los niveles de angustia o dolor generados al modelo es mínimo o nulo. Algunas de las publicaciones del grupo de trabajo son: **J Physiol. 2005;563:275-84, J Physiol. 2005;566:225-36, J Physiol. 2010;588:1791-9, Age 2014;36:9721, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209.**

- 6) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del Bioterio, en caso de ser necesario.

Para este proyecto, las ratas únicamente serán movilizadas fuera de las instalaciones del Bioterio, el día que se necesiten obtener las muestras biológicas correspondientes.

Para el caso, un par de días antes se le informará a la MVZ. Mariela Contreras Escamilla los motivos por los cuales se van a retirar a los animales del Bioterio y cuál será su destino final y se solicitarán cajas transportadoras preparadas únicamente con aserrín, agua y alimento.

El día que se realice la transportación de las ratas estarán perfectamente marcadas y serán agrupadas por grupo experimental. Con el conocimiento de que estos animales una vez retirados del Bioterio no pueden ser nuevamente ingresados y esto por motivos de Bioseguridad.

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Fondo genético				
Rata Wistar	50	45g	Recién destetadas (21d)	Hembras
No. de Grupos experimentales:	3			
No. de animales por grupo:	10 ratas para el grupo C, 20 para el grupo O y 20 para el IPG. Tras el apareamiento y el parto, la "n"			



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. TOTAL DE ANIMALES:	<p>será de 6-8 madres por grupo.</p> <p>De tener de 6 a 8 madres por grupo (total 18-24), se tendrá un total de 18 a 24 crías por cada sexo. Por lo que el número total de crías de los 3 grupos experimentales será de 108 a 192. De acuerdo con la jefa del DIEB ya se corroboró la disponibilidad de espacios, cajas, comederos y bebederos suficientes para llevar a cabo el protocolo.</p>
------------------------	---

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB.

El estudio materno llevara alrededor de 5 meses debido a que vamos a tener a las hembras que serán futuras madres desde su destete, gestación y lactancia. Las crías se mantendrán por un periodo de 21 meses momento en el cual será punto final del estudio. Cabe mencionar, no todas las ratas permanecerán durante todo ese tiempo, ya que se algunas de las crías serán utilizadas antes (~4 y 15 meses).

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.		X	Al inicio del estudio, la manipulación de la dieta se realizará diariamente por un periodo de 142 días. Se registrará la ingesta de alimento.
Toma de muestras biológicas.		X	La obtención de las muestras biológicas se realizará únicamente en tres ocasiones cuando las crías cumplan 110, 450 y 650 días postnatales. Las ratas serán guillotizadas. De acuerdo a nuestra experiencia, este método no interfiere con la determinación de los analitos que analizamos, es motivo por lo que utilizamos esta técnica. El personal que realizará el procedimiento está altamente capacitado.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.	X		
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

Obtención de muestras biológicas

Tras 6 horas de ayuno, las crías macho provenientes de los tres grupos experimentales serán decapitadas a los 110, 450 y 650 días postnatales. Se recolectará la sangre para la obtención de suero, los testículos serán disectados, limpiados de la grasa circundante, pesados y almacenados a -70°C para su posterior análisis. La grasa del esternón, pancreática, retroperitoneal y gonadal serán disectadas y pesadas individualmente para posteriormente calcular el índice de adiposidad (tejido adiposo total (g)/peso corporal (g)). Los espermatozoides se obtendrán del conducto deferente y de la cola del epidídimo y se colocarán rápidamente en solución salina a 37°C.

Preparación de las muestras

Testículo: una porción del testículo será homogenizado en solución salina a 4°C, se harán alícuotas las cuales se almacenarán a -70°C para la posterior cuantificación de proteína por el método de Bradford y la determinación de biomarcadores de estrés oxidante (especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas antioxidantes).

Espermatozoides: una vez obtenidos los espermatozoides y su concentración, se realizarán alícuotas de 5×10^6 y 10×10^6 espermatozoides y se les realizarán choques térmicos, seis ciclos de -70°C a 45°C, finalizado esto las alícuotas se sonicarán por 2 minutos con seis intervalos de 20 segundos cada uno y colocadas inmediatamente en hielo. Las alícuotas se almacenadas a -70°C para la posterior determinación de ROS y enzimas antioxidantes.

La lipoperoxidación se realizará al momento de la homogenización y de la obtención de los espermatozoides (no se requiere sonicación).

Proteínas totales por Bradford.

En una placa de 96 pozos se colocaran 5 µl de la muestra diluida 1:100. Para el caso de la curva estándar se utilizará albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 200 µg/ml, el volumen añadido de BSA se ajustará para tener concentraciones de entre 0.4 a 2.5 µg. Tanto a las muestras como a la curva se les añadirán 200 µl del reactivo de Bradford (BIO-RAD®) a una dilución 1:5, se incubaran por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leerán a 595 nm.

Concentraciones bioquímicas y hormonales

Las concentraciones en suero de colesterol y triglicéridos se realizará por un método enzimático mientras que la insulina, leptina, LH y testosterona por radioinmunoanálisis.

Lipoperoxidación

La cuantificación de malondialdehído tanto en testículo como en el espermatozoide se realizará mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (*Int J Obes (Lond)*. 2013 Aug 16. doi: 10.1038/ijo.2013.150, *Age*. 2014;36:9721, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308:R219-25, *Int J Obes (Lond)*. 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Especies Reactivas de Oxígeno

Se cuantificarán mediante un método fluorométrico donde se determinará la oxidación de 2'7'-diclorofluoresceína diacetato. (Age. 2014;36:9721, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).

Enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) será mediante un estuche comercial. Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (Int J Obes (Lond). 2013 Aug 16. doi: 10.1038/ijo.2013.150, Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).

Calidad espermática

La evaluación de la calidad espermática (concentración, viabilidad y movilidad) se realizará de acuerdo a lo establecido en el manual de la OMS para el examen y procesamiento de semen humano. Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).

Daño al DNA

El daño al DNA en el testículo se analizará empleando la placa DNA Damage Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array, el cual analiza 84 genes implicados en el daño y reparación del DNA. La fragmentación del DNA en el espermatozoide se realizará mediante el ensayo cometa. La modificación de histonas se determinará mediante la expresión de SIRT-6 por inmunohistoquímica, qPCR y Western blot.

Tasa de fertilidad

Para la fertilidad se evaluarán machos provenientes de diferente camada. Un macho (F1) proveniente de cada grupo experimental será colocado por una semana con dos hembras no experimentales, el macho será considerado fértil cuando una de las dos hembras quede gestante. (J Physiol. 2005;563:275-84, Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209). A los 450 días postnatales las hembras que resultaron gestantes se llevarán a término para la obtención de la F2 y poder evaluar los mismos parámetros a las mismas edades antes señaladas.

Análisis estadístico

Los resultados serán analizados por ANOVA de dos vías seguido de la prueba Holm-Sidak. La tasa de fertilidad se analizará mediante la prueba de χ^2 . $p < 0.05$ será considerado como significativo.

11) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Ninguno				

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No aplica.

13) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No aplica.

14) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia			X	
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

15) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

a. Variación de peso corporal:

1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
2. Moderada del 10-20%
3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).

b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:

1. 0 si es normal.
2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
3. 2 si está afectado
4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care
http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

De acuerdo con el punto final humanitario en nuestra práctica hemos determinado que el número de animales no puede reducirse, sin embargo utilizamos métodos refinados que se han ido modificando a través del tiempo con el fin de evitar al máximo cualquier tipo de sufrimiento, la angustia y favorecer su bienestar. Esta consideración no es solo importante desde el punto de vista ético sino también una consideración a las buenas prácticas de laboratorio, ya que la experiencia de dolor y estrés da lugar a cambios fisiológicos que pueden incrementar la variabilidad de los resultados experimentales. Por tanto es importante para nosotros asegurar que las condiciones en el alojamiento animal sean las mejores posibles, así como su manejo y método de eutanasia más humano posible. En el caso de este proyecto que será un proyecto a largo plazo es indispensable establecer que los criterios de punto final que para este caso serían pérdida excesiva de peso, piloerección, otitis, desarrollo de tumores.

16) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistolá de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

17) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf

18) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

En el área de desechos biológicos que se encuentra en la parte trasera del Bioterio, se llevarán los desechos biológicos y cadáveres en una bolsa amarilla que contiene la leyenda de **RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS** previamente etiquetada con la información completa tanto de la especie del animal, la edad, el experimento al que pertenece, el responsable del experimento, el departamento de donde proviene y se conservará en esta



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

área en condiciones de congelación hasta que la empresa contratada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán retire estos desechos.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.


Nombre y firma del Investigador Responsable
Elena Zambrano González

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dr. Rafael Hernández González	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	



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 CIBHE

BRE-1555-15-11-1

1. Título del proyecto

INTERVENCIÓN NUTRICIONAL EN LA OBESIDAD MATERNA DE LA RATA: BENEFICIO EN LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LAS CRÍAS MACHO.

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
BOECK QUIRASCO LOURDES	QUIMICO A	Investigador invitado		[REDACTED]
REYES CASTRO LUIS ANTONIO	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED A	Investigador invitado		[REDACTED]
RODRIGUEZ GONZALEZ GUADALUPE LETICIA	AYUDANTE D INV CIENCIAS MED C	Investigador invitado		[REDACTED]
ZAMBRANO GONZALEZ ELENA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED E	Investigador responsable		[REDACTED]

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 específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

En las últimas décadas los cambios en los patrones de alimentación y de actividad física han ocasionado que la prevalencia de obesidad a nivel mundial se haya incrementado notablemente. Dentro de los sectores de la población afectados por la obesidad se encuentran las mujeres en edad joven y reproductiva (1). Lo cual es preocupante ya que la exposición de los fetos a un ambiente intrauterino obesogénico puede ocasionar cambios en

su organogénesis y generar respuestas fisiológicas permanentes. Estudios epidemiológicos y con animales de investigación han reportado que la obesidad materna previa y durante la gestación y lactancia no sólo impacta el metabolismo de la madre sino que también predispone a la descendencia al acumulo excesivo de tejido adiposo abdominal, al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad durante la vida adulta (2). La obesidad y la infertilidad masculina se han incrementado de forma paralela. En términos generales hay estudios que muestran que existe relación entre la obesidad y la mala calidad espermática, acompañado de trastornos hormonales e incremento en el estrés oxidante en el espermatozoide que como consecuencia impacta negativamente la tasa de fertilidad. Datos emergentes resaltan que las crías provenientes de espermatozoides expuestos a altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, se vuelven intolerantes a la glucosa e incrementan el acumulo de tejido adiposo (3). También se ha reportado que el daño oxidativo en los espermatozoides provenientes de hombres obesos programa a su progenie a presentar síndrome metabólico y obesidad. Algunos de los mecanismos por los cuales la obesidad paterna puede programar a su descendencia son: 1) daño al DNA debido a la remodelación defectuosa de la cromatina durante la espermiogénesis, lo que libera espermatozoides a la luz tubular con baja protaminación y mal compactación de la cromatina lo cual asociado al estrés oxidante incrementa la apoptosis y daño al DNA, y 2) la modificación de histonas; la transición de histonas a protaminas es regulada por las histonas deacetilasas y acetilasas. La sirtuina-6 (SIRT-6) es una histona deacetilasa que es regulada por el estado metabólico. Estudios en ratones con obesidad inducida por dieta se ha reportado que la SIRT-6 se encuentra disminuida en las células germinales del testículo, lo que ocasionó mayor acetilación de histonas durante la espermiogénesis, lo cual se asocia con daño al DNA.

La obesidad *per se* genera problemas de fertilidad, sin embargo, diversos estudios reportan que las alteraciones en la capacidad reproductiva pueden quedar programadas durante etapas críticas del desarrollo. Se sabe que las crías macho provenientes de madres alimentadas con una dieta baja en proteína durante la gestación se vuelven obesos, tienen menor calidad espermática y disminución en la tasa de fertilidad (4). Por otro lado la obesidad materna también genera efectos adversos sobre la función reproductiva de la progenie. Por ejemplo, las crías hembra provenientes de madres alimentadas con una dieta alta en grasa durante la gestación y la lactancia muestran incremento en las concentraciones séricas de leptina e

insulina, pubertad temprana y mayor incidencia de estros prolongados (5). Recientemente, en nuestro grupo utilizando a la rata como modelo biológico hemos observado que las crías macho provenientes de madres obesas presentan mayor peso corporal y grasa gonadal, reducción en las concentraciones de hormonas reproductivas como son la LH y la testosterona, disminución en la calidad espermática, incremento en el estrés oxidante tanto en los testículos como en los espermatozoides y envejecimiento prematuro en la capacidad reproductiva (6). Sin embargo, no se ha reportado si los efectos adversos observados en la fertilidad de la F1 pueden ser transmitidos a la siguiente generación (F2).

La obesidad en mujeres en edad reproductiva tiene el potencial de dar lugar a un ciclo intergeneracional de obesidad y alteraciones metabólicas y reproductivas. Ya que los hijos de madres obesas tienen el riesgo de ser obesos durante sus años reproductivos, perpetuando así el ciclo y los efectos de la programación. Si bien el embarazo es un periodo de vulnerabilidad para la predisposición a enfermedades en la vida postnatal, también es una ventana de oportunidades para implementar modificaciones en el estilo de vida que podrían ser el pivote para prevenir los efectos adversos tanto en la madre como en la descendencia. Estudios con animales de experimentación han reportado que la intervención nutricional en madres obesas previa al embarazo ocasiona que las crías en la vida adulta presenten disminución en las concentraciones de leptina, insulina e índice de resistencia a la insulina, menor acumulación de grasa y reducción del tamaño del adipocito (7).

DEFINICION DE PROBLEMAS :

A la fecha no hay suficiente información que indique si la intervención nutricional previa y durante la gestación en la madre obesa puede prevenir en el testículo las crías el daño al DNA, cambios en la modificación de histonas, el incremento en el estrés oxidante y el envejecimiento prematuro de la capacidad reproductiva.

JUSTIFICACION :

La obesidad en mujeres en edad reproductiva tiene el potencial de dar lugar a un ciclo intergeneracional de obesidad y alteraciones metabólicas y

reproductivas, ya que los descendientes de madres obesas tienen el riesgo de ser obesos durante sus años reproductivos, perpetuando así el ciclo y los efectos de la programación. Si bien el embarazo es un periodo de vulnerabilidad para la predisposición a enfermedades en la vida postnatal, también es una ventana de oportunidades para implementar modificaciones en el estilo de vida que podrían ser el pivote para prevenir los efectos adversos tanto en la madre como en la descendencia, por lo que promover estilos de vida saludables durante la gestación es de suma importancia. El uso de roedores en estudios de intervención materna es muy conveniente no sólo por razones prácticas, económicas o debido a que la obtención y manipulación de las crías se da en un corto plazo, sino también porque nos permite estudiar los mecanismos por los cuales se da una mala programación en la descendencia. El presente proyecto es una continuación de nuestros estudios de intervención nutricional en la obesidad materna y representa un ejemplo de los esfuerzos por contribuir en la prevención de condiciones adversas tales como sobrepeso, obesidad y alteraciones de la fertilidad como resultado de un ambiente intrauterino adverso y su paso a futuras generaciones.

6a. Hipótesis

La obesidad materna durante la gestación y lactancia incrementa en la el estrés oxidante en el testículo y espermatozoide y conlleva al envejecimiento prematuro de la capacidad reproductiva. La intervención nutricional de la rata con obesidad previa a la gestación, previene parcial o totalmente, las alteraciones en la función reproductiva de la cría y en su descendencia.

6b. Objetivos.

General:

Evaluar si la intervención nutricional antes y durante la gestación previene los efectos adversos de la obesidad materna en el estrés oxidante, calidad espermática y fertilidad de las ratas macho y sus efectos en futuras generaciones.

Específicos:

- Registrar el peso corporal y determinar el índice de adiposidad de las crías de madres obesas.

-Analizar las concentraciones de colesterol, triglicéridos, insulina, leptina, LH y testosterona.

-Determinar biomarcadores de estrés oxidante tanto en el testículo como en el espermatozoide y examinar la calidad espermática.

-Evaluar en el testículo daño al DNA y modificación de histonas como mecanismos por los cuales la obesidad paterna puede programar a su descendencia.

-Evaluar la tasa de fertilidad.

-Obtención de crías de segunda generación y determinación de calidad espermática y estrés oxidante.

7. Metodología: Diseño general.

A) Diseño del estudio, tipo de seguimiento y tipo de controles: controlado, simple y ratas alimentadas con dieta comercial.

B) Descripción de maniobra o de intervención

Procedimientos en el uso de animales

Los animales se mantendrán en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo condiciones controladas de luz-obscuridad (de 7:00 a 19:00 h), de humedad relativa (45-70%) y temperatura (22-23°C).

Modelo de obesidad

Se inducirá obesidad (O) en ratas hembra recién destetadas de la estirpe

Wistar (F0) con una dieta obesogénica la cual contiene 23.5% proteína, 20.0% manteca de cerdo, 5.0% grasa, 20.2% polisacáridos, 20.2% azúcares simples, 5.0% fibra, 5.0% mezcla de minerales y 1.0% mezcla de vitaminas (w/w), energía 4.9 kcal/g; la cual se les proporcionará desde el destete, incluyendo apareamiento (120 días), gestación y lactancia. Esta dieta se elaborará en la planta piloto del Instituto donde se pesan y mezclan las materias primas; para su conservación se mantendrá en el cuarto frío del departamento de Biología de la Reproducción.

El grupo control (C) será alimentado durante el mismo periodo con una dieta comercial para roedores (Zeigler Rodent RQ22-5) que contiene 22.0% proteína, 5.0% grasa, 31.0% polisacáridos, 31.0% azúcares simples, 4.0% fibra, 6.0% minerales y 1.0% vitaminas (w/w), energía 4.0 kcal/g. El agua y alimento serán *ad libitum*.

Intervención materna previa a la gestación

La mitad de las hembras F0 serán intervenidas nutricionalmente a los 90 días es decir un mes previo a la gestación (IPG). La alimentación de las ratas será sustituida por dieta control y continuarán con esta dieta durante la gestación y la lactancia. El grupo control seguirá con la dieta chow durante todo el estudio.

Apareamiento de las hembras

A los 120 días de edad las hembras serán apareadas con machos de la misma estirpe no experimentales. Las ratas tendrán partos naturales. Al nacimiento de las crías se obtendrá el tamaño de la camada, su peso corporal. Para la determinación del sexo, se medirá la distancia ano-genital empleando una regla Vernier. Nuestros datos (**J Physiol. 2005;566:225-36**) indican que las crías hembras al nacimiento tienen una distancia ano genital de 1.67 ± 0.128 mm y los machos 3.26 ± 0.22 mm. De tal forma que 2.5 mm es más de 2 DE de la media de cada grupo. Por tanto, el sexo será determinado de acuerdo a la distancia ano-genital $>$ (machos) o $<$ (hembras) 2.5 mm. Para asegurar homogeneidad en el estudio, camadas de 10 a 14 crías serán ajustadas al nacimiento a 10 crías por madre tratando de mantener una relación de sexo de 1:1. Las ratas sobrantes estarán disponibles para el bioterio como animales fuera de protocolo. Al destete

todas las crías de los diferentes grupos experimentales serán alimentadas con dieta control hasta el momento del sacrificio.

Los tres grupos experimentales se esquematizan en la siguiente figura 1, donde se muestra el tipo de dieta que las madres y las crías consumirán en el estudio:



Crías

Las crías serán estudiadas

Nacimiento: características antropométricas.

Destete (21 d): peso, descenso de testículos, retracción del prepucio

Diferentes días postnatales (110, 450 y 650): peso y grasa corporal; concentraciones en suero de leptina, insulina, LH, testosterona; biomarcadores de estrés oxidante en testículos y espermatozoides; calidad espermática y tasa de fertilidad.

Obtención de muestras biológicas

La obtención de las muestras biológicas se realizará únicamente en tres ocasiones cuando las crías cumplan 110, 450 y 650 días postnatales. Las ratas serán guillotizadas. De acuerdo a nuestra experiencia, este método no interfiere con la determinación de los analitos que analizamos, es motivo por lo que utilizamos esta técnica. El personal que realizará el procedimiento está altamente capacitado. Tras 6 horas de ayuno, las crías macho provenientes de los tres grupos experimentales serán decapitadas a los 110, 450 y 650 días postnatales. Se recolectará la sangre para la obtención de suero, los testículos serán disectados, limpiados de la grasa circundante, pesados y almacenados a -70°C para su posterior análisis. La grasa del esternón, pancreática, retroperitoneal y gonadal serán disectadas y pesadas individualmente para posteriormente calcular el índice de adiposidad (tejido adiposo total (g)/peso corporal (g)). Los espermatozoides se obtendrán del conducto deferente y de la cola del epidídimo y se colocarán rápidamente en

solución salina a 37°C.

Los restos de los animales y muestras biológicas se llevarán al área de desechos biológicos que se encuentra en la parte trasera del Bioterio, en una bolsa amarilla con la leyenda **RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS** previamente etiquetada con la información completa tanto de la especie del animal, la edad, el experimento al que pertenece, el responsable del experimento, el departamento de donde proviene y se conservará en esta área en condiciones de congelación hasta que la empresa contratada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán retire estos desechos.

Preparación de las muestras

Testículo: una porción del testículo será homogenizado en solución salina a 4°C, se harán alícuotas las cuales se almacenarán a -70°C para la posterior cuantificación de proteína por el método de Bradford y la determinación de biomarcadores de estrés oxidante (especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas antioxidantes).

Espermatozoides: una vez obtenidos los espermatozoides y su concentración, se realizarán alícuotas de 5×10^6 y 10×10^6 espermatozoides y se les realizarán choques térmicos, seis ciclos de -70°C a 45°C, finalizado esto las alícuotas se sonicarán por 2 minutos con seis intervalos de 20 segundos cada uno y colocadas inmediatamente en hielo. Las alícuotas se almacenadas a -70°C para la posterior determinación de ROS y enzimas antioxidantes.

La lipoperoxidación se realizará al momento de la homogenización y de la obtención de los espermatozoides (no se requiere sonicación).

Proteínas totales por Bradford.

En una placa de 96 pozos se colocaran 5 µl de la muestra diluida 1:100. Para el caso de la curva estándar se utilizará albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 200 µg/ml, el volumen añadido de BSA se ajustará para tener concentraciones de entre 0.4 a 2.5 µg. Tanto a las muestras como a la curva se les añadirán 200 µl del reactivo de Bradford (BIO-RAD®)

a una dilución 1:5, se incubaran por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leerán a 595 nm.

Concentraciones bioquímicas y hormonales

Las concentraciones en suero de colesterol y triglicéridos se realizará por un método enzimático mientras que la insulina, leptina, LH y testosterona por radioinmunoanálisis.

Lipoperoxidación

La cuantificación de malondialdehído tanto en testículo como en el espermatozoide se realizará mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (**Int J Obes (Lond). 2013 Aug 16. doi: 10.1038/ijo.2013.150, Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209**).

Especies Reactivas de Oxígeno

Se cuantificarán mediante un método fluorométrico donde se determinará la oxidación de 2'7'-diclorofluoresceína diacetato. (**Age. 2014;36:9721, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209**).

Enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) será mediante un estuche comercial. Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (**Int J Obes (Lond). 2013 Aug 16. doi: 10.1038/ijo.2013.150, Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi:**

10.1038/ijo.2014.209).

Calidad espermática

La evaluación de la calidad espermática (concentración, viabilidad y movilidad) se realizará de acuerdo a lo establecido en el manual de la OMS para el examen y procesamiento de semen humano. Para mayor detalle de la técnica se pueden consultar las siguientes publicaciones de nuestro grupo de trabajo (**Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).**

Daño al DNA

El daño al DNA en el testículo se analizará empleando la placa DNA Damage Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array, el cual analiza 84 genes implicados en el daño y reparación del DNA. La fragmentación del DNA en el espermatozoide se realizará mediante el ensayo cometa. La modificación de histonas se determinará mediante la expresión de SIRT-6 por inmunohistoquímica, qPCR y Western blot.

Tasa de fertilidad

Para la fertilidad se evaluarán machos provenientes de diferente camada. Un macho (F1) proveniente de cada grupo experimental será colocado por una semana con dos hembras no experimentales, el macho será considerado fértil cuando una de las dos hembras quede gestante. (**J Physiol. 2005;563:275-84, Age. 2014;36:9721, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;308:R219-25, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209).** A los 450 días postnatales las hembras que resultaron gestantes se llevarán a término para la obtención de la F2 y poder evaluar los mismos parámetros antes señalados únicamente a los 110 y 450 días postnatales.

Análisis estadístico

Los resultados serán analizados por ANOVA de dos vías seguido de la prueba Holm-Sidak. La tasa de fertilidad se analizará mediante la prueba de χ^2 . p

C) Tamaño de la muestra

Se utilizarán 50 hembras de la estirpe Wistar las cuales se distribuirán de la siguiente forma: 10 ratas para el grupo control, 20 el grupo de obesidad y 20 para el intervenido. Se utilizará este número de muestra tomando en cuenta a las posibles ratas que serán excluidas del proyecto por diversas razones como un número de camada mayor de 14 o menor de 10, o que no queden preñadas. De acuerdo a nuestra experiencia en proyectos anteriores, la tasa de fertilidad de las ratas del Bioterio del INCMNSZ es del 80% y de las ratas obesas del 40% (**Int J Obes (Lond). 2013 Aug 16. doi: 10.1038/ijo.2013.150**) por lo que se espera que al menos 8 ratas queden preñadas por grupo y que al menos 6 puedan ser incluidas en el estudio, por lo que se estima que al finalizar el experimento quedará una "n" de 6-8 madres por grupo. Las ratas excluidas estarán disponibles para el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio como animales fuera del protocolo.

Para este estudio, la "n" también se calculó matemáticamente (**ILAR J 2002;43:207-13**) de acuerdo al algoritmo de la prueba de porcentaje de éxito y error (por grupo/por prueba) el cual se presenta a continuación.

$$n = \log B / \log p$$

B = poder de la prueba estadística = 1-B

donde B es el poder de la prueba = (0.05)

p = proporción de animales en la colonia (evento esperado)

$$n = \frac{\log(0.05)}{\log(0.70)} = 8.39 \text{ por grupo/por prueba}$$

$$\log(0.70)$$

En cada edad postnatal de estudio (110, 450 y 650) se utilizará por camada una cría por sexo por grupo/camada. De tener de 6 a 8 madres por grupo, se tendrá un total de 18 a 24 crías por cada sexo/edad. Este número de animales ha sido previamente manejado por nuestro grupo sin problema alguno, el bioterio del Instituto nos ha ofrecido las facilidades para experimentos a largo plazo. Para este proyecto nosotros trabajaremos únicamente con las crías macho; sin embargo las hembras no se descartarán ya que serán utilizadas por otros investigadores pertenecientes al grupo de trabajo.

Cabe mencionar que los procedimientos que realizaremos en los animales de experimentación son técnicas estandarizadas y avaladas por comités de ética internos y a nivel mundial donde se establece que los niveles de angustia o dolor generados al modelo es mínimo o nulo.

Algunas de las publicaciones del grupo de trabajo son: **J Physiol. 2005;563:275-84, J Physiol. 2005;566:225-36, J Physiol. 2010;588:1791-9, Age 2014;36:9721, Int J Obes (Lond). 2014 Dec 15. doi: 10.1038/ijo.2014.209.**

D) Procedimiento de reclutamiento

La disponibilidad de los animales estará a criterio del Bioterio considerando los siguientes parámetros:

- 1.- Espacio en el área asignada

2.- Tamaño de la muestra (pie de cría)

3.- Condiciones de temperatura, humedad, ciclos horarios etc.

4.- Género y especie solicitada

5.- Edad del pie de cría

6.- Rangos de peso

E) Mecanismos de asignación del tratamiento: aleatorio

F) Grupo de tratamientos: 3

Los tres grupos experimentales se esquematizan en la siguiente figura 1, donde se muestra el tipo de dieta que las madres y las crías consumirán en el estudio:



G) Duración de seguimiento individual: El estudio materno llevara alrededor de 5 meses debido a que vamos a tener a las hembras que serán futuras madres desde su destete, gestación y lactancia. Las crías se mantendrán por un periodo de 21 meses momento en el cual será punto final del estudio. Cabe mencionar, no todas las ratas permanecerán durante todo ese tiempo, ya que se algunas de las crías serán utilizadas antes (~4 y 15 meses).

8. Metodología: Criterios de selección

A) Criterios de inclusión:

-Hembras que hayan resultado preñadas en los primeros cinco días de apareamiento

-Camadas de 10 a 14 crías

B) Criterios de exclusión:

-Hembras que **NO** hayan resultado preñadas en los primeros cinco días de apareamiento

-Camadas con menos de 10 a más de 14 crías

C) Criterios de eliminación:

En el caso de este proyecto que será a largo plazo es indispensable establecer que los criterios de punto final que para este caso serían:

-Pérdida excesiva de peso

-Piloerección

-Otitis

-Desarrollo de tumores.

9. Metodología: Desenlaces y variables

A) Variables / desenlaces principales a medir

Peso corporal, índice de adiposidad, calidad espermática, estrés oxidativo y tasa de fertilidad.

B) Variables / desenlaces secundarios a medir

Colesterol, triglicéridos, insulina, leptina, LH y testosterona. Daño al DNA y modificación de histonas como mecanismos por los cuales la obesidad paterna puede programar a su descendencia.

C) Frecuencia de las mediciones

después del nacimiento de las crías las determinaciones se harán a los 110, 450 y 650 días postnatales.

D) Criterios de éxito y falla

De acuerdo a nuestra experiencia la tasa de fertilidad de las ratas del Bioterio del INCMNSZ es del 80% y de las ratas obesas del 40% por lo que se espera que al menos 8 ratas queden preñadas por grupo y que al menos 6 puedan ser incluidas en el estudio, por lo que se estima que al finalizar el experimento quedará una "n" de 6-8 madres por grupo.

E) Estrategia de análisis estadístico

Los resultados serán analizados por ANOVA de dos vías seguido de la prueba Holm-Sidak. La tasa de fertilidad se analizará mediante la prueba de $X^2 \cdot p$

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

El presente proyecto es una continuación de nuestros estudios de intervención nutricional en la obesidad materna y representa un ejemplo de los esfuerzos por contribuir en la prevención de condiciones adversas tales como sobrepeso, obesidad y alteraciones de la fertilidad como resultado de un ambiente intrauterino adverso y su paso a futuras generaciones.

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : NINGUNO

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : NINGUNO

EFFECTOS ADVERSOS : NINGUNO

EFFECTOS PSICOLOGICOS : NINGUNO

METODOS DE SEGURIDAD : El monitoreo constante de los animales de estudio para observar la presencia de estas características que son indicativo de enfermedad: pérdida excesiva de peso, piloerección, otitis, desarrollo de tumores.

PROCEDIMIENTOS : Darle punto final a los animales enfermos.

OTRO TIPO DE RIESGO : NINGUNO

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00

Viaticos

\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

1. Zambrano E, Nathanielsz PW. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutrition reviews*. 2013;71 Suppl 1, S42-54.
2. Desai M, Beall M, Ross MG. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Current diabetes reports*. 2013;13(1), 27-33.
3. Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, et al. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr)*. 2014;36(6), 9721.
4. Rodriguez-Gonzalez GL, Vega CC, Boeck L, et al. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes (Lond)*. 2014; doi: 10.1038/ijo.2014.209.
5. Lane M, McPherson NO, Fullston T, et al. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS one*. 2014;9(7), e100832.
6. Reyes-Castro LA, Rodriguez-Gonzalez GL, Chavira R, et al. Paternal line multigenerational passage of altered risk assessment behavior in female but not male rat offspring of mothers fed a low protein diet. *Physiology & behavior*. 2015;140, 89-95.
7. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Rodriguez-Gonzalez GL, Nathanielsz PW. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 10), 1791-1799.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**