



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 06 de Octubre de 2020

No. Oficio CICUAL – 119-2020

**DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LÓPEZ**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA**  
**NUTRICIÓN**  
**P R E S E N T E**

Estimada Dra. Noriega

Este comité ha dictaminado que se RECIBE Y ACEPTA el cierre de su proyecto intitulado “EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN SAL SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ACÚMULO DE LÍPIDOS EN DIVERSOS TEJIDOS DE RATONES C57BL6 CON UN CONSUMO NORMAL Y ALTO EN LÍPIDOS” con clave CINVA-FNU-1731-15/16-1. En caso de tener alguna duda o comentario, se lo haremos saber.

Sin más por el momento quedo de usted para cualquier duda o comentario

ATENTAMENTE

**DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN**  
**COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO**  
**DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**

Ccp. MVZ. Mariela G. Contreras Escamilla- Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,  
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 [www.incmnsz.mx](http://www.incmnsz.mx)



**2020**  
**LEONA VICARIO**  
PRESIDENTA EMERITA DE LA FEMEX



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 23 de Agosto del 2020

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Coordinador del Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

**PRESENTE**

**REF: Oficio CICUAL/074/20, Proyecto: FNU-1731-15/16-1**

Estimado Dr. Barrios Payán,

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos" con registro CINVA: **FNU-1731-15/16-1**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López

ICMD, Depto. Fisiología de la Nutrición

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





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 23 de Agosto del 2020

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Coordinador del Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

PRESENTE

**Proyecto: FNU-1731-15/16-1**

Estimado Dr. Barrios Payán,

Por este conducto le envío el informe final del protocolo **“Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos”** con registro CINVA: **FNU-1731-15/16-1**.

Los productos generados son los siguientes:

a) Generación de conocimiento:

El consumo de sal en México excede la ingesta diaria recomendada (IDR) por la norma oficial mexicana para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica (NOM-030-SSA2-2009). El consumo recomendado es de <5 g/ día y en la actualidad, el consumo es de casi 11g/día. Estudios han demostrado que una alta concentración de sal afecta la función mitocondrial en el miocardio, esto de ser reflejado en otros tejidos del organismo y puede ocasionar que los lípidos se oxiden en menor cantidad y con ello se acumulen, generando un aumento del peso corporal. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue identificar si las dietas altas en sal modifican la ganancia de peso, el consumo de alimento, los parámetros bioquímicos, la tolerancia a la glucosa, la cantidad y el tipo de sustrato utilizado y finalmente, la función mitocondrial en el tejido adiposo pardo y blanco, músculo esquelético e hígado en los ratones C57BL6.

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,  
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 [www.incmnsz.mx](http://www.incmnsz.mx)



**2020**  
LEONORA VICARIO  
RECONOCIDA POR SU PAPER DE LA POSTERIA





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Los resultados de este proyecto demostraron que una dieta alta en grasa suplementada con 2% de sal disminuye el peso corporal, asociado con un aumento en el consumo de oxígeno a largo plazo indicando un mayor gasto energético. Este tipo de dieta no afectó la tolerancia a la glucosa, ni los parámetros bioquímicos, ni la abundancia de mitocondrias en el músculo esquelético. Sin embargo, existe la tendencia a incrementar el contenido de lípidos en los hígados de los ratones C57BL6.

b) Formación de recursos humanos.

Con el desarrollo de este proyecto se graduó una alumna de la licenciatura en Dietética y Nutrición de la Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE. Se adjunta la tesis elaborada con los resultados del proyecto.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López  
ICMD, Depto. Fisiología de la Nutrición

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





Estudios con Validez Oficial de conformidad con el artículo 10 de la Ley General de Educación, artículo 17 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal y Artículo 2 del Reglamento Orgánico de la Escuela de Dietética y Nutrición del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado que establecen que es competencia de la Escuela de Dietética y Nutrición planear, normar, controlar y llevar a cabo las actividades relacionadas con la formación, capacitación y actualización de recursos humanos para la salud de materias de alimentación, dietética y nutrición; inscrito en la Sección Primera del Libro 71-V a fojas 74 de Instituciones Educativas de la Dirección General de Profesiones de la Secretaría de Educación Pública.

**Efecto de una dieta alta en sal sobre el desarrollo de obesidad inducida  
por dieta en ratones C57BL6.**

*Trabajo de Titulación.*  
Que para obtener el título de  
**LICENCIADA EN DIETÉTICA Y NUTRICIÓN.**  
Presenta:

CE



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 13 de agosto de 2020.

No. Oficio CICUAL/074/20

**DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LÓPEZ**  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA  
NUTRICIÓN  
Presente.

Estimada Dra. Noriega:

En alcance al Oficio **CICUAL-150-19**, que le fue enviado el 28 de junio de 2019, en el cual se le consultó si requería prorroga del proyecto intitulado **EFEECTO DE UNA DIETA ALTA EN SAL SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ACÚMULO DE LÍPIDOS EN DIVERSOS TEJIDOS DE RATONES C57BL6 CON UN CONSUMO NORMAL Y ALTO EN LÍPIDOS**, con registro **CINVA: FNU-1731-15/16-1** por lo que, al no recibir respuesta de su parte le solicito de la manera más atenta llenar el formato de cierre (en formato institucional y con firma ) y adjunte los documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Formato de cierre
2. Informe final
3. 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

**DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN**  
COORDINADOR DEL COMITÉ INTERNO DE CUIDADO Y  
USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

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

JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C. P. 14080, Alcaldía Tlalpan,  
Ciudad de México, México. Tel. (52) 54 87 09 00 [www.incmnsz.mx](http://www.incmnsz.mx)



**2020**  
**LEONORA VICARIO**  
PROFESORA ALUMNO DE LA PATRIA





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"



ACUSE



**2019**  
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

Ciudad de México a 28 de junio de 2019.

No. Oficio CICUAL-150-19

**DRA. LILIA GUADALUPE NORIEGA LÓPEZ**  
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN  
Presente.

Estimada Dra. Noriega:

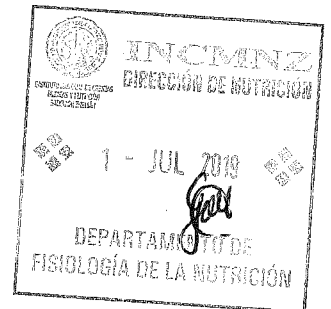
Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: **"EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN SAL SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ACÚMULO DE LÍPIDOS EN DIVERSOS TEJIDOS DE RATONES C57BL6 CON UN CONSUMO NORMAL Y ALTO EN LÍPIDOS"**, con registro FNU-1731-15/16-1 finalizó en noviembre 2016. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL 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. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. 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



Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52-55)54870900  
www.incmnsz.mx

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

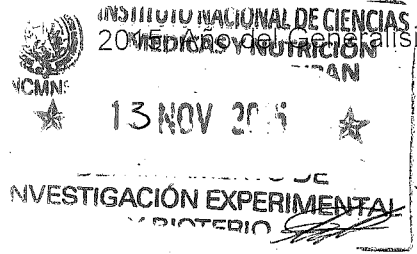
NABS/bdr



28 JUN 2019  
DMSE  
INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN INCMNSZ

Acuse

564

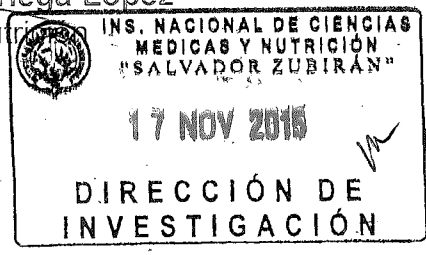


INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

20 de noviembre de 2015 Hospital "José María Morelos y Pavón"

México, D. F., a 13 de noviembre de 2015.

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López  
Depto. Fisiología de la Nutrición  
Presente.



REF: CINVA-1731 FNU-1731-15/16-1

Estimada Dra. Noriega:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos”**

Este comité ha dictaminado **APROBARLO CON UNA OBSERVACION** a partir de esta fecha.

1. Los animales producidos en el bioterio, no son animales libres de patógenos, por lo que, el término correcto que el investigador debe utilizar es que los animales se reproducirán y mantendrán de manera convencional desde el punto de vista microbiológico.

Es importante que las correcciones las hagan 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](mailto:norma.bobadillas@incmnsz.mx) y [nayelort@hotmail.com](mailto: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  
Carretera Venado Cerrado s/n, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Delegación Tlalpan, Código Postal 14080, México, Distrito Federal. I. (52)54870900. [www.incmsz.mx](http://www.incmsz.mx)

Recibi  
Lilia Noriega  
Mora





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 28 de octubre de 2015

Dra. Norma A. Bobadilla Sanjovál  
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales  
P R E S E N T E

REF: CINVA 1731, Clave: FNU-1731-15/16-1

Estimada Dra. Bobadilla,

Con respecto al Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos.”**

He realizado las modificaciones pertinentes de acuerdo a los comentarios realizados por ustedes. Estos incluyen:

- 1) En el texto del sistema Latis se ratifico que los animales se producen en el bioterio en condiciones microbiológicas libres de patógenos y para el estudio se mantendrán en el cuarto 11 en condiciones microbiológicas convencionales.
- 2) Se modifico el texto que ahora dice cama de viruta de álamo.
- 3) El medio ambiente de los ratones será enriquecido con tubos de PVC y algodón para minimizar las peleas entre ellos.
- 4) Se añadió en el sistema Latis los cuidados en la elaboración, conservación y transporte de la dieta al bioterio, los cuales incluyen: La dieta será elaborada en recipientes previamente desinfectados y el personal portará una bata limpia, guantes, cofia, y cubrebocas para disminuir el riesgo de contaminación durante la preparación. La dieta se mantendrá en un contenedor cerrado a cuatro grados y será transportada en un contenedor cerrado al bioterio.

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

*Genilda Torres*  
*Octubre*  
*2015*



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

- 5) La restricción de alimento será solo de 6 horas. Se añadió en el sistema Latis la justificación: Es necesario registrar datos en el estado de ayuno para evaluar los cambios en la utilización de sustratos en los estados metabólicos de ayuno y postprandio. También se incluyó que durante toda la prueba los animales tendrán libre acceso al agua.
- 6) Se incluyó que el isofluorano se utilizará a una concentración del 2 al 3%.
- 7) Se verificará la inconsciencia del animal mediante la ausencia de reflejo caudal, reflejo ocular, reflejo por estimulación del dolor interdigital y ausencia de movimiento de vibrisas.
- 8) En este estudio no se tomará muestra de la vena caudal, la sangre se obtendrá por exanguinación por vía porta.
- 9) Se corrigió el nombre de la norma.
- 10) Además de los procedimientos no invasivos se obtendrán diversas muestras para la evaluación de parámetros bioquímicos, expresión de genes, contenido de lípidos y mitocondrias. Por lo que es necesario repetir el estudio para asegurar la reproducibilidad de los fenómenos observados.

Dado lo anterior esperamos cumplir con el principio de las tres R establecido en la norma NOM-062-ZOO-1999 y por lo tanto esperamos vernos favorecidos con la aceptación del protocolo.

Agradeciendo de antemano la atención que se sirva dar a la presente, quedo de usted.

Atentamente,

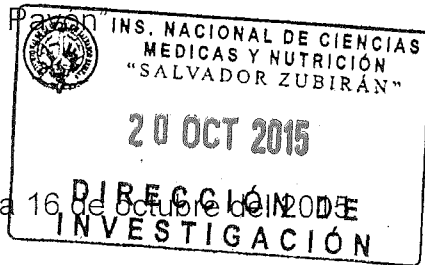
Dra. Lilia Guadalupe Noriega López  
ICMC, Depto. Fisiología de la Nutrición

*Case*



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón



México, D. F., a 16 de octubre de 2015

**Dra. Lilia Guadalupe Noriega López**  
Depto. Fisiología de la Nutrición  
Presente.

REF: CINVA-1731 FNU-1731-15/16-1

Estimada Dra. Noriega:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos.”**

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren las siguientes **Observaciones**:

1. Se requiere ratificar que los animales se producen en el bioterio, pues se menciona la procedencia y posteriormente indican la condición microbiológica desconocida de los animales.
2. En relación a la redacción debería decir cama de viruta de álamo, en lugar de cama de viruta.
3. Es recomendable debido a la conducta de los ratones cepa C57BL/6, incorporar medios de enriquecimiento para minimizar las peleas entre ellos.
4. Se recomienda mencionar los cuidados en la elaboración, conservación y transporte de la dieta al bioterio para minimizar su posible contaminación y que pueda afectar la salud de los ratones.
5. Es necesario puntualizar y justificar la restricción del alimento por 24 horas en la caja metabólica, en relación a las pruebas de evaluación del gasto energético se omite que tendrán agua de bebida los ratones.
6. Como método de anestesia para la exanguinación se menciona que se utilizará isoflurano, es necesario mencionar el porcentaje a usar de este gas: del 2 al 3%.
7. En el punto 12 del formato rápido se indica que no aplica, sin embargo se utilizará anestesia y deberá constarse los signos de inconciencia del ratón. A este respecto deberán describirse estos signos en el rubro correspondiente.

Avenida Vasco de Quiroga No. 23  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx

*Laura Zavala*



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



19 OCT 2015

INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
Y BIOTERIO

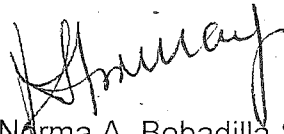
537  
13:16

8. Es importante mencionar el volumen de sangre que se tomará a cada ratón, realizando una pequeña incisión a la vena caudal.
9. Se menciona que los animales se manejarán de acuerdo a la NOM-062-ZOO-2001. Se investigó acerca de ella y solo se menciona que es una corrección en el punto 5.4.4.1 con respecto a la cuarentena de los animales de laboratorio; donde existe un error ortográfico y fue corregido posteriormente. La correcta es NOM-062-ZOO-1999.
10. En el cálculo de la muestra se menciona que con 5 ratones es suficiente, sin embargo se pretende hacer duplicados por grupo. ¿Realmente es necesario realizar duplicados en un estudio donde no se harán procedimientos invasivos en los sujetos experimentales durante los tres meses que durará el estudio?

Es importante que las correcciones las hagan 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](mailto:norma.bobadillas@incmnsz.mx) y [nayelort@hotmail.com](mailto: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

NAB/nom





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

No. CINVA:

FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo: 30 de Septiembre de 2015.

Título del Protocolo:

Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos.

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

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Lilia Guadalupe Noriega López
Institución de Adscripción	INCMNSZ
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	54870900 ext 2809
Correo electrónico	[REDACTED]

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dr. Armando Tovar	INCMNSZ	Doctor	Ext. 2802	[REDACTED]
Dra. Adriana López	INCMNSZ	Doctor	Ext. 2802	[REDACTED]

Estudiante				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
[REDACTED] CE	EDN	Licenciado	Ext. 2802	[REDACTED]

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	15	Noviembre	2015
Fecha tentativa de finalización.	14	Noviembre	2016

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 el efecto del consumo de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el metabolismo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con una dieta normal y una dieta alta en grasa.

#### Objetivos particulares:

1. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> en ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
2. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la composición corporal en ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
3. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma) de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
4. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el contenido de lípidos en hígados y riñones de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
5. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el peso del tejido adiposo blanco de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
6. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la cantidad de mitocondrias presentes en el músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
7. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el gen nuclear (gen hexocinasa 2) y mitocondrial (COX-2 y 16-S) en el tejido adiposo pardo y músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

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

Hasta el momento se sabe que las dietas altas en sal tienen un efecto negativo sobre la salud de los seres humanos, alterando la capacidad endotelial para su contracción y permeabilidad, lo que lleva a padecer hipertensión arterial e incluso la aparición de algunos tipos de cáncer. Las dietas altas en sodio, también están relacionadas con la ganancia de peso (sobrepeso y obesidad) y se conoce que hay un vínculo entre el peso corporal de las personas y la ingesta de alimentos ricos en sodio.

Sin embargo, no se sabe en concreto si las dietas altas en sal afectan la función mitocondrial en un organismo *in vivo* y si esto tiene consecuencias en el metabolismo de los lípidos. El desarrollo del presente trabajo permitirá conocer si el consumo de una dieta alta en sal modifica la función mitocondrial, afectando especialmente el metabolismo de lípidos y por lo tanto, la obtención de energía mediante la cadena respiratoria en la mitocondria.

Tomando en cuenta que México es un país en el cual el consumo de sodio es muy elevado y la dieta suele ser alta en lípidos, este estudio puede generar datos sobre las posibles causas y efectos que pueden existir en el deterioro de la salud debido a este tipo de alimentación. Por lo tanto, se podrá promover aún más la importancia del consumo adecuado de sal a la par de una dieta equilibrada y adecuada para cada tipo de persona de acuerdo a su edad, sexo y actividades diarias, para prevenir enfermedades y/o complicaciones en la salud del individuo.



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

En esta investigación, tendremos a 4 grupos de ratones C57BL6 con dietas distintas, cada uno de ellos compuesto por 10 ratones adultos de 8 semanas de edad. El grupo 1 tendrá una dieta control (*AIN-93M*), el grupo 2 tendrá la misma dieta control suplementada con 0.26% de Sal, el grupo 3 tendrá una Dieta Alta en Lípidos y por último, el grupo 4 tendrá una Dieta Alta en Lípidos suplementada con 0.26% de Sal.

Estas dietas se le suministrarán durante 3 meses. Semanalmente se les medirá en consumo de agua y el peso corporal, dos veces a la semana se medirá el consumo de alimento. Mensualmente se les realizará una calorimetría indirecta y una resonancia magnética. La medición de la glucosa, colesterol y triglicéridos, se medirán en plasma a los 3 meses. Al momento de realizar la eutanasia, se registrará el peso del hígado, riñones, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco y músculo esquelético y se mantendrán a -70°C para determinaciones posteriores.

Se realizará la cuantificación de lípidos en el hígado y los riñones. Se obtendrá en RNA total del tejido adiposo pardo para medir la expresión del gen nuclear (gen hexosinasa 2) y mitocondrial (COX-2 y 16-S). Se realizará una tinción con SDH (Succinato deshidrogenasa) para confirmar la cantidad de mitocondrias en el músculo esquelético y también RT – PCR para identificar los genes antes mencionados.

Todos los animales provendrán del laboratorio Harlan. Estos animales se encuentran en condiciones microbiológicas convencionales (animal con flora microbiológica desconocida, sin signos aparentes de enfermedad). Este proyecto no presenta ningún riesgo biológico para el personal que maneja a los animales. El destino final de todos los animales al término de los experimentos es la eutanasia.

#### 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





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

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](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

Categoría:	A:	B: XXX	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", remplazo, 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>

El Cálculo del número de muestra (n) se realizó según la ecuación para muestras independientes:  $n \geq 2S^2(Z\alpha + Z\beta)^2 / \Delta^2$ . En donde: S=Desviación estándar. Se utilizaron datos obtenidos en un estudio usando el peso corporal de ratas control y alimentadas con una dieta alta en grasa con un valor de  $\pm 31g$ .  $\Delta$ = Diferencia mínima en el peso corporal entre los grupos control y alimentados con una dieta alta en grasa con un valor de 64g.  $\alpha=0.05$  (Tasa de error),  $\beta=0.8=80\%$  (Poder de la prueba),  $Z\alpha + Z\beta = 1.96 + 0.84$  (Constantes). Por lo tanto,  $n \geq 2(31)^2(1.96 + 0.84)^2 / (64)^2$ ,  $n \geq 3.7$ . Con base en lo anterior se necesita utilizar un número promedio de 4 ratones por grupo + 20% por las pérdidas  $n=5$  ratones por grupo y el experimento se realizará por duplicado. El número total de animales es de 40.

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

Al término de los tratamientos los ratones serán transportados al departamento de Fisiología de la Nutrición en los microaisladores en los que normalmente son alojados.

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

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón C57BL6	40	20-25g	8 semanas.	Machos.
No. de Grupos experimentales:	4			
No. de animales por grupo:	10			
No. TOTAL DE ANIMALES:	40			

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

Los animales en tratamiento permanecerán 90 días con los diferentes tipos de dietas antes mencionadas.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.



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

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.		X	1.- Suplementación del alimento 2 veces por semana durante 90 días. Dejándoles alrededor de 100g de dieta en cada grupo. 2.- Suplementación de 300 mL de agua cada 8 días. 3. Restricción de la dieta por 6 horas durante la calorimetría y de 8 horas previo a la eutanasia.
Toma de muestras biológicas.		X	Muestra de sangre por una pequeña incisión en la cola después de los 90 días con el alimento. Recolección de orina con ayuda de las jaulas metabólicas.
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	Durante 5 minutos en un tubo de 7 cm de diámetro para realizar la resonancia. Durante 24 horas en una jaula metabólica.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones.	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos.	X		
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.

**Modelo Animal:** Se utilizarán ratones de la cepa C57BL6. Estos ratones se mantendrán durante 90 días en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los procedimientos con animales se realizarán de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-2001 que regula el uso de animales de laboratorio. Todos los estudios se repetirán para asegurar la reproducibilidad.

**Alimentación:** Se utilizarán 40 ratones C57BL6 macho de 8 semanas de edad, los cuales serán mantenidos en el cuarto 11 del bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 será de 40 a 70%. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de



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

no más de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua. Los ratones se dividirán en 4 grupos, El grupo 1 tendrá una dieta control (*AIN-93M*), el grupo 2 tendrá la misma dieta suplementada con 0.26% de sal (*AIN-93M + 0.26% Sal*), el grupo 3 tendrá una Dieta Alta en Lípidos y por último, el grupo 4 tendrá una Dieta Alta en Lípidos suplementada con 0.26% de sal. El contenido de sal para las dietas altas en sodio será el doble del contenido normal de las dietas asemejando lo que pasa en la población mexicana que actualmente consume el doble de lo establecido por la norma.

La dieta será administrada por 90 días ya que ha sido reportado que en este tiempo es cuando se empiezan a ver más cambios en los ratones. De cualquier forma el consumo de alimento y agua serán monitoreados para asegurar la ausencia de toxicidad. Todas las dietas se administrarán de manera sólida de acuerdo a la *AIN-93M* y sólo se harán algunas modificaciones (añadirles sal y manteca según el caso). La dieta control estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina y 0.013 g de TBHQ. La dieta H.F. estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 170 g de manteca. La dieta control + Sal estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 2.6 g de sal marca La Fina. La dieta H.F. + Sal estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ, 170 g de manteca y 2.6 g de sal marca La Fina. Al término del estudio, los ratones serán colocados en una caja metabólica para determinar el consumo de agua y la secreción de electrolitos urinarios en un periodo de 24 horas.

**Evaluación del gasto energético:** El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta usando el equipo Oxymax de Columbus Instrumens. Los animales serán colocados en una cámara con un flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO<sub>2</sub> serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de oxígeno y el coeficiente de respiración (RQ). Los animales se colocan de 32 a 48 horas en la cámara, las lecturas de las primeras 12 horas corresponden al periodo de adaptación y las lecturas posteriores son utilizadas para el análisis. Los animales se colocan con alimento ad libitum a excepción de un periodo de 6 horas (de 11 a 17h) para registrar lecturas en el estado de ayuno.

**Evaluación de la composición corporal:** La composición corporal de los ratones será evaluado utilizando un equipo de resonancia magnética EchoMRI. Los animales despiertos serán colocados en un tubo con el tamaño adecuado, el cual se introduce en el equipo. El equipo emite una radiofrecuencia a cierta secuencia y el software del equipo registra el espectro de cada ratón por 47 segundos. Se realizan tres escaneos independientes y los datos generados son registrados en una base de datos. Los datos obtenidos se expresan como masa magra, masa grasa, y fluidos libres. La lectura toma cinco minutos por ratón.

**Obtención de muestras y tejidos:**

Se practicará eutanasia mediante la exanguinación por vía porta previa anestesia con isoflurano. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO 1999, los anestésicos inhalables inducen rápidamente la inconsciencia y no afectan las mediciones posteriores. La posterior exanguinación se llevará a cabo una vez que se haya cerciorado de la real inconsciencia del animal. Así se obtendrán tejidos que no tengan contaminación química que alteren los resultados de nuestras determinaciones así como un volumen adecuado de sangre para la determinación de diferentes parámetros químicos, ya que según la norma mencionada es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libres de contaminación química y/o tejido cerebral integro. De esta manera, una vez realizadas las pruebas fisiológicas, los animales serán sometidos a un ayuno de 8 horas para la eutanasia. Se obtendrá el volumen total de sangre, del cual se separará el suero por centrifugación y se almacenará a -80°C para futuras



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

determinaciones. Posteriormente, se obtendrán muestras de hígado, riñones, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco y músculo esquelético mediante una escisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C para su posterior análisis, el cual incluye expresión génica por RT-PCR y determinación de mitocondrias por la tinción SDH.

En las muestras obtenidas se realizarán los estudios siguientes:

### 1. Perfil bioquímico:

Se evaluará la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero utilizando ensayos enzimáticos-colorimétricos (Cobas C111, Roche).

### 2. Contenido lipídico en hígado y riñones:

Se extraerán los lípidos totales de acuerdo al método de Folch, el cual se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogenizado en una solución solvente que al añadir agua y centrifugar forma dos fases. En la fase acuosa se encuentran los compuestos hidrofílicos y en la superior se encuentra la fase orgánica que contiene los lípidos. Se evapora para concentrar el contenido de lípidos en el fondo del tubo. La pastilla lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10%. Finalmente, se determina la concentración de triglicéridos en el extracto por los métodos anteriormente mencionados.

### 3. Expresión génica en tejido adiposo pardo y músculo esquelético:

Se identificarán los genes COX-2 y 16 S mitocondrial, así como el gen hexosinasa 2 nuclear mediante PCR en tiempo real, el cual es una prueba de alta sensibilidad que se utiliza para determinar cuantitativamente la cantidad inicial de ácidos nucleicos. Se amplifica un fragmento de ADN y así se determina la cantidad exacta de ADN, presente en la solución estudiada después de cada ciclo. Se llama en tiempo real porque la cantidad de ADN amplificado se determina a medida que la reacción se produce. Se puede combinar con PCR de Transcripción inversa para medir la cantidad de RNA mensajero. Esta amplificación selectiva requiere de 2 oligonucleótidos cebadores (*primers*) de alrededor de 15 – 25 pares de bases. Los *primers* son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que se va a amplificar. Durante el PCR, las moléculas de ADN de cadena doble se desnaturalizan, cada cadena sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, y luego se renaturalizan (se unen nuevamente) con una cadena complementaria. El PCR es una reacción en cadena de 25 – 35 ciclos, los cuales involucran 3 reacciones controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, dura alrededor de 1 a 5 min. Esta técnica utiliza reporteros fluorescentes. Esta fluorescencia es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, cuando está en solución sin unirse al ADN de doble cadena, no emite fluorescencia, pero cuando se une al ADN, incrementa hasta mil veces su fluorescencia.

### Cantidad de mitocondrias en músculo esquelético:

Se identificarán las mitocondrias mediante la tinción SDH (Succinato deshidrogenasa), la cual es una tinción oxidativa sensible y específica en patología mitocondrial. Tiñe el acúmulo de mitocondrias a nivel Subsarcolemal. La tinción SDH es una técnica EHQ (enzimohistoquímica), cuyo sustrato es el Succinato sódico, con un pH de 7.4, su captador de color es el NBT (Nitroblue tetrazolium) y su solución tampón es el tampón fosfato. Su función es valorar la actividad mitocondrial en el complejo II de la respiración mitocondrial y la diferenciación de las fibras musculares. La SDH utiliza NADH como un receptor de electrones para reaccionar con Nitrato Azul Tetrazolio (NBT), una sal de color púrpura. Esta reacción produce una tinción granular de las mitocondrias que refleja la abundancia de las mitocondrias y la actividad de la SDH. Cuanto mayor sea la actividad de la SDH en el músculo (y por lo tanto las mitocondrias), mayor será la intensidad de la tinción SDH en las fibras musculares. Generalmente las fibras musculares de contracción lenta, tienden a oxidar más, por lo que tendrán una tinción púrpura más densa. Por lo que este análisis histoquímico, refleja la capacidad oxidativa relativa de las fibras musculares



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

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia

12) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?  
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<sup>(\*)</sup>
- 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"?



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

### Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en qué 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 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](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf)

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

Exanguinación por vía porta previa anestesia con isoflurano.

Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	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



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

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/bmb15/BMBL5\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf)

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

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.

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López  
Nombre y firma del Investigador Responsable

	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	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



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

No. CINVA:

FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo: 30 de Septiembre de 2015.

Título del Protocolo:

Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos.

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

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Lilia Guadalupe Noriega López
Institución de Adscripción	INCMNSZ
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	54870900 ext 2809
Correo electrónico	

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Dr. Armando Tovar	INCMNSZ	Doctor	Ext. 2802	
Dra. Adriana López	INCMNSZ	Doctor	Ext. 2802	

Estudiante				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	EDN	Licenciado	Ext. 2802	

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	15	Noviembre	2015
Fecha tentativa de finalización.	14	Noviembre	2016

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 el efecto del consumo de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el metabolismo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con una dieta normal y una dieta alta en grasa.

#### Objetivos particulares:

1. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> en ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
2. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la composición corporal en ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
3. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma) de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
4. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el contenido de lípidos en hígados y riñones de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
5. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el peso del tejido adiposo blanco de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
6. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la cantidad de mitocondrias presentes en el músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.
7. Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el gen nuclear (gen hexocinasa 2) y mitocondrial (COX-2 y 16-S) en el tejido adiposo pardo y músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

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

Hasta el momento se sabe que las dietas altas en sal tienen un efecto negativo sobre la salud de los seres humanos, alterando la capacidad endotelial para su contracción y permeabilidad, lo que lleva a padecer hipertensión arterial e incluso la aparición de algunos tipos de cáncer. Las dietas altas en sodio, también están relacionadas con la ganancia de peso (sobrepeso y obesidad) y se conoce que hay un vínculo entre el peso corporal de las personas y la ingesta de alimentos ricos en sodio.

Sin embargo, no se sabe en concreto si las dietas altas en sal afectan la función mitocondrial en un organismo *in vivo* y si esto tiene consecuencias en el metabolismo de los lípidos. El desarrollo del presente trabajo permitirá conocer si el consumo de una dieta alta en sal modifica la función mitocondrial, afectando especialmente el metabolismo de lípidos y por lo tanto, la obtención de energía mediante la cadena respiratoria en la mitocondria.

Tomando en cuenta que México es un país en el cual el consumo de sodio es muy elevado y la dieta suele ser alta en lípidos, este estudio puede generar datos sobre las posibles causas y efectos que pueden existir en el deterioro de la salud debido a este tipo de alimentación. Por lo tanto, se podrá promover aún más la importancia del consumo adecuado de sal a la par de una dieta equilibrada y adecuada para cada tipo de persona de acuerdo a su edad, sexo y actividades diarias, para prevenir enfermedades y/o complicaciones en la salud del individuo.



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

En esta investigación, tendremos a 4 grupos de ratones C57BL6 con dietas distintas, cada uno de ellos compuesto por 10 ratones adultos de 8 semanas de edad. El grupo 1 tendrá una dieta control (*AIN-93M*), el grupo 2 tendrá la misma dieta control suplementada con *0.26% de Sal*, el grupo 3 tendrá una Dieta Alta en Lípidos y por último, el grupo 4 tendrá una Dieta Alta en Lípidos suplementada con *0.26% de Sal*.

Estas dietas se le suministrarán durante 3 meses. Semanalmente se les medirá en consumo de agua y el peso corporal, dos veces a la semana se medirá el consumo de alimento. Mensualmente se les realizará una calorimetría indirecta y una resonancia magnética. La medición de la glucosa, colesterol y triglicéridos, se medirán en plasma a los 3 meses. Al momento de realizar la eutanasia, se registrará el peso del hígado, riñones, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco y músculo esquelético y se mantendrán a  $-70^{\circ}\text{C}$  para determinaciones posteriores.

Se realizará la cuantificación de lípidos en el hígado y los riñones. Se obtendrá en RNA total del tejido adiposo pardo para medir la expresión del gen nuclear (gen hexosinasa 2) y mitocondrial (COX-2 y 16-S). Se realizará una tinción con SDH (Succinato deshidrogenasa) para confirmar la cantidad de mitocondrias en el músculo esquelético y también RT - PCR para identificar los genes antes mencionados.

Todos los animales provendrán del laboratorio Harlan. Estos animales se encuentran en condiciones microbiológicas convencionales (animal con flora microbiológica desconocida, sin signos aparentes de enfermedad). Este proyecto no presenta ningún riesgo biológico para el personal que maneja a los animales. El destino final de todos los animales al término de los experimentos es la eutanasia.

#### 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



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

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](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

Categoría:	A:	B: XXX	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", remplazo, 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>

El Cálculo del número de muestra (n) se realizó según la ecuación para muestras independientes:  $n \geq 2S^2(Z\alpha + Z\beta)^2 / \Delta^2$ . En donde: S=Desviación estándar. Se utilizaron datos obtenidos en un estudio usando el peso corporal de ratas control y alimentados con una dieta alta en grasa con un valor de  $\pm 31g$ .  $\Delta$ = Diferencia mínima en el peso corporal entre los grupos control y alimentados con una dieta alta en grasa con un valor de 64g.  $\alpha=0.05$  (Tasa de error),  $\beta=0.8=80\%$  (Poder de la prueba),  $Z\alpha + Z\beta = 1.96 + 0.84$  (Constantes). Por lo tanto,  $n \geq 2(31)^2(1.96 + 0.84)^2 / (64)^2$ ,  $n \geq 3.7$ . Con base en lo anterior se necesita utilizar un número promedio de 4 ratones por grupo + 20% por las pérdidas n=5 ratones por grupo y el experimento se realizará por duplicado. El número total de animales es de 40.

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

Al término de los tratamientos los ratones serán transportados al departamento de Fisiología de la Nutrición en los microaisladores en los que normalmente son alojados.

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

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón C57BL6	40	20-25g	8 semanas.	Machos.
No. de Grupos experimentales:	4			
No. de animales por grupo:	10			
No. TOTAL DE ANIMALES:	40			

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

Los animales en tratamiento permanecerán 90 días con los diferentes tipos de dietas antes mencionadas.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.



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

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.		X	1.- Suplementación del alimento 2 veces por semana durante 90 días. Dejándoles alrededor de 100g de dieta en cada grupo. 2.- Suplementación de 300 mL de agua cada 8 días. 3. Restricción de la dieta por 6 horas durante la calorimetría y de 8 horas previo a la eutanasia.
Toma de muestras biológicas.		X	Muestra de sangre por una pequeña incisión en la cola después de los 90 días con el alimento. Recolección de orina con ayuda de las jaulas metabólicas.
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	Durante 5 minutos en un tubo de 7 cm de diámetro para realizar la resonancia. Durante 24 horas en una jaula metabólica.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones.	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos.	X		
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.

**Modelo Animal:** Se utilizarán ratones de la cepa C57BL6. Estos ratones se mantendrán durante 90 días en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los procedimientos con animales se realizarán de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-2001 que regula el uso de animales de laboratorio. Todos los estudios se repetirán para asegurar la reproducibilidad.

**Alimentación:** Se utilizarán 40 ratones C57BL6 macho de 8 semanas de edad, los cuales serán mantenidos en el cuarto 11 del bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 será de 40 a 70%. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de



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

no más de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua. Los ratones se dividirán en 4 grupos, El grupo 1 tendrá una dieta control (AIN-93M), el grupo 2 tendrá la misma dieta suplementada con 0.26% de sal (AIN-93M + 0.26% Sal), el grupo 3 tendrá una Dieta Alta en Lípidos y por último, el grupo 4 tendrá una Dieta Alta en Lípidos suplementada con 0.26% de sal. El contenido de sal para las dietas altas en sodio será el doble del contenido normal de las dietas asemejando lo que pasó en la población mexicana que actualmente consume el doble de lo establecido por la norma.

La dieta será administrada por 90 días ya que ha sido reportado que en este tiempo es cuando se empiezan a ver más cambios en los ratones. De cualquier forma el consumo de alimento y agua serán monitoreados para asegurar la ausencia de toxicidad. Todas las dietas se administrarán de manera sólida de acuerdo a la AIN-93M y sólo se harán algunas modificaciones (añadirles sal y manteca según el caso). La dieta control estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina y 0.013 g de TBHQ. La dieta H.F. estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 170 g de manteca. La dieta control + Sal estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 2.6 g de sal marca La Fina. La dieta H.F. + Sal estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ, 170 g de manteca y 2.6 g de sal marca La Fina. Al término del estudio, los ratones serán colocados en una caja metabólica para determinar el consumo de agua y la secreción de electrolitos urinarios en un periodo de 24 horas.

**Evaluación del gasto energético:** El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta usando el equipo Oxymax de Columbus Instrumens. Los animales serán colocados en una cámara con un flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO<sub>2</sub> serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de oxígeno y el coeficiente de respiración (RQ). Los animales se colocan de 32 a 48 horas en la cámara, las lecturas de las primeras 12 horas corresponden al periodo de adaptación y las lecturas posteriores son utilizadas para el análisis. Los animales se colocan con alimento ad libitum a excepción de un periodo de 6 horas (de 11 a 17h) para registrar lecturas en el estado de ayuno.

**Evaluación de la composición corporal:** La composición corporal de los ratones será evaluado utilizando un equipo de resonancia magnética EchoMRI. Los animales despiertos serán colocados en un tubo con el tamaño adecuado, el cual se introducido en el equipo. El equipo emite una radiofrecuencia a cierta secuencia y el software del equipo registra el espectro de cada ratón por 47 segundos. Se realizan tres escaneos independientes y los datos generados son registrados en una base de datos. Los datos obtenidos se expresan como masa magra, masa grasa, y fluidos libres. La lectura toma cinco minutos por ratón.

### Obtención de muestras y tejidos:

Se practicará eutanasia mediante la exanguinación por vía porta previa anestesia con isoflurano. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO 1999, los anestésicos inhalables inducen rápidamente la inconsciencia y no afectan las mediciones posteriores. La posterior exanguinación se llevará a cabo una vez que se haya cerciorado de la real inconsciencia del animal. Así se obtendrán tejidos que no tengan contaminación química que alteren los resultados de nuestras determinaciones así como un volumen adecuado de sangre para la determinación de diferentes parámetros químicos, ya que según la norma mencionada es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libres de contaminación química y/o tejido cerebral íntegro. De esta manera, una vez realizadas las pruebas fisiológicas, los animales serán sometidos a un ayuno de 8 horas para la eutanasia. Se obtendrá el volumen total de sangre, del cual se separará el suero por centrifugación y se almacenará a -80°C para futuras



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

determinaciones. Posteriormente, se obtendrán muestras de hígado, riñones, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco y músculo esquelético mediante una escisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis, el cual incluye expresión génica por RT-PCR y determinación de mitocondrias por la tinción SDH.

En las muestras obtenidas se realizarán los estudios siguientes:

### 1. Perfil bioquímico:

Se evaluará la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero utilizando ensayos enzimáticos-colorimétricos, (Cobas C111, Roche).

### 2. Contenido lipídico en hígado y riñones:

Se extraerán los lípidos totales de acuerdo al método de Folch, el cual se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogenizado en una solución solvente que al añadir agua y centrifugar forma dos fases. En la fase acuosa se encuentran los compuestos hidrofílicos y en la superior se encuentra la fase orgánica que contiene los lípidos. Se evapora para concentrar el contenido de lípidos en el fondo del tubo. La pastilla lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10%. Finalmente, se determina la concentración de triglicéridos en el extracto por los métodos anteriormente mencionados.

### 3. Expresión génica en tejido adiposo pardo y músculo esquelético:

Se identificarán los genes COX-2 y 16 S mitocondrial, así como el gen hexosinasa 2 nuclear mediante PCR en tiempo real, el cual es una prueba de alta sensibilidad que se utiliza para determinar cuantitativamente la cantidad inicial de ácidos nucleicos. Se amplifica un fragmento de ADN y así se determina la cantidad exacta de ADN, presente en la solución estudiada después de cada ciclo. Se llama en tiempo real porque la cantidad de ADN amplificado se determina a medida que la reacción se produce. Se puede combinar con PCR de Transcripción inversa para medir la cantidad de RNA mensajero. Esta amplificación selectiva requiere de 2 oligonucleótidos cebadores (*primers*) de alrededor de 15–25 pares de bases. Los *primers* son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que se va a amplificar. Durante el PCR, las moléculas de ADN de cadena doble se desnaturalizan, cada cadena sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, y luego se renaturalizan (se unen nuevamente) con una cadena complementaria. El PCR es una reacción en cadena de 25–35 ciclos, los cuales involucran 3 reacciones controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, dura alrededor de 1 a 5 min. Esta técnica utiliza reporteros fluorescentes. Esta fluorescencia es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, cuando está en solución sin unirse al ADN de doble cadena, no emite fluorescencia, pero cuando se une al ADN, incrementa hasta mil veces su fluorescencia.

### Cantidad de mitocondrias en músculo esquelético:

Se identificarán las mitocondrias mediante la tinción SDH (Succinato deshidrogenasa), la cual es una tinción oxidativa sensible y específica en patología mitocondrial. Tiñe el acúmulo de mitocondrias a nivel Subsarcolemal. La tinción SDH es una técnica EHQ (enzimohistoquímica), cuyo sustrato es el Succinato sódico, con un pH de 7.4, su captador de color es el NBT (Nitroblue tetrazolium) y su solución tampón es el tampón fosfato. Su función es valorar la actividad mitocondrial en el complejo II de la respiración mitocondrial y la diferenciación de las fibras musculares. La SDH utiliza NADH como un receptor de electrones para reaccionar con Nitro Azul Tetrazolio (NBT), una sal de color púrpura. Esta reacción produce una tinción granular de las mitocondrias que refleja la abundancia de las mitocondrias y la actividad de la SDH. Cuanto mayor sea la actividad de la SDH en el músculo (y por lo tanto las mitocondrias), mayor será la intensidad de la tinción SDH en las fibras musculares. Generalmente las fibras musculares de contracción lenta, tienden a oxidar más, por lo que tendrán una tinción púrpura más densa. Por lo que este análisis histoquímico, refleja la capacidad oxidativa relativa de las fibras musculares



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

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia

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

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"?



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

### Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en qué 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. Substancial > 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 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](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf)

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

Exanguinación por vía porta previa anestesia con isoflurano.

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO <sub>2</sub>	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO <sub>2</sub>	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





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

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/bmb15/BMB15\\_sect\\_V.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMB15_sect_V.pdf)

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

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.

Dra. Lilia Guadalupe Noriega López  
Nombre y firma del Investigador Responsable

	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	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



*Sistema Integral*



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

Folio del registro: FNU-1731-15/16-1

Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006\_comites\_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

**(0) Comentarios**

**Título del proyecto:** Efecto de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el acúmulo de lípidos en diversos tejidos en ratones C57BL6 con un consumo normal y alto en lípidos

**Tipo de proyecto:** Otros

**Antecedentes:** Actualmente, existe un consumo excesivo de sal en la población mexicana, el cual se encuentra en más de 11 g/d ya que es muy común añadir sal a los alimentos, incluso sin probarlos. El alto consumo de sal ha sido ampliamente relacionado con un aumento en la incidencia de hipertensión arterial, ocasionando un importante problema de salud pública. Actualmente 5 de cada 10 mexicanos padecen hipertensión arterial y reducir el consumo de sal es el factor modificable más sencillo para prevenir este padecimiento. Para prevenir este problema, la norma oficial mexicana para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica (NOM-030-SSA2-2009), indica reducir el consumo de sal a <5 g/día (2,000 mg de sodio). Sin embargo, el consumo de dietas elevadas en sal se han asociado recientemente con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y obesidad por lo que es importante considerar que esta norma tal vez deba aplicarse para la población en general. Un estudio realizado por Beatriz Nava y cols. determinaron la asociación entre la excreción de sodio urinario en 24h, como medida indirecta del consumo de sal, y la presencia de sobrepeso y obesidad, en una muestra representativa de adultos españoles (418 personas en total, de los cuales 196 eran hombres y 222 eran mujeres). Interesantemente, las personas por arriba del percentil 50 con la mayor excreción de sodio urinario presentaron una incidencia del 18.6% de obesidad, mientras que las personas por abajo del percentil 50 presentaron una incidencia significativamente menor (8.8%). Además, las personas que tuvieron mayor consumo de sal también consumieron más energía y tuvieron peores hábitos alimenticios. Sin embargo, a la fecha se desconoce cómo el alto consumo de sal puede aumentar el desarrollo de obesidad.

El sodio regula varios procesos fisiológicos incluyendo la función mitocondrial. En la mitocondria existe un balance de protones y electrolitos para asegurar su función adecuada. Algunos estudios en miocitos cardiacos indican que el sodio de la matriz mitocondrial es inferior al del citosol y que la inhibición metabólica puede provocar un incremento de sodio en la matriz. El principal mecanismo de salida de sodio mitocondrial es por el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , por lo que la salida de sodio mitocondrial es importante para mantener la concentración de protones en la matriz mitocondrial, asegurando un pH más alcalino que en el citosol. Se sabe que si el pH de la mitocondria aumenta,

se puede incrementar la salida de sodio de la mitocondria, sin embargo se desconoce si alteraciones en las concentraciones de sodio afectan la concentración de protones mitocondrial y con ello su función. Por otro lado, también existe en la mitocondria un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . El intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es el principal regulador del calcio en la matriz mitocondrial. El intercambio de calcio en la matriz activa las deshidrogenasas mitocondriales y así se regula la generación de NADH (sustrato principal y fuente de electrones para la cadena transportadora de electrones). Estos resultados sugieren que alteraciones en la concentración de sodio podrían afectar la concentración de calcio intracelular y por ende la cadena respiratoria en la mitocondria. Un estudio realizado por Takeshi Iwai y cols. apoya esta hipótesis. Los autores utilizaron corazones de ratas Wistar a los que se les hizo una perfusión de Propranolol a diferentes concentraciones como cardioprotector contra la isquemia cardiaca, ya que mejora el flujo sanguíneo. Aunado a este tratamiento se les hizo una perfusión alta en sodio y evaluaron la función mitocondrial determinando el consumo de oxígeno en los estadios 3 y 4 de la respiración. Observaron que durante la reperfusión, a mayor cantidad de Propranolol, mayor es la cantidad de oxígeno consumido, debido a que no se bloquean los estadios 3 y 4 de la respiración mitocondrial. De manera muy interesante, observaron que al aumentar la cantidad de sodio el consumo de oxígeno disminuyo significativamente, específicamente afectando el estadio 3 de la respiración mitocondrial. Estos resultados indican que un mayor concentración de sodio puede disminuir la cadena respiratoria y por tanto la oxidación de sustratos.

Los estudios anteriores son *in vitro* y no se sabe si el alto consumo de sal puede modificar la función mitocondrial en un organismo *in vivo*. De ser así, tendría altas repercusiones ya que la mitocondria es el organelo celular en el que se llevan a cabo la mayor parte de las reacciones del metabolismo de lípidos, al disminuir la cadena respiratoria los lípidos no pueden ser oxidados y se acumulan en diversos tejidos. De hecho, la disfunción mitocondrial es uno de los principales responsables del desarrollo de obesidad.

#### Definición del problema:

El alto consumo de sal está relacionado con una mayor incidencia de obesidad. Sin embargo, a la fecha se desconoce cómo el alto consumo de sal puede aumentar el desarrollo de obesidad. Altas concentraciones de sodio disminuyen la cadena respiratoria en un modelo *in vitro*, esto puede provocar una menor oxidación de lípidos, provocando que éstos se acumulen y haya ganancia de peso en un modelo animal. El desarrollo de este proyecto nos permitirá establecer si un aumento en el consumo de sal afecta la función mitocondrial reflejándose en una menor oxidación de lípidos y por ende en una mayor acumulación de estos en los diversos tejidos de ratones C57B6.

#### Justificación:

Hasta el momento se sabe que las dietas altas en sal tienen un efecto negativo sobre la salud de los seres humanos, alterando la capacidad endotelial para su contracción y permeabilidad, lo que lleva a padecer hipertensión arterial e incluso la aparición de algunos tipos de cáncer. Las dietas altas en sodio, también están relacionadas con la ganancia de peso (sobrepeso y obesidad) y se conoce que hay un vínculo entre el peso corporal de las personas y la ingesta de alimentos ricos en sodio.

Sin embargo, no se sabe en concreto si las dietas altas en sal afectan la función mitocondrial en un organismo y si esto tiene consecuencias en el metabolismo de los lípidos. El desarrollo del presente trabajo permitirá conocer si el consumo de una dieta alta en sal modifica la función mitocondrial, afectando especialmente el metabolismo de lípidos y por lo tanto, la obtención de energía mediante la cadena respiratoria en la mitocondria.

Tomando en cuenta que México es un país en el cual el consumo de sodio es muy elevado y la dieta suele ser alta en lípidos, este estudio puede generar datos sobre las posibles causas y efectos que pueden existir en el deterioro de la salud debido a este tipo de alimentación. Por lo tanto, se podrá promover la importancia de un consumo adecuado de sal a la par de una dieta equilibrada y adecuada para cada tipo de persona de acuerdo a su edad, sexo y actividades diarias, para prevenir enfermedades y/o complicaciones en la salud del individuo.

**Hipótesis:**

Una dieta alta en sal, disminuirá la eficiencia de la cadena respiratoria de las mitocondrias en los diferentes tejidos a analizar (tejido adiposo blanco, pardo, músculo esquelético e hígado) de los ratones machos C57BL6 y con ello habrá menos oxidación de lípidos en la matriz mitocondrial y por lo tanto, una mayor acumulación de éstos en los tejidos, provocando un aumento de peso corporal.

Fecha estimada de inicio: 15/11/2015

Fecha estimada de término: 14/11/2016

Comisión a la que somete

¿Incluye documentos anexos?: No

**Investigadores participantes**

**(0) Comentarios**

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Noriega Lopez, Lilia Guadalupe	Investigador responsable	1	Sí
Tovar Palacio, Armando Roberto	Investigador asociado	2	No
Lopez Barradas, Adriana Margarita	Investigador asociado	3	No

**Población vulnerable**

**(0) Comentarios**

Población vulnerable vinculado al protocolo  Ninguna de las anteriores

Otra población:: Ratones macho de la cepa C57BL6.

**Objetivos**

**(0) Comentarios**

**Objetivo:**

Evaluar el efecto del consumo de una dieta alta en sal sobre la función mitocondrial y el metabolismo de lípidos en diversos tejidos de ratones C57BL6 con una dieta normal y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** General

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> en ratones C57BL6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la composición corporal en ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma) de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el contenido de lípidos en hígados y riñones de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el peso del tejido adiposo blanco de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre la cantidad de mitocondrias presentes en el músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:** Específico (s)

**Objetivo:**

Determinar el efecto del consumo de una dieta alta en sodio sobre el gen nuclear (gen hexocinasa 2) y mitocondrial (COX-2 y 16-S) en el tejido adiposo pardo y músculo esquelético de ratones C57B6 alimentados con una dieta control y una dieta alta en grasa.

**Tipo de objetivo:**

Específico (s)

**Metodología: Diseño general****(0) Comentarios****Metodología gral:**

- a) Diseño del estudio: Controlado.
- b) Descripción de la maniobra o intervención:

Modelo Animal: Se utilizarán ratones machos de la cepa C57BL6 producidos en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en condiciones microbiológicas libres de patógenos. Estos ratones se mantendrán durante 90 días en el cuarto 11 del bioterio en condiciones microbiológicas convencionales. Todos los procedimientos con animales se realizarán de conformidad con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que regula el uso de animales de laboratorio. Todos los estudios se repetirán para asegurar la reproducibilidad.

Alimentación: Se utilizarán 40 ratones C57BL6 macho de 8 semanas de edad, los cuales serán mantenidos en el cuarto 11 del bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 será de 40 a 70%. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de álamo a una densidad de no más de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua. El medio ambiente de los ratones será enriquecido con tubos de PVC y algodón para minimizar las peleas entre ellos. Los ratones se dividirán en 4 grupos, el grupo 1 tendrá una dieta control (AIN-93M), el grupo 2 tendrá la misma dieta Control más el doble de contenido de Sal (AIN-93M + 0.26% Sal), el grupo 3 tendrá una Dieta Alta en Lípidos (DAG) y por último, el 4° grupo tendrá una Dieta Alta en Lípidos más el doble de contenido de Sal (DAG +0.26% Sal). El contenido de sal para las dietas altas en sodio será el doble del contenido normal asemejando lo que pasa en la población mexicana que actualmente consume el doble que lo establecido por la norma.

La dieta será administrada por 90 días ya que ha sido reportado que en este tiempo es cuando se empiezan a ver el efecto de la dieta alta en grasa en los ratones. De cualquier forma el consumo de alimento y agua serán monitoreados para asegurar la ausencia de toxicidad. Todas las dietas se administrarán de manera sólida de acuerdo a la AIN-93M y sólo se harán algunas modificaciones (añadirles sal y manteca según el caso). La dieta control estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina y 0.013 g de TBHQ. La dieta DAG estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 170 g de manteca. La dieta control + Sal estará compuesta por: 465.692 g de almidón, 140 g de caseína, 155 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 40 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 1.8 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ y 2.6 g de sal marca La

Fina. La dieta DAG + Sal estará compuesta por: 216.9 g de almidón, 240 g de caseína, 102.67 g de maltodextrina, 100 g de sacarosa, 70 mL de aceite marca Nutrioli (de soya), 50 g de celulosa, 35 g de mineral mix, 10 g de vitaminas mix, 3 g de L-cistina, 2.5 g de colina, 0.013 g de TBHQ, 170 g de manteca y 2.6 g de sal marca La Fina. La dieta será elaborada en recipientes previamente desinfectados y el personal portará una bata limpia, guantes, cofia, y cubrebocas para disminuir el riesgo de contaminación durante la preparación. La dieta se mantendrá en un contenedor cerrado a cuatro grados y será transportada en un contenedor cerrado al bioherio.

Evaluación del gasto energético: El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta usando el equipo Oxymax de Columbus Instrumens. Los animales serán colocados en una cámara con un flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO<sub>2</sub> serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de oxígeno y el coeficiente de respiración (RQ). Los animales se colocan de 32 a 48 horas en la cámara, las lecturas de las primeras 12 horas corresponden al período de adaptación y las lecturas posteriores son utilizadas para el análisis. Los animales se colocan con alimento ad libitum a excepción de un periodo de 6 horas (de 11 a 17h) para registrar lecturas en el estado de ayuno. Es necesario registrar datos en el estado de ayuno para evaluar los cambios en la utilización de sustratos en los estados metabólicos de ayuno y postprandio. Durante toda la prueba los animales tendrán libre acceso al agua.

Evaluación de la composición corporal: La composición corporal de los ratones será evaluado utilizando un equipo de resonancia magnética EchoMRI. Los animales despiertos serán colocados en un tubo con el tamaño adecuado, el cual se introducido en el equipo. El equipo emite una radiofrecuencia a cierta secuencia y el software del equipo registra el espectro de cada ratón por 47 segundos. Se realizan tres escaneos independientes y los datos generados son registrados en una base de datos. Los datos obtenidos se expresan como masa magra, masa grasa, y fluidos libres. La lectura toma cinco minutos por ratón.

Obtención de muestras y tejidos: Se practicará eutanasia mediante la exanguinación por vía porta previa anestesia con isoflurano. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, los anestésicos inhalables como el isoflurano inducen rápidamente la inconsciencia y no afectan las mediciones posteriores. Brevemente, el animal será colocado en un receptáculo cerrado que contenga un algodón o gasa empapada de isoflurano al 2-3%. Se verificará la inconsciencia del animal mediante la ausencia de reflejo caudal, reflejo ocular, reflejo por estimulación del dolor interdigital y ausencia de movimiento de vibrisas. La posterior exanguinación por vía porta se llevará a cabo una vez que se haya cerciorado de la real inconsciencia del animal, pues se desea obtener tejidos que no tengan contaminación química que alteren los resultados de nuestras determinaciones así como para obtención de un volumen adecuado de sangre para la determinación de diferentes parámetros químicos, ya que según la norma mencionada es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libres de contaminación química y/o tejido cerebral integro. De esta manera, una vez realizadas las pruebas fisiológicas, los animales serán sometidos a un ayuno de 8 horas para la eutanasia. Se obtendrá el volumen total de sangre, del cual se separará el suero por centrifugación y se almacenará a -80°C para futuras determinaciones. Posteriormente, se obtendrán muestras de hígado, riñones, tejido adiposo pardo, tejido adiposo blanco y músculo esquelético mediante una escisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C para su posterior análisis, el cual incluye expresión génica por RT-PCR y determinación de mitocondrias por la tinción SDH.

En las muestras obtenidas se realizarán los estudios siguientes:

- 1.- Perfil Bioquímico: Se evaluará la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en suero utilizando ensayos enzimáticos-colorimétricos (Cobas C111, Roche).
- 2.- Contenido lipídico en hígado y riñones: Se extraerán los lípidos totales de acuerdo al método de

Folch, el cual se basa en la separación de la fracción lipídica de un tejido al ser homogenizado en una solución solvente que al añadir agua y centrifugar forma dos fases. En la fase acuosa se encuentran los compuestos hidrofílicos y en la superior se encuentra la fase orgánica que contiene los lípidos. Se evapora para concentrar el contenido de lípidos en el fondo del tubo. La pastilla lipídica se resuspende en isopropanol/tritón al 10%. Finalmente, se determina la concentración de triglicéridos en el extracto por los métodos anteriormente mencionados.

3. Expresión génica en tejido adiposo pardo y músculo esquelético: Se identificarán los genes COX-2 y 16 S mitocondrial, así como el gen hexosinasa 2 nuclear mediante PCR en tiempo real, el cual es una prueba de alta sensibilidad que se utiliza para determinar cuantitativamente la cantidad inicial de ácidos nucleicos. Se amplifica un fragmento de ADN y así se determina la cantidad exacta de ADN, presente en la solución estudiada después de cada ciclo. Se llama en tiempo real porque la cantidad de ADN amplificado se determina a medida que la reacción se produce. Se puede combinar con PCR de Transcripción inversa para medir la cantidad de RNA mensajero. Esta amplificación selectiva requiere de 2 oligonucleótidos cebadores (*primers*) de alrededor de 15 – 25 pares de bases. Los *primers* son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que se va a amplificar. Durante el PCR, las moléculas de ADN de cadena doble se desnaturalizan, cada cadena sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena, y luego se renaturalizan (se unen nuevamente) con una cadena complementaria. El PCR es una reacción en cadena de 25 – 35 ciclos, los cuales involucran 3 reacciones controladas en tiempo y temperatura en los termocicladores automáticos, dura alrededor de 1 a 5 min. Esta técnica utiliza reporteros fluorescentes. Esta fluorescencia es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines es el SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, cuando está en solución sin unirse al ADN de doble cadena, no emite fluorescencia, pero cuando se une al ADN, incrementa hasta mil veces su fluorescencia.

4. Cantidad de mitocondrias en músculo esquelético: Se identificarán las mitocondrias mediante la tinción SDH (Succinato deshidrogenasa), la cual es una tinción oxidativa sensible y específica en patología mitocondrial. Tíñe el acúmulo de mitocondrias a nivel Subsarcolemal. La tinción SDH es una técnica EHQ (enzimohistoquímica), cuyo sustrato es el Succinato sódico, con un pH de 7.4, su captador de color es el NBT (Nitroblue tetrazolium) y su solución tampón es el tampón fosfato. Su función es valorar la actividad mitocondrial en el complejo II de la respiración mitocondrial y la diferenciación de las fibras musculares. La SDH utiliza NADH como un receptor de electrones para reaccionar con Nitrato Azul Tetrazolio (NBT), una sal de color púrpura. Esta reacción produce una tinción granular de las mitocondrias que refleja la abundancia de las mitocondrias y la actividad de la SDH. Cuanto mayor sea la actividad de la SDH en el músculo (y por lo tanto las mitocondrias), mayor será la intensidad de la tinción SDH en las fibras musculares. Generalmente las fibras musculares de contracción lenta, tienden a oxidar más, por lo que tendrán una tinción púrpura más densa. Por lo que este análisis histoquímico, refleja la capacidad oxidativa relativa de las fibras musculares

c) Tamaño de la Muestra: El Cálculo del número de muestra (n) se realizó según la ecuación para muestras independientes:  $n \geq 2S^2(Z\alpha + Z\beta)^2 / \Delta^2$ . En donde: S=Desviación estándar. Se utilizaron datos obtenidos en un estudio usando el peso corporal de ratas control y alimentados con una dieta alta en grasa con un valor de  $\pm 31g$ .  $\Delta$ = Diferencia mínima en el peso corporal entre los grupos control y alimentados con una dieta alta en grasa con un valor de 64g.  $\alpha=0.05$  (Tasa de error),  $\beta=0.8=80\%$  (Poder de la prueba),  $Z\alpha + Z\beta=1.96+0.84$  (Constantes). Por lo tanto,  $n \geq 2(31)^2(1.96+0.84)^2 / (64)^2$ ,  $n \geq 3.7$ . Con base en lo anterior se necesita utilizar un número promedio de 4 ratones por grupo + 20% por las pérdidas  $n=5$  ratones por grupo y el experimento se realizará por duplicado. El número total de animales es de 40.

d) Mecanismos de asignación del tratamiento: Los animales se dividirán de acuerdo a lo establecido en la descripción de la maniobra o intervención. La distribución de los grupos



se hará de manera aleatoria.

e) Grupos de tratamiento: Los grupos se encuentran descritas en la descripción de la maniobra o intervención. Se resumen de la siguiente manera:

-Grupo 1: Dieta Control.

-Grupo 2: Dieta Control + Alta en sal.

-Grupo 3: Dieta Alta en grasa

-Grupo 4: Dieta alta en grasa + Alta en sal.

Las dietas a utilizar cubren los requerimientos de proteína y de grasa de los ratones en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a las tablas de NRC (Requerimientos Nutricionales en Animales de Laboratorio) que han sido establecidas en base a diferentes criterios incluyendo el crecimiento, reproducción, edad, cepa, entre otros. Las dietas que serán utilizadas en este protocolo serán elaboradas en base a las dietas de referencia estándar desarrolladas y evaluadas por el comité del Instituto Americano de Nutrición (AIN-93). El porcentaje de proteína que contienen las dietas controles es de 14.73% (los valores ya están ajustados de acuerdo a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína, mientras que el de grasa es del 9.47%. El alimento cumplirá con las siguientes características: Estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. Estará dentro de su periodo de caducidad. Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: Se utilizará agua potable, en bebederos individuales de plástico con capacidad de 500 mL para administrarse las 24 h. la cantidad a mantener en cada bebedero será de 300 mL cada 8 días.

f) Duración del seguimiento individual: El seguimiento será de 90 días para todas las dietas.

#### Metodología: Criterios de selección

##### (0) Comentarios

#### Criterios de selección del protocolo lo:

Se eliminarán del estudio los animales que presenten signos evidentes de enfermedad, como pelaje hirsuto, secreción ocular o nasal, irritabilidad, conducta anormal, diarrea o letargia persistentes. También se eliminarán los animales bajo tratamiento que presenten una disminución en el peso corporal mayor al 10%.

#### Beneficio (s) del estudio

##### (0) Comentarios

#### Beneficio:

No Aplica.

#### Tipo de beneficio:

Beneficios directos esperados

#### Metodología: Desenlace y variables

##### (0) Comentarios

**Metodología de desenlace y variables:**

- A) Variables/desenlaces principales a medir: Peso corporal, consumo de alimento, masa magra, masa grasa, VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, Glucosa en plasma, Colesterol, Triglicéridos, Electrolitos en orina. Cantidad de mitocondrias en musculo.
- B) Variables/desenlaces secundarios a medir: Expresión génica y cuantificación de lípidos en hígado y riñón.
- C) Frecuencia de las mediciones: El peso corporal y el consumo de agua será evaluado una vez a la semana, mientras que el consumo de alimento será evaluado 2 veces por semana. La composición corporal y la utilización de sustratos se medirán una vez al mes y el resto de las mediciones al final del tratamiento.
- D) Criterios de éxito y falla: NO APLICA.
- E) Análisis estadístico: Los resultados se presentarán como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los datos con una distribución variable se transformarán logarítmicamente antes de su análisis. Los datos serán evaluados usando un análisis de varianza de 2 vías y cuando la interacción resulte significativa se realizará la prueba PLSD de Fisher. Las diferencias se considerarán significativas con una  $p < 0.05$ . Todos los análisis se realizarán en el programa Graph Pad para PC.

**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.docx

Carta de consentimiento informado: No aplica.docx

#### Declaración de los investigadores

##### (0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de investigadores: Declaracion de investigadores sal.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

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS 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 FÍSICAS 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.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS 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.**