



Ciudad de México a 06 de Octubre de 2020

No. Oficio CICUAL – 123-2020

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE**  
**LA NUTRICIÓN**  
**P R E S E N T E**

Estimada Dra. Torres

Este comité ha dictaminado que se RECIBE Y ACEPTA el cierre de su proyecto intitulado “EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INTRODUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE” con clave CINVA- FNU-1744-16/18-1. 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**

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

JABP/bdr





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 31 de agosto del 2020

**DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN**  
**COORDINADOR DEL CICUAL**  
**PRESENTE**

Estimado Dr. Barrios:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo **“Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol; Capacidad antihipeglucemiante”** con registro CINVA o CICUAL: 1744-16/18-1 debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE,

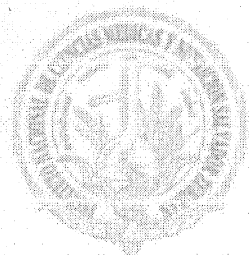
Dra Nimbe Torres y Torres

Nombre, Firma y Área del (a) Investigador (a)



**2020**

Ciudad de México a 8 de septiembre del 2020.



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIZARAIN

**INFORME DEL PROYECTO CINVA-FNU-1744-16/18-1. EVALUACIÓN *IN VIVO*  
EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD  
INDUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD  
ANTIHIPERGLUCEMIANTE.**

Responsable Dra. Nimbe Torres y Torres, Departamento de Fisiología de la Nutrición.

A continuación se describen los principales hallazgos del proyecto que se vieron reflejados en un artículo de investigación original en la revista *Nutrients* (FI=4.5) con el título " **Consumption of cooked black beans stimulates a cluster of some Clostridia class bacteria decreasing inflammatory response and improving insulin sensitivity.** *Nutrients* 2020, 12, 1182; doi: 10.3390/nu12041182.

La dieta puede influir en la composición de la microbiota humana; sin embargo, hay poca información sobre el efecto de las legumbres como fuente de proteínas y por su contenido de almidón resistente con respecto a su impacto en la microbiota intestinal. Las legumbres o las leguminosas son una importante fuente de proteínas y carbohidratos complejos que sirven como una importante fuente de energía en la dieta humana. El contenido de carbohidratos de las legumbres es del 60-65% y el almidón constituye la mayor fracción de los carbohidratos. Los dos componentes del almidón, la amilosa, que es una molécula lineal, y la amilopectina, que está muy ramificada, lo que hace que la amilopectina sea fácilmente accesible a las enzimas digestivas del intestino delgado. El almidón resistente (RS) contiene moléculas de glucosa ligadas que son resistentes a la hidrólisis en el intestino delgado, pasando directamente a través del colon donde es fermentado por la microbiota residente. Al entrar en el colon, el RS se somete a un alto grado de fermentación anaeróbica por la microbiota local en hidrógeno, metano, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato).

Av. Andrés Bello  
Quiroga No. 15  
Colonia Domínguez Sección XVI  
Alcaldía Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx



**2020**  
LEONA VICARIO



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

El butirato es el ácido graso de cadena corta predominante producido a partir de la RS, que participa en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. El butirato tiene varios beneficios propuestos para la salud, entre ellos el suministro de energía para las células epiteliales del colon y la mejora de la sensibilidad a la insulina. La mejor fuente natural de almidones resistentes son los plátanos menos maduros, las leguminosas y las papas. Se estima que la ingesta puede ser de hasta 30-40 g por día. En 2013, las Naciones Unidas declararon el año 2016 "Año de las Legumbres" con el fin de concienciar y posicionar a las leguminosas como fuente primaria de proteínas y, por tanto, de RS[2]. Las frijoles negros son inusuales en su contenido de almidón resistente y que no se convierte en azúcares simples evitando un rápido aumento del nivel de azúcar en la sangre. Se ha demostrado los beneficios de los almidones resistentes aislados pero no de los contenidos en el frijol negro, además de que se conoce poco sobre su efecto en el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

El propósito del presente trabajo fue estudiar el efecto de los frijoles negros cocidos con y sin alto contenido de grasa y azúcar (HF+S) en la dieta sobre la composición corporal, el gasto de energía, la microbiota intestinal, los ácidos grasos de cadena corta, NF-B, las ocludinas intestinales, la señalización de la insulina en un modelo de rata y el área bajo la curva para la glucosa, la insulina en sujetos sanos. El consumo de frijol negro redujo el porcentaje de grasa corporal, el área bajo la curva de la glucosa, la leptina sérica, el LPS, las concentraciones de glucosa e insulina y aumentó el gasto energético incluso en presencia de HF+S.

Avda. Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Alcaldía Tlalpan  
Código Postal 16080  
Ciudad de México  
Tel. (52) 54870900  
www.incmosz.mx

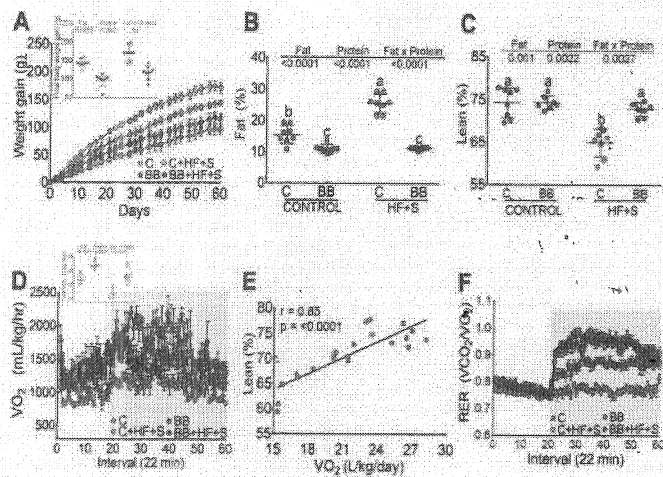


**2020**  
LEONA VICARIO



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Estos resultados podrían estar mediados en parte por la modificación de la microbiota intestinal, por el aumento de un grupo de bacterias de la clase Clostridia, principalmente *R. bromii*, *C. eutactus*, *R. callidus*, *R. flavefaciens* y *B. pullicaecorum* y por un aumento de la concentración de butirato fecal. En conclusión, se puede recomendar el consumo de BB para prevenir la resistencia a la insulina y la endotoxemia metabólica modificando la microbiota intestinal. Por último, los grupos alimentados con BB mostraron una menor abundancia de FMO-3 hepático, incluso con una dieta alta en grasas que protege contra la producción de TMAO y la obesidad.



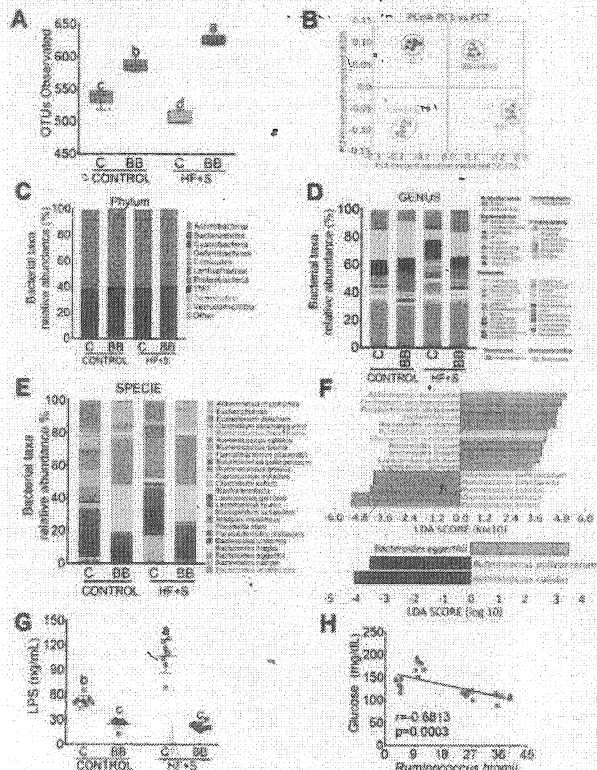
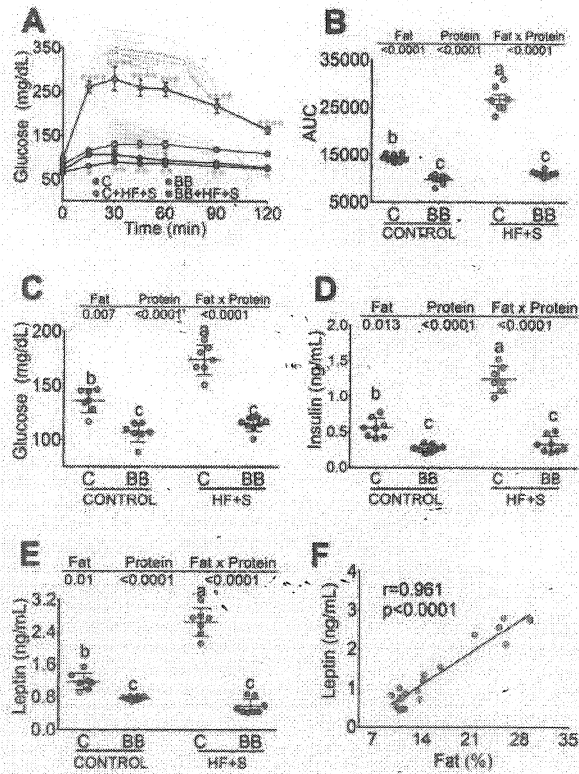
Avda. Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Dominguez Sección XVI  
Alcaldía Tlalpan  
Código Postal 14080  
Ciudad de México  
Tel. (52) 54870900  
www.incmnsz.mx



2020  
LEONA VICARIO  
PROFESORA DE SALUD PÚBLICA



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



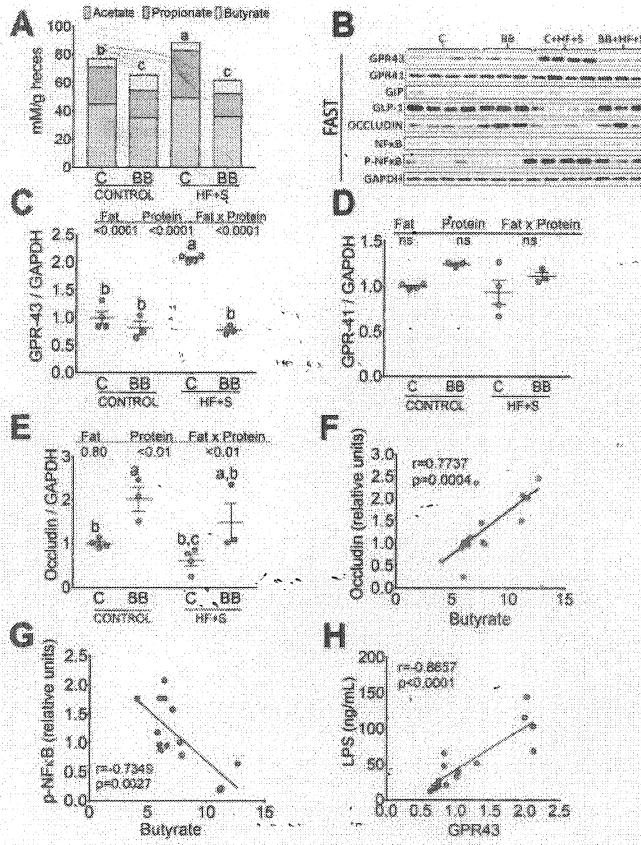
Avenida Vasco de  
Quiroga No. 15  
Colonia Belisario  
Domínguez Sección XVI  
Alcaldía Tlalpan  
Ciudad de México  
Tel. (52)54870000  
www.incmnsz.mx



**2020**  
LEONA VICARIO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



Atentamente,

Dra. Nimbe Torres y Torres

Investigadora en Ciencias Médicas F

Departamento de Fisiología de la Nutrición

Avda. Yucatán #  
Quirón # No. 15  
Colonia Balisario  
Dominguez Sección XVI  
Alcaldía Tlalpan  
Código Postal 14000  
Ciudad de México  
Tel. (52)54870000  
www.incmnsz.mx



**2020**  
LEONA VICARIO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN



Article

# Consumption of Cooked Black Beans Stimulates a Cluster of Some Clostridia Class Bacteria Decreasing Inflammatory Response and Improving Insulin Sensitivity

Mónica Sánchez-Tapia <sup>1</sup>, Irma Hernández-Velázquez <sup>2</sup>, Edgar Pichardo-Ontiveros <sup>1</sup>, Omar Granados-Portillo <sup>1</sup>, Amanda Gálvez <sup>2</sup>, Armando R Tovar <sup>1</sup> and Nimbe Torres <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City 14080, Mexico; qfbmonikt@gmail.com (M.S.-T.); edgar.pichardo@gmail.com (E.P.-O.); ograpo@yahoo.com (O.G.-P.); armando.tovarp@incmnsz.mx (A.R.T.)

<sup>2</sup> Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 0410, Mexico; hernandezvelazquezia@gmail.com (I.H.-V.); galvez@unam.mx (A.G.)

\* Correspondence: nimbe.torrest@incmnsz.mx; Tel.: +52-55-5655-3038s

Received: 4 March 2020; Accepted: 21 April 2020; Published: 23 April 2020



**Abstract:** There is limited information on the effect of black beans (BB) as a source of protein and resistant starch on the intestinal microbiota. The purpose of the present work was to study the effect of cooked black beans with and without high fat and sugar (HF + S) in the diet on body composition, energy expenditure, gut microbiota, short-chain fatty acids, NF- $\kappa$ B, occluding and insulin signaling in a rat model and the area under the curve for glucose, insulin and incretins in healthy subjects. The consumption of BB reduced the percentage of body fat, the area under the curve of glucose, serum leptin, LPS, glucose and insulin concentrations and increased energy expenditure even in the presence of HF + S. These results could be mediated in part by modification of the gut microbiota, by increasing a cluster of bacteria in the Clostridia class, mainly *R. bromii*, *C. eutactus*, *R. callidus*, *R. flavefaciens* and *B. pullicaecorum* and by an increase in the concentration of fecal butyrate. In conclusion, the consumption of BB can be recommended to prevent insulin resistance and metabolic endotoxemia by modifying the gut microbiota. Finally, the groups fed BB showed lower abundance of hepatic FMO-3, even with a high-fat diet protecting against the production of TMAO and obesity.

**Keywords:** black bean; gut microbiota; *Ruminococcus bromii*; resistant starch; incretins; SCFA; insulin sensitivity

## 1. Introduction

Diet can influence the composition of the human microbiota; however, there is limited information on the effect of legumes as a source of protein and, because of their content of resistant starch content, with respect to their impact on the intestinal microbiota. Legumes or pulses are an important source of protein and complex carbohydrates, that serves as a major source of energy in the human diet. The carbohydrate content in pulses is 60–65%, with starch constituting the largest fraction of the carbohydrates. The two components of starch are amylose, which is a linear molecule, and amylopectin, which is highly branched, making amylopectin easily accessible to digestive enzymes in the small intestine. Resistant starch (RS) contains  $\alpha$ -linked glucose molecules that are resistant to hydrolysis in the small intestine, passing directly through the colon where it is fermented by the resident microbiota. RS are classified into four groups based on the properties that allow it to resist digestion. RS type 1 (RS1) is found in whole grains and legumes and is inaccessible to digestive enzymes because it is





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México, a 26 de agosto de 2020

No. Oficio CICUAL-087-2020  
Ref. CINVA-FNU-1744

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES  
DEPTO. FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN  
P R E S E N T E

Estimada Dra. Torres:

Este comité ha dictaminado que se **RECIBE** el cierre de su proyecto intitulado "EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INTRODUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE" con clave CINVA-FNU-1744-16/18-1, sin embargo le pedimos de favor nos envíe el informe final en hoja con membrete y firmado del o de los productos obtenidos con el proyecto.

En caso de tener alguna duda o comentario, se lo haremos saber.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

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**  
LEONORA VICARIO  
DIRECTORA GENERAL DE LA SALUD





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 24 de julio de 2020.

No. Oficio CICUAL/051/20

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA  
DE LA NUTRICIÓN  
Presente.

Estimada Dra. Torres:

Por este conducto le informo que la vigencia de la prórroga de su proyecto intitulado: **“EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INTRODUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE”**, con registro **CINVA-FNU-1744-16/18-1** finalizó el 16 de abril de 2020, por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá otra 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

**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 Bellisario 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  
BIEN LEONORA DE LOS PAYAN





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

*A. Cruz*



**2019**

AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

CdMX., a 16 de abril de de 2019.

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**  
Depto. de Fisiología de la Nutrición  
Presente.

**REF: CICUAL-FNU-1744-16/18-1**

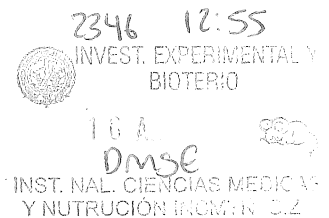
Estimada Dra Torres:

Este comité ha dictaminado que se **AUTORIZA** prórroga por 1 año, no solicita más animales a su proyecto intitulado **“EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INTRODUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE”**

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora del Comité Interno para el cuidado y uso de  
los Animales de Laboratorio.



*Recibir original*

*16/4/19*

*Omar Grandes*

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

NAB/nom

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



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 10 de abril 2019.

**Protocolo:** Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiperglucemiante

**CICUAL: CINVA-1744-16/18-1**

Dra Norma Bobadilla Sandoval

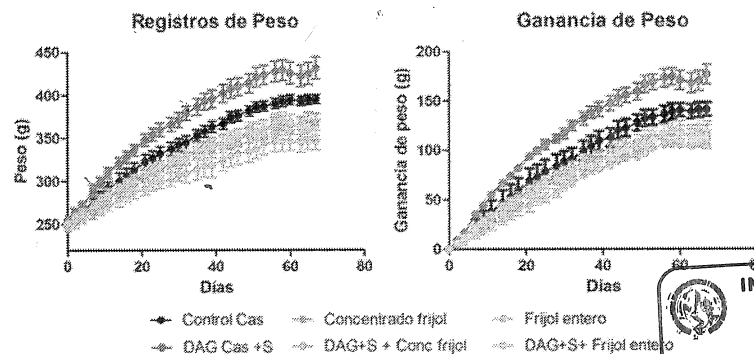
Coordinadora del Comté Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

Hasta el momento ya terminamos con la parte experimental, nos falta por realizar unos western blots y escribir el artículo, por lo que pediría una extensión de 6 meses para concluir con el artículo.

A continuación incluyo los resultados que hasta el momento tenemos de este protocolo

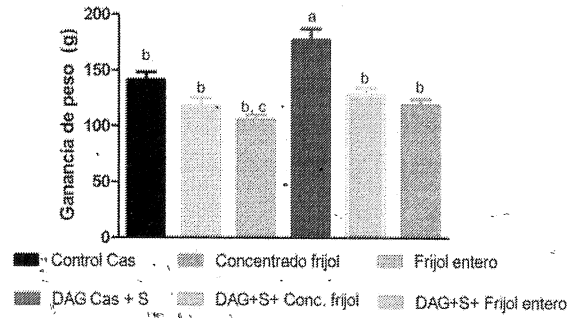
**Ganancia de peso**

En la siguiente grafica se observa la ganancia de peso de las ratas alimentadas con dieta control, o a base de un concentrado de frijol o bien el frijol entero con y sin dieta alta en grasa saturada, se puede observar claramente que el grupo alimentado con HFD a base de caseína mostro la mayor ganancia de peso, sin embargo al combinar esta dieta con el concentrado o bien el frijol entero la ganancia es similar a la obtenida con una dieta control (AIN-93), por otro lado los grupos con una dieta balanceada se observa que al incluir el concentrado de frijol hay una disminución en la ganancia de peso y esta es mas evidente al incluir el frijol entero.

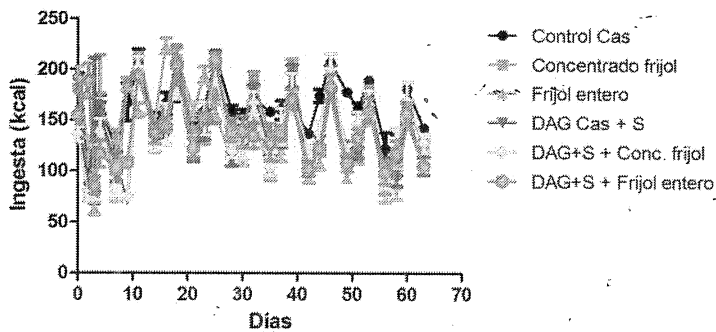


Avenida Vasco de Quiroga No. 15  
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI  
Delegación Tlalpan  
Código Postal 14080  
México, Distrito Federal  
Tel. (52)54870900  
www.incmnsz.mx

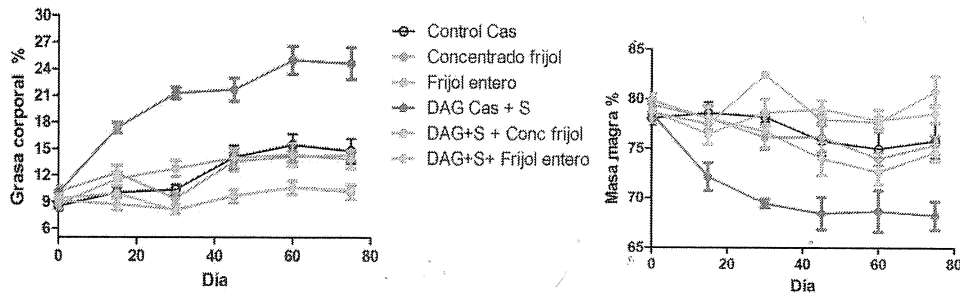
INS. NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"  
10 ABR 2019  
Comité de Investigación  
en Animales



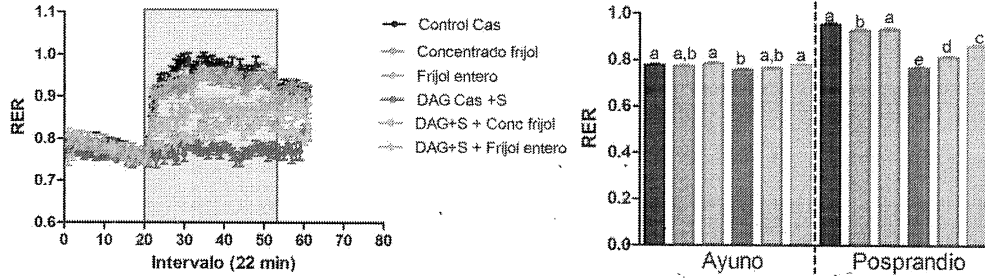
Con respecto a la ingesta calórica, se puede ver que todos los grupos consumieron la misma cantidad de alimento



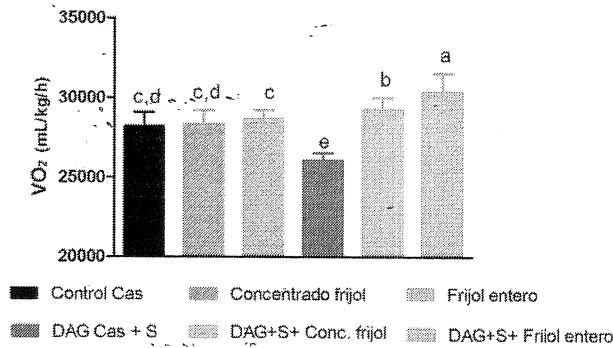
Cuando se evaluó la composición corporal, se muestra que el grupo alimentado con caseína y grasa saturada fue el grupo que presentaba más grasa corporal que el resto de los grupos y que también era el que perdía más masa muscular. Por lo contrario los grupos que fueron alimentados con frijón fueron los que ganaron menos masa grasa y mantuvieron su masa magra.



Gasto energético. Como se puede ver en las gráficas, los animales que consumieron caseína con grasa saturada fueron los que presentaron inflexibilidad metabólica y que los grupos alimentados con caseína o frijón entero fueron los que presentaron un gasto energético adecuado.

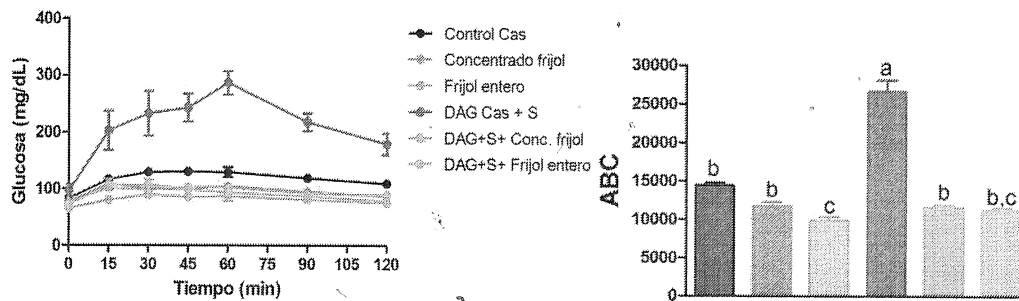


Con respecto al consumo de oxígeno, se puede observar que los animales alimentados con una dieta con caseína y alta en grasa saturada son los que consumen menos oxígeno que el resto de los grupos indicando un menor gasto energético.

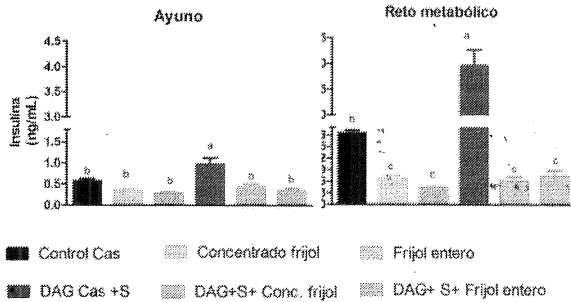


Como se puede observar en las curvas de tolerancia a la glucosa, solo el grupo alimentado con caseína mas grasa saturada presento intolerancia a la glucosa e interesantemente los animales alimentados con frijo aun en la presencia de grasas saturada presentaron una curva de tolerancia a la glucosa normal.

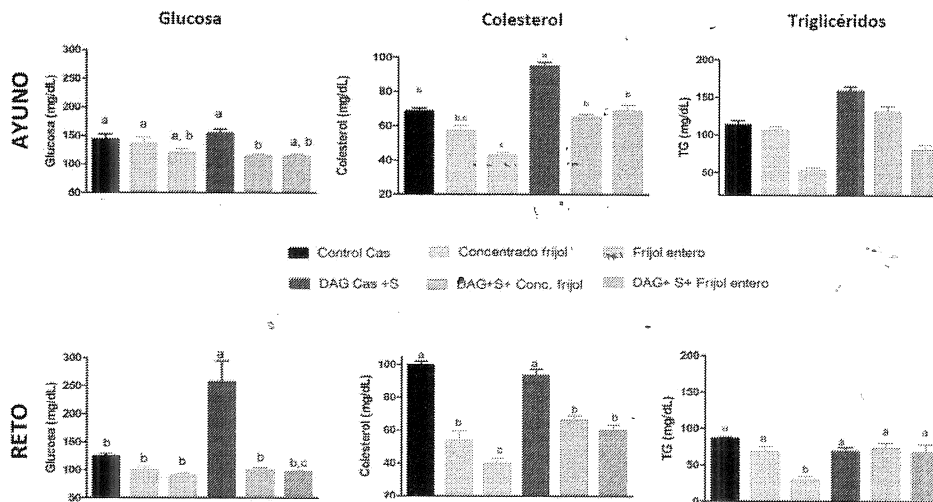
### Curva de tolerancia a la glucosa



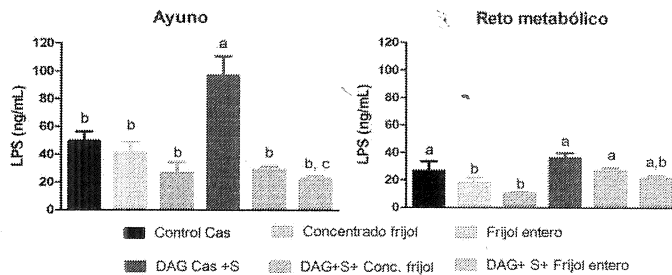
Parámetros bioquímicos Como se puede ver en las siguientes graficas solo el grupo alimentado con caseína y grasa saturada presentó ligeramente altas concentraciones de insulina, sin embargo después del reto metabólico, solo los animales alimentados con caseína y grasa saturada presentaron hipersinsulinemia.



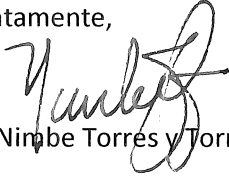
Con respecto a las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos solamente los grupos alimentados con caseína y grasa saturada presentaron las más altas concentraciones de colesterol y triglicéridos.



El consumo de caseína y grasa saturada incrementó ligeramente las concentraciones de LPS un indicativo de una inflamación de bajo grado.



Atentamente,



Dra Nimbe Torres y Torres

Departamento de Fisiología de la Nutrición

INCMNSZ





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

dcosc



2019

AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

CdMX., a 22 de marzo de de 2019.

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRÉS**  
**DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN**  
**Presente.**

**REF: CICUAL-FNU-1744-16/18-1**

Estimada Dra. Torres:

Este comité ha dictaminado **NO APROBAR** la prórroga, a su proyecto intitulado “**EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INTRODUCIDA POR DIETA DE UN CONCENTRADO DE FRIJOL; CAPACIDAD ANTIHIPERGLUCEMIANTE**”, hasta que la carta sea dirigida al CICUAL.

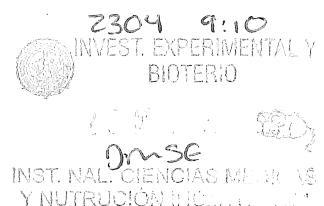
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval  
Coordinadora del Comité Interno para el Cuidado y Uso de  
los Animales de Laboratorio

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

NAB/nom



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



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

**Protocolo:** Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante

**CICUAL:** CINVA-1744-16/18-1

**Responsable:** Dra Nimbe Torres y Torres

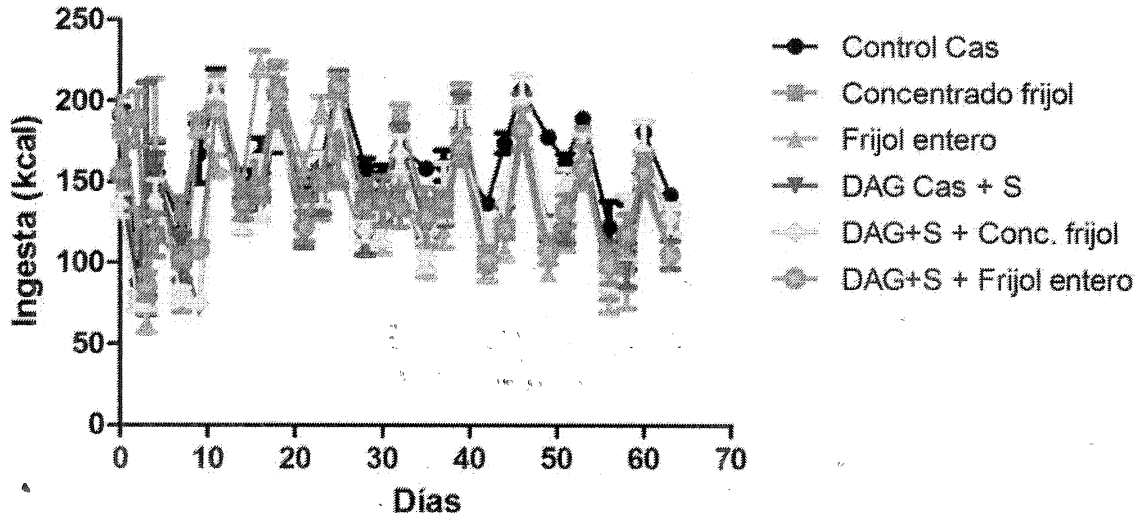
#### **REPORTE FINAL.**

**A continuación incluyo los resultados finales de este protocolo**

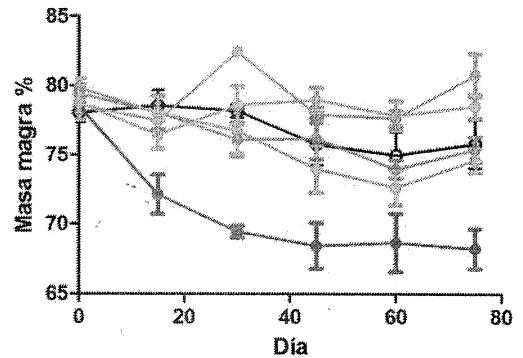
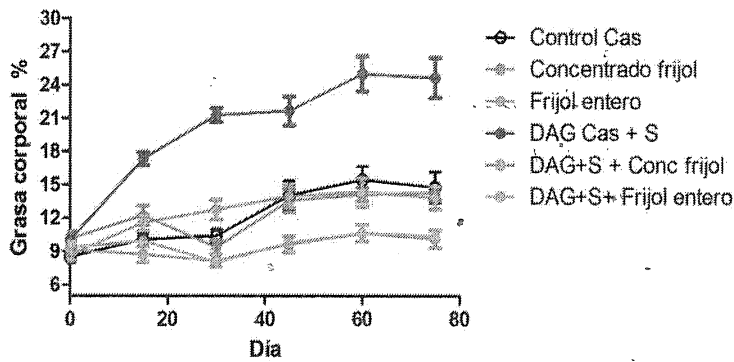
#### **Ganancia de peso.**

En la siguiente grafica se observa la ganancia de peso de las ratas alimentadas con dieta control, o a base de un concentrado de frijol o bien el frijol entero con y sin dieta alta en grasa saturada, se puede observar claramente que el grupo alimentado con HFD a base de caseína mostro la mayor ganancia de peso, sin embargo al combinar esta dieta con el concentrado o bien el frijol entero la ganancia es similar a la obtenida con una dieta control (AIN-93), por otro lado los grupos con una dieta balanceada se observa que al incluir el concentrado de frijol hay una disminución en la ganancia de peso y esta es mas evidente al incluir el frijol entero.

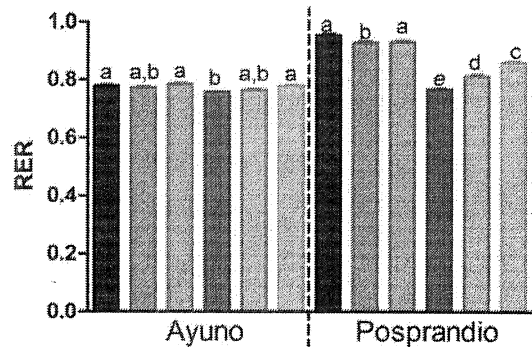
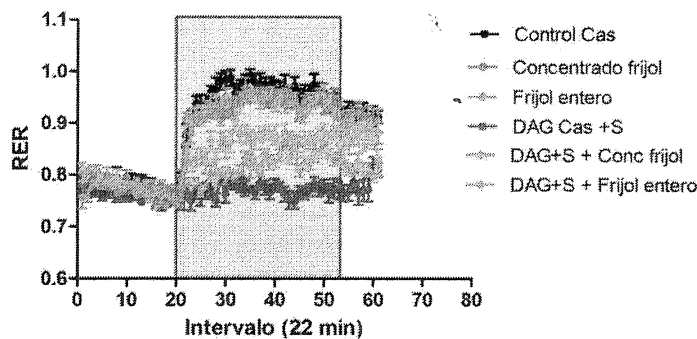




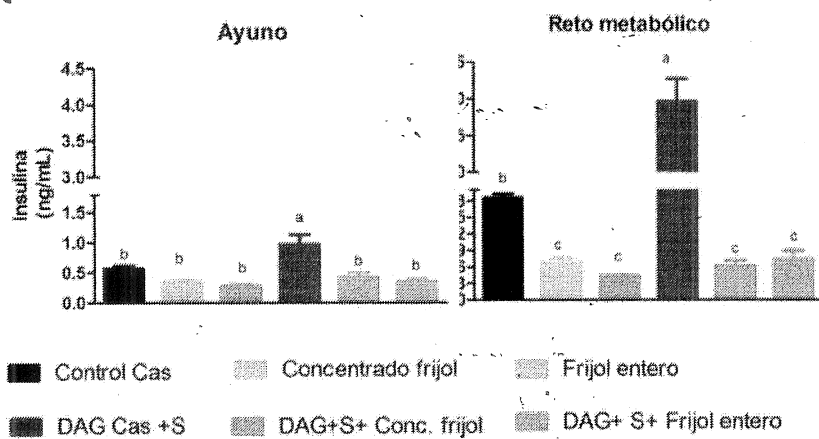
Cuando se evaluó la composición corporal, se muestra que el grupo alimentado con caseína y grasa saturada fue el grupo que presentaba más grasa corporal que el resto de los grupos y que también era el que perdía más masa muscular. Por lo contrario los grupos que fueron alimentados con frijol fueron los que ganaron menos masa grasa y mantuvieron su masa magra.



Gasto energético. Como se puede ver en las gráficas, los animales que consumieron caseína con grasa saturada fueron los que presentaron inflexibilidad metabólica y que los grupos alimentados con caseína o frijol entero fueron los que presentaron un gasto energético adecuado.

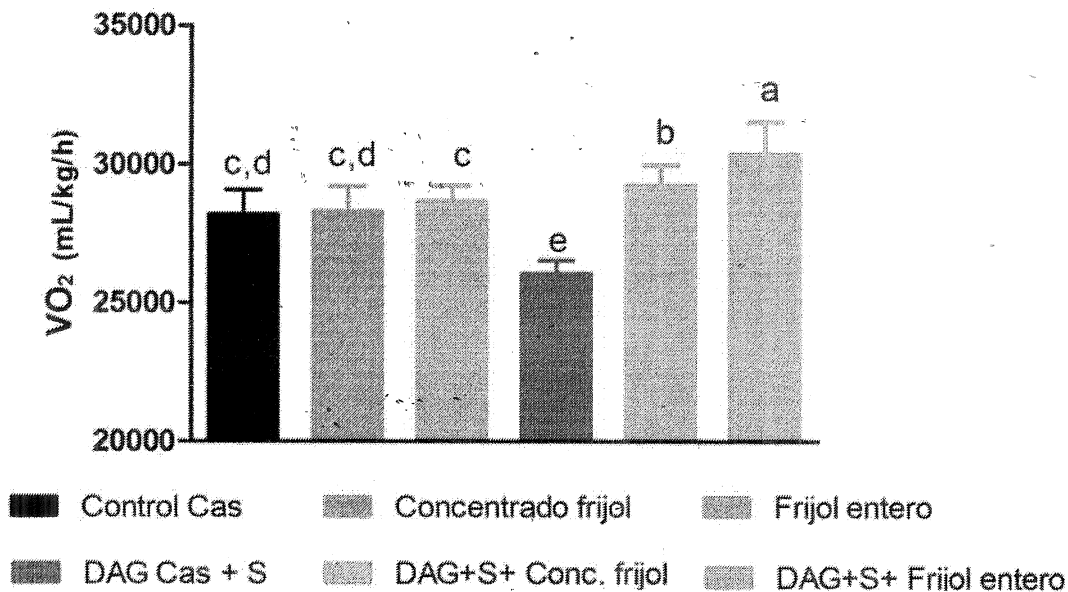


Parámetros bioquímicos Como se puede ver en las siguientes graficas solo el grupo alimentado con caseína y grasa saturada presentó ligeramente altas concentraciones de insulina, sin embargo después del reto metabólico, solo los animales alimentados con caseína y grasa saturada presentaron hipersinsulinemia.



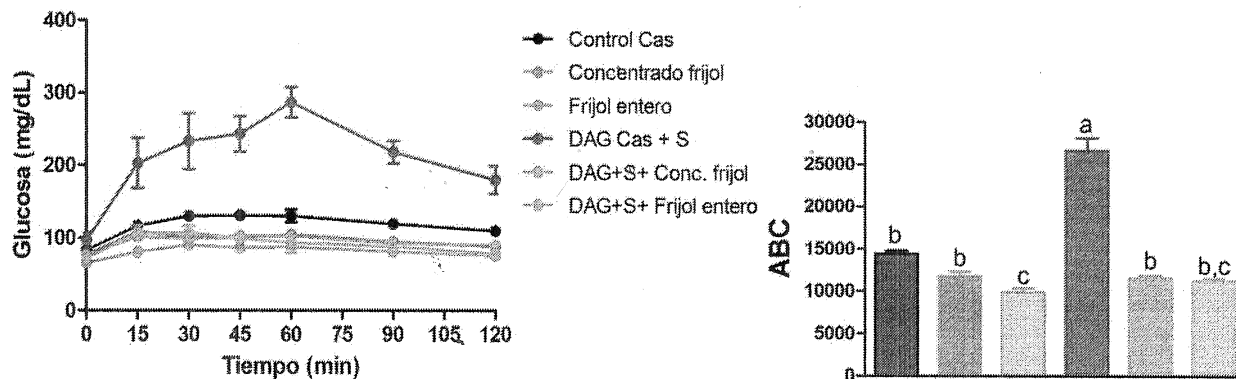
Con respecto a las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos solamente los grupos alimentados con caseína y grasa saturada presentaron las más altas concentraciones de colesterol y triglicéridos.

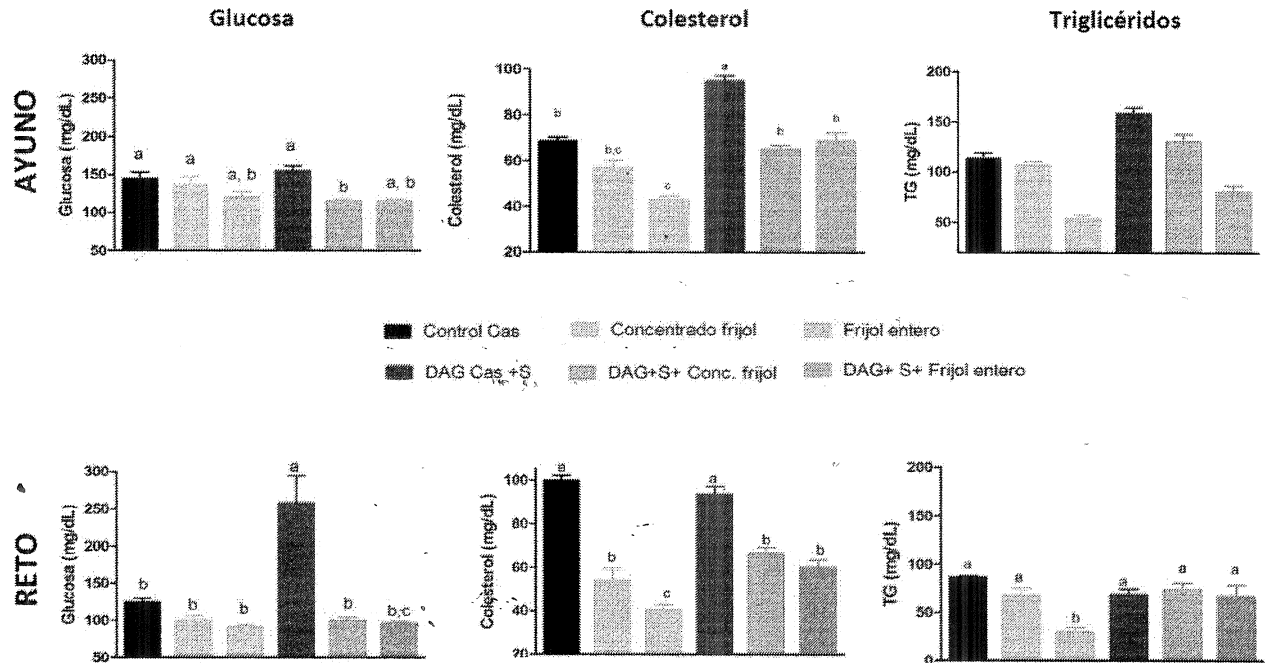
Con respecto al consumo de oxígeno, se puede observar que los animales alimentados con una dieta con caseína y alta en grasa saturada son los que consumen menos oxígeno que el resto de los grupos indicando un menor gasto energético.



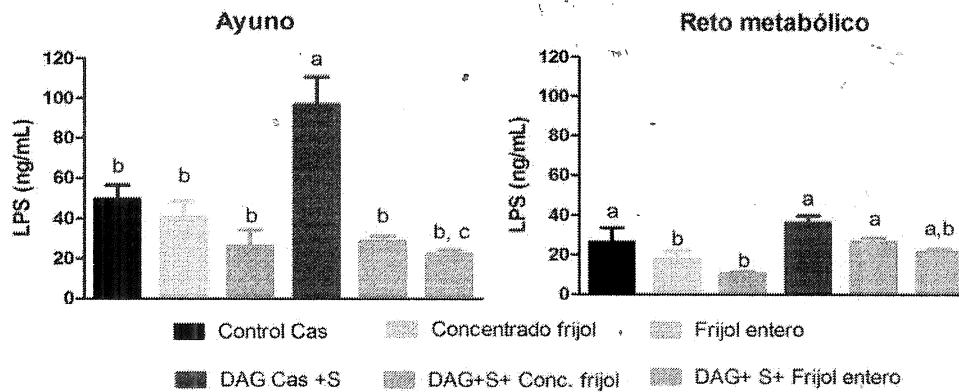
Como se puede observar en las curvas de tolerancia a la glucosa, solo el grupo alimentado con caseína mas grasa saturada presento intolerancia a la glucosa e interesantemente los animales alimentados con frijo aun en la presencia de grasas saturada presentaron una curva de tolerancia a la glucosa normal.

### Curva de tolerancia a la glucosa





El consumo de caseína y grasa saturada incremento ligeramente las concentraciones de LPS un indicativo de una inflamación de bajo grado.



Hasta el momento ya terminamos con la parte experimental, nos falta por realizar unos western blot y escribir el artículo, por lo que pediría una extensión de 6 meses para concluir con el artículo.

Atentamente,

Dra Nimbe Torres y Torres

Departamento de Fisiología de la Nutrición



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

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

México Cd., Mx a 21 de febrero de 2019.

No. Oficio CICUAL-105-19

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES**

Depto. Fisiología de la Nutrición  
Presente.

Estimada Dra. Torres.:

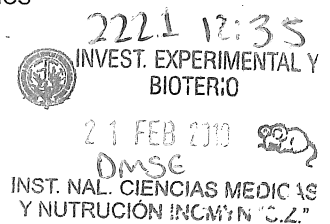
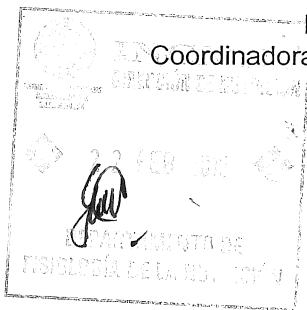
Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: "EVALUACIÓN IN VIVO EN UN MODELO MURINO DE RATAS Wistar Macho con y sin obesidad introducida por dieta de un concentrado de frijol; capacidad antihiperoglucemiante", con registro FNU-1744-16/18-1 finalizará en febrero 2019. Por lo que, le solicito 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/nom

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

**No. CINVA:**

**CLAVE:** FNU-1744-16/18-1

**Fecha de registro del Protocolo:** 15-10-15

**Título del Protocolo:** Evaluación *in vivo* en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante

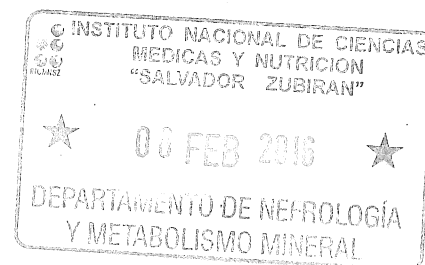
**Propuesta:** a) Nueva b) Renovación

<b>Investigador Responsable del Proyecto.</b>	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres y Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ó

<b>Investigadores que Participaran en el Protocolo</b>			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ó
María Amanda Gálvez Mariscal	Doctor	56225344	galvez@unam.mx

<b>Estudiantes</b>			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	Maestra	56225344	Ó

<b>Vigencia del Proyecto.</b>			
Fecha de inicio del proyecto		Enero	2016
Fecha tentativa de finalización.		Enero	2018





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

**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"

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

**Principal**

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol entero en un modelo de obesidad (Rata Wistar).

**Objetivos Particulares**

1) Estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro en un modelo de obesidad, sobre:

- Parámetros bioquímicos en suero: Glucosa, insulina, LDL, colesterol.
- Ganancia de peso
- Curva de tolerancia a la glucosa.
- Evaluar la existencia de inflexibilidad metabólica mediante la determinación del coeficiente respiratorio y la composición corporal.
- Efecto en la microbiota intestinal.
- Determinación de la composición corporal

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

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional. En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en el mercado mexicano; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo paso de ser 18 kg/ persona/año a 10 kg/ persona/ año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos y el abandono de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con sobrepeso, obesidad y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos publicados por la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos es de 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos). En la dieta mexicana, el frijol se ha consumido junto al maíz (en forma de tortilla), siendo esto la complementación del consumo de un cereal con una leguminosa, teniendo así un mejor balance de aminoácidos y buena calidad de proteína vegetal. Se ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patente en trámite), que busca diversificar el uso del frijol negro. De acuerdo a sus propiedades es posible utilizarlo como un ingrediente funcional en alimentos como productos de

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

panificación, cárnicos y bebidas (Salinas, 2014). Por otra parte se ha evaluado este concentrado de frijol, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1, obteniendo los siguientes resultados aumento de peso de los animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado de frijol puede ser considerada de buena calidad. Se obtuvo menor relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1, por lo que el aislado de frijol generó un efecto hipolipidémico. Este concentrado de proteína tiene ciertamente disminuido su contenido de almidón y de antocianinas, y probablemente también sus compuestos fenólicos, pero tiene alrededor de un 70% de proteína que pudiera ser una buena fuente de proteína. Mientras que el frijol entero tiene menor contenido de proteína pero mayor contenido de almidones resistentes que pudieran modificar la microbiota. En este estudio tiene la finalidad de conocer mejor las propiedades del concentrado ya desarrollado, y evaluar el efecto antihiperlipidémico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad así como el efecto del frijol entero.

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

**Categoría A**

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

**Categoría B.**

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

**Categoría C**

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

**Categoría D**

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

**Categoría E**

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

Para mas información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

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

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

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

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=7, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes; de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

**6)** Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

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

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	42	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:	6			
No. de animales por grupo:	7			
No. TOTAL DE ANIMALES:	42			

**8)** Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 4 y 5 meses.

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

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.			
Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.		X	Dos veces una semana antes de la eutanasia y horas antes de la misma
Toma de muestra sanguínea.		X	Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	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.

A) Se utilizarán 6 grupos con una n=7 por grupo, en total 42 ratas Wistar. Las dietas se prepararan en el planta piloto del Depto. de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ

Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10

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

Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Cáseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	5.0
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colirfa bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014
Manteca	17

Tratamiento 3: Dieta con 20% de proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 4 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 5: Dieta con frijol entero.

Tratamiento 6 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + frijol entero.

B) Para estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 4 meses.

Durante los 4 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana.

Al término del 4to mes, se realizará una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) después de un ayuno de toda la noche, al administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta de acuerdo a lo previamente reportado (Chávez-Santoscoy, 2014), así como la determinación de parámetros bioquímicos séricos (glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), bajo anestesia con sevoflurano.

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

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior al consumo de las dietas. Se extraerá el DNA de la muestra y se llevará a cabo la amplificación del gen 16S de phylas específicas por medio de PCR cuantitativo utilizando primers específicos para cada phyla.

Transcurridos los 4 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO<sub>2</sub> previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la acumulación de grasa

C) El tamaño de la muestra será de 7 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas serán machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

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

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevoflurano		Inhalada	1 vez

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

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

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

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

No habrá procedimientos quirúrgicos.

15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

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			

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

**Criterios de punto final**

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

- a. Variación de peso corporal:
  1. Aceptable una disminución del 5-10%
  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

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

normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

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

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO<sub>2</sub>)

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

Sobredosis con anestesia inhalado (sevofluorano)

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

18) 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)

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

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.



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

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

Nombre y firma del Investigador Responsable

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Nimbe Torres y Torres

<b>Integrantes de la CINVA</b>	<b>Cargo</b>	<b>Firma</b>
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 Externo	



Recibí  
Laura Zavelle R.  
Feb 8, 2016.

Acuse

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN

México, D. F., a 5 de febrero de 2016.

**Dra. Nimbe Torres y Torres**

Depto. Fisiología de la Nutrición

Presente.

FEB 2016  
R14678  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
EN ANIMALES

REF: CINVA-1744 FNU-1744-16/18-1

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante”**

Este comité ha dictaminado **APROBARLO CON UNA OBSERVACIÓN:**

1. El proyecto no podrá iniciarse hasta que se entregue el FAEP debidamente firmado por el investigador responsable. Se aprueba el uso de 42 ratas Wistar macho más un 10% para cubrir pérdidas, a reserva del espacio y equipo en el DIEB.

Sin más por el momento quedo de usted.

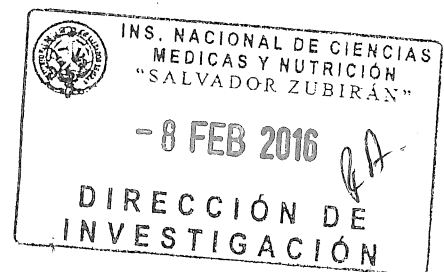
Atentamente,

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 DIEB

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

NAB/nom





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F., a 13 de Enero del 2016

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Presente.

REF: CINVA 1744, Clave: FNU-1744-16/18-1

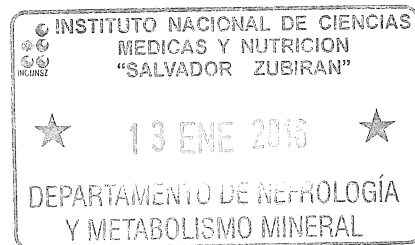
Estimada Dra. Bobadilla

Por medio de la presente aclaro las observaciones realizadas por el comité al Protocolo de Investigación Experimental Titulado

“Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante”.

1. En donde se indica que los animales serán sometidos a procedimientos refinados esto indica el seguimiento de las 3 R que significa reemplazo, reducción y refinación. En este proyecto en los que la angustia o el dolor generado será mínimo o nulo, se hace referencia a pruebas de composición corporal y calorimetría donde los animales no sufriran dolor o angustia
2. Se cambió la redacción a primera persona y también se modifico el término frijol cocido a frijol entero.
3. Solo se harán dos restricciones de alimento durante 6-8 horas una para realizar una curva de tolerancia a la glucosa, una semana antes de la eutanasia y la segunda será horas antes de la eutanasia.
4. Respecto a los grupos experimentales, quedan de la siguiente manera:
  - Tratamiento 1: Grupo control. Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5



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



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

- Tratamiento 2: Dieta Alta en Grasa Saturada y colesterol

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

- Tratamiento 3: Dieta control, sustituyendo la caseína por proteína de frijol
- Tratamiento 4: DAGS, sustituyendo la caseína por proteína de frijol
- Tratamiento 5: Dieta control incluyendo frijol entero
- Tratamiento 6: DAGS con frijol entero



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

5. Las instituciones participantes y colaboradores ya se habían indicado en el formato de latis, pero se anexan a continuación

- Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
- Departamento de Alimentos y biotecnología, Facultad de Química, UNAM

Investigador	Posición institucional	Posición en el Proyecto	Tel. (ext)	Correo-E
Nimbe Torres y Torres	Investigadora en Ciencias Médicas F	Investigadora responsable	2802	Ó
Armando Roberto Tovar Palacio	Jefe de Departamento Fisiología de la Nutrición	Investigador asociado	2802	
Amanda Gálvez Mariscal	Profesora-Investigadora de TC, UNAM	Investigador invitado	56225344	galvez@unam.mx
CE	Estudiante de posgrado	Estudiante de maestría	2802	Ó

Atentamente,

Dra Nimbe Torres y Torres



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

**No. CINVA:**

**CLAVE: FNU-1744-16/18-1**

**Fecha de registro del Protocolo: 15-10-15**

**Título del Protocolo:** Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante

**Propuesta:**      a) ~~Nueva~~      b) Renovación.

<b>Investigador Responsable del Proyecto.</b>	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres y Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ó

<b>Investigadores que Participaran en el Protocolo</b>			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ó
María Amanda Gálvez Mariscal	Doctor	56225344	galvez@unam.mx

<b>Estudiantes</b>			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	Maestra	56225344	Ó

<b>Vigencia del Proyecto.</b>			
Fecha de inicio del proyecto		Enero	2016
Fecha tentativa de finalización.		Enero	2018



**PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.**

1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

**Principal**

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol entero en un modelo de obesidad (Rata Wistar).

**Objetivos Particulares**

1) Estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro en un modelo de obesidad, sobre:

- Parámetros bioquímicos en suero: Glucosa, insulina, LDL, colesterol.
- Ganancia de peso
- Curva de tolerancia a la glucosa.
- Evaluar la existencia de inflexibilidad metabólica mediante la determinación del coeficiente respiratorio y la composición corporal.
- Efecto en la microbiota intestinal.
- Determinación de la composición corporal

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

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional. En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en el mercado mexicano; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo paso de ser 18 kg/ persona/año a 10 kg/ persona/ año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos y el abandono de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con sobrepeso, obesidad y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos publicados por la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos es de 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos). En la dieta mexicana, el frijol se ha consumido junto al maíz (en forma de tortilla), siendo esto la complementación del consumo de un cereal con una leguminosa, teniendo así un mejor balance de aminoácidos y buena calidad de proteína vegetal. Se ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patente en trámite), que busca diversificar el uso del frijol negro. De acuerdo a sus propiedades es posible utilizarlo como un ingrediente funcional en alimentos como productos de



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

panificación, cárnicos y bebidas (Salinas, 2014). Por otra parte se ha evaluado este concentrado de frijol, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1, obteniendo los siguientes resultados aumento de peso de los animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado de frijol puede ser considerada de buena calidad. Se obtuvo menor relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1, por lo que el aislado de frijol generó un efecto hipolipidémico. Este concentrado de proteína tiene ciertamente disminuido su contenido de almidón y de antocianinas, y probablemente también sus compuestos fenólicos, pero tiene alrededor de un 70% de proteína que pudiera ser una buena fuente de proteína. Mientras que el frijol entero tiene menor contenido de proteína pero mayor contenido de almidones resistentes que pudieran modificar la microbiota. En este estudio tiene la finalidad de conocer mejor las propiedades del concentrado ya desarrollado, y evaluar el efecto antihiperlipidémico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad así como el efecto del frijol entero.

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

##### **Categoría A**

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

##### **Categoría B.**

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

##### **Categoría C**

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

##### **Categoría D**

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

##### **Categoría E**

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

Para mas información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

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





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

- 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 consultar:**

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

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=7, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

- 6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

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

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	42	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		6		
No. de animales por grupo:		7		
No. TOTAL DE ANIMALES:		42		

- 8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 4 y 5 meses.



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

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.			
Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.		X	Dos veces una semana antes de la eutanasia y horas antes de la misma
Toma de muestra sanguínea.		X	Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	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.

A) Se utilizarán 6 grupos con una n=7 por grupo, en total 42 ratas Wistar. Las dietas se prepararan en el planta piloto del Depto. de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ

Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10



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

Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	5.0
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014
Manteca	17

Tratamiento 3: Dieta con 20% de proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 4 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 5: Dieta con frijol entero.

Tratamiento 6 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + frijol entero.

B) Para estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad. Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 4 meses.

Durante los 4 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana.

Al término del 4to mes, se realizará una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) después de un ayuno de toda la noche, al administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta de acuerdo a lo previamente reportado (Chávez-Santoscoy, 2014), así como la determinación de parámetros bioquímicos séricos (glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), bajo anestesia con sevoflurano.



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

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior al consumo de las dietas. Se extraerá el DNA de la muestra y se llevará a cabo la amplificación del gen 16S de phylas específicas por medio de PCR cuantitativo utilizando primers específicos para cada phyla.

Transcurridos los 4 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO<sub>2</sub> previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la acumulación de grasa

C) El tamaño de la muestra será de 7 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas serán machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

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

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevoflurano		Inhalada	1 vez

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

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.



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

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

No habrá procedimientos quirúrgicos.

- 15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

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			

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

### Criterios de punto final

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

- a. Variación de peso corporal:
  1. Aceptable una disminución del 5-10%
  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



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

normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

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

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO<sub>2</sub>)

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

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

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 <sup>s</sup>	Pentobarbital Pistola de perno cautivo <sup>s</sup> 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

18) 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)

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

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.



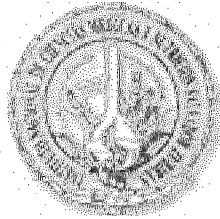
**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.**

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

Nombre y firma del Investigador Responsable

\_\_\_\_\_   
 Dra. Nimbe Torres y Torres

<b>Integrantes de la CINVA</b>	<b>Cargo</b>	<b>Firma</b>
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 Externo	



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ  
INSTITUCIONAL DE  
INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA EN  
HUMANOS

FORMATO DE  
EVALUACIÓN  
DE PROYECTO  
DE  
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: FNU-1744-16/18-1

### 1. Título del proyecto

Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concent antihiper glucemiante.

### 2. Investigadores

#### 2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
GÁLVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA		Investigador asociado		galvez@unam.n
<b>CE</b>		Investigador invitado		<b>O</b>
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

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

### 3. Instituciones participantes

- Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional
- Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México

### 4. Patrocinio

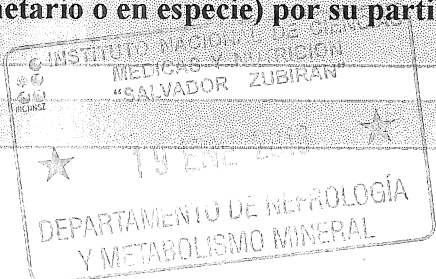
#### 4a. Organismos patrocinadores

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

### 5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

ANTECEDENTES:





## **El Frijol en la dieta tradicional mexicana**

Para México, el frijol es un producto estratégico en el desarrollo rural del país, debido a que conjuntamente con el maíz es la tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le ha permitido hasta la actualidad (SIAP, 2012). Su presencia a lo largo de la historia de México, lo ha convertido no sólo en un alimento sino también en un elemento de identificación cultural, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de ayer, hoy y futuro (SIAP, 2012).

## **Composición nutrimental y principios bioactivos del frijol**

*Phaseolus vulgaris* es una de las leguminosas más consumidas alrededor del mundo. Los frijoles son una excelente fuente de carbohidratos, fibra dietaria, vitaminas, minerales y fitoquímicos.

Los carbohidratos son el mayor componente, su contenido en la semilla es de 50% - 76% dependiendo de la variedad. El almidón es el de mayor proporción, el cual representa del 32% al 52% y la fibra dietética total representa de 15 a 45%. El contenido de la semilla seca varía entre 17-30%, de 2 a 5% de minerales (entre ellos Potasio, Fósforo, Calcio, Hierro, Sodio y Selenio) y vitaminas (Vitamina C, Niacina, Colina, Vitamina K y Vitamina E (Ramírez et al., 2015; USDA, 2015).

El frijol tiene un bajo índice glicémico (IG), es decir, que después de que se consume, a pesar de su alto contenido de carbohidratos, no eleva marcadamente la glucosa en sangre. Presenta un IG=30 y cuando se combina con tortilla y sal, su índice glicémico se mantiene bajo (IG=39), cuando la tortilla sola puede tener hasta un IG de 52 (Foster-Powell *et al.*, 2002).

Los frijoles son una fuente importante de componentes bioactivos que promueven diversos efectos benéficos para la salud. Entre los compuestos más relevantes son los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a su actividad antioxidante y anticarcinogénica; polisacáridos no digeribles e inhibidores de enzimas, además de un potencial bifidogénico, y propiedades antihipertensivas, saponinas y fitoesteroles, los cuales se ha confirmado que tienen beneficios hipolipídicos (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Los carbohidratos no digeribles presentes en el frijol negro incluyen almidones resistentes y hemicelulosa.

Estos componentes sufren fermentación mediante la microbiota presente en el colon, dando como resultado final la generación de ácidos grasos de cadena corta, como acético, butírico y propiónico. El acetato y propionato actúan como moduladores del metabolismo de la glucosa, ya que generan una menor respuesta glicémica al consumo de glucosa esto debido a que mejoran la sensibilidad de la insulina (Guarner *et al.*, 2003). A su vez provocan la disminución de los niveles de colesterol (Campos-Vega *et al.*, 2009).

La fibra dietética insoluble presente en el frijol negro (celulosa y hemicelulosa), ayuda a prevenir la constipación y baja el índice glicémico. Se ha encontrado que la fibra dietética mejora los niveles de lípidos séricos mediante la inhibición parcial de la absorción de colesterol en el intestino (Campos-Vega *et al.*, 2015; Sanchez-Muñiz, 2012).

A pesar de que el frijol en general se considera también como una fuente importante de

importante mencionar que su contenido de almidón forma parte de la fracción no digerible. El almidón resistente es la porción del almidón que no puede ser degradado por las enzimas humanas por lo que este transita hacia el colon sin ser digerido. Las propiedades de este almidón se alteran mediante la cocción, debido a la gelatinización que ocurre cuando el almidón está en presencia de agua y al proceso de retrogradación causado por la cristalización de la amilosa al enfriamiento.

Diversos estudios sugieren que la utilización de almidón resistente en la dieta mejora la salud. Este almidón estimula la producción de ácidos grasos de cadena corta, particularmente butirato, el cual tiene beneficios en la salud del colon. Además el consumo de almidón resistente en la dieta resulta en un menor aumento de glucosa liberada durante la digestión, siendo así un componente aceptado en la dieta de personas diabéticas.

El consumo de frijol en la dieta puede influenciar el grupo de microorganismos que proliferan en el tracto gastrointestinal, ya que los glicanos procedentes de la dieta podrían ser un factor que influye en el balance de las especies en la microbiota. Esto debido a que el tipo de almidón resistente presentes son degradados por especies microbianas que difieren en su capacidad de degradar diferentes glicanos.

### **Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal tiene un rol de simbiosis, ayudando al ser humano a digerir los alimentos que nosotros no podemos degradar.

Los microorganismos presentes en el intestino distal son miles de millones de organismos pertenecientes a los reinos bacteria y archaea. *Bacteroidetes* y *Firmicutes* forman parte de más del 90% de la microbiota intestinal en humanos y en ratones (Guo et al., 2008).

Existen diferentes especies microbianas que difieren en sus preferencias por diferentes nutrientes. El consumo selectivo de nutrientes puede influenciar el grupo de microorganismos que proliferan en el tracto gastrointestinal, es decir que los glicanos procedentes de la dieta podría ser un factor que influye en el balance de las especies en la microbiota (Koropatkin et al., 2011).

Los polímeros de glicanos están unidos mediante diferentes enlaces glicosídicos, por lo que su degradación requiere diversas enzimas capaces de degradar los enlaces específicos. Algunos microorganismos presentes en el tracto intestinal poseen las enzimas necesarias para despolimerizar varios tipos de glicanos hasta obtener sus azúcares básicos. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* puede degradar más de una docena de tipos de glicanos, mientras que muchas especies solo pueden degradar uno o pocos tipos.

*B. thetaiotaomicron* requiere de un locus de 8 genes que codifican para el sistema Sus (Sus system) para metabolizar el almidón. Los productos de este sistema están localizados en la membrana externa y en el espacio periplásmico de la bacteria. Actúa mediante la unión del almidón a la membrana externa donde se degrada a oligosacáridos, los cuales son transportados al espacio periplásmico y degradados a azúcares simples como la glucosa, e importado a la célula.

La secuenciación del genoma de *B. thetaiotaomicron* ha revelado la presencia de 88 clústeres, siendo que cada uno posee homólogos al menos de 2 de los genes (*SusC* y *SusD*) presentes en *Sus*. Estos loci son denominados como locus de utilización de polisacáridos (PULs), comprenden abarcan el 18% de los genes totales de esta bacteria; los cuales se denominan como un sistema similar a *Sus* (*Sus*-like system). Esto debido a que funcionan de una manera similar a *Sus* y alberga a genes que codifican para enzimas que degradan otros tipos de glicanos diferentes.

Diversos estudios han descrito que existe una posible relación entre la microbiota intestinal y el peso en los individuos. Se han estudiado grupos de personas obesas, encontrando que el material genético de *Firmicutes* en heces es mayor que la encontrada en individuos delgados. En los individuos obesos pierden peso durante un año, la proporción de *Firmicutes* se vuelve más similar a la de los individuos delgados. Los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son phylas pertenecientes al dominio Bacteria. La mayoría de microorganismos pertenecientes a estos son benignos, sin embargo existen algunos patógenos (Bajzer et al., 2006).

#### **DEFINICION DE PROBLEMAS :**

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que tiene una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional.

En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en México; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo pasó de ser 18 kg/ persona/año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con obesidad y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos por la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México es de 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos). Por lo que es necesario evaluar el efecto metabólico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad.

#### **JUSTIFICACION :**

Justificación

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional. En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en el mercado mexicano; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo pasó de ser 18 kg/ persona/año a 10 kg/ persona/año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con sobrepeso y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos publicados por la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos es de 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos). Por lo que es necesario evaluar el efecto metabólico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad. El frijol es un cereal con una leguminosa, teniendo así un mejor balance de aminoácidos y buena calidad de proteína. Por lo que se ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patente en trámite), que busca diversificar el uso del frijol aprovechando sus propiedades es posible utilizarlo como un ingrediente funcional en alimentos como productos de panadería y bebidas (Salinas, 2014). Por otra parte se ha evaluado este concentrado de frijol, caracterización fisicoquímica, concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1, obteniendo los siguientes resultados en ratones animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado de frijol puede ser considerada de buena calidad. El aislado de frijol mostró una relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1, por lo que el aislado de frijol puede ser considerado como un ingrediente funcional en alimentos.

hipolipidémico. Este concentrado de proteína tiene ciertamente disminuido su contenido de almidón probablemente también sus compuestos fenólicos, pero tiene alrededor de un 70% de proteína que pudiera de proteína. Mientras que el frijol entero tiene menor contenido de proteína pero mayor contenido de almidón que pudieran modificar la microbiota. En este estudio tiene la finalidad de conocer mejor las propiedades desarrolladas, y evaluar el efecto antihiperlipidémico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* como el efecto del frijol entero.

## 6a. Hipótesis

El consumo de una dieta con fuente de proteína procedente de un concentrado de frijol negro tendrá una menor actividad antihiperglucemiante en ratas obesas y modificará las principales phylas de la microbiota.

## 6b. Objetivos

General:

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol entero en un modelo de obesidad (Rata Wistar).

Específicos:

1) Estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro en un modelo de obesidad sobre:

- Parámetros bioquímicos en suero: Glucosa, insulina, LDL, colesterol.
- Ganancia de peso
- Curva de tolerancia a la glucosa.
- Evaluar la existencia de inflexibilidad metabólica mediante la determinación del consumo de oxígeno respiratorio y la composición corporal.
- Efecto en la microbiota intestinal.
- Determinación de la composición corporal

## 7. Metodología: Diseño general.

A) Se utilizarán 6 grupos con una n=7 por grupo, en total 42 ratas Wistar. Las dietas se prepararán en el laboratorio.

de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ

Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American

<b>Dieta AIN-93 (CONTROL)</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>%</b>
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

<b>DAGS</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>%</b>
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	5.0
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014
Manteca	17

Tratamiento 3: Dieta con 20% de proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 4 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 5: Dieta con frijol entero.

Tratamiento 6 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + frijol entero.

B) Para estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol en un modelo animal de OI ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de humedad.

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 4 meses.

Durante los 4 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana.

Al término del 4to mes, se realizará una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) después de un ayuno administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente calórico mediante una calorimetría indirecta de acuerdo a lo previamente reportado (Chávez-Santosco determinación de parámetros bioquímicos séricos (glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL anestesia con sevoflurano.

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior al consumo de las dietas de la muestra y se llevará a cabo la amplificación del gen 16S de phylas específicas por medio de PCR primers específicos para cada phyla.

Transcurridos los 4 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con  $\text{CO}_2$  cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon y el tejido adiposo visceral (gon localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en n almacenarán a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de l en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígad destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la acumulación de grasa

C) El tamaño de la muestra será de 7 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostró mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas serán machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

## **8. Metodología: Criterios de selección**

A) Ratas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se eliminarán del estudio las ratas que no aumenten de peso o que presenten comparación con las ratas que reciban esta dieta.

### 9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Insulina	Cuantificación por RIA	Suero	Cuantitativa continua	ng/mL

### 10. Riesgos y beneficios del estudio

#### BENEFICIO DIRECTO:

Poder conocer la capacidad antihiper glucemiante de un concentrado de proteína de frijol r

#### BENEFICIOS INDIRECTOS:

Conocer los mecanismo de acción de los alimentos funcionales en un modelo de obes dieta.

#### RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguna

EFFECTOS ADVERSOS : Ninguna

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguna

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración control del peso y consumo de alimento.

PROCEDIMIENTOS : Consulta con el médico veterinario

OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

## 11. Costos

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

## 12. Citas bibliográficas

- Bajzer, M. & Seeley, R. (2006). Obesity and gut flora. *Nature.*, 44: 21-28.
- Eckel, R. & Grundy S. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.*, 365:1415-28.
- Foster-Powell, K.; Sha Holt and JC Brand-Miller, "International table of glycemic index and glycemic load values: 2002, 76, pp. 5-56.
- Guarner, F. & Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 360: 512-519.
- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J. & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology.*, 47 : 367-3
- Koropatkin, N., Camero, E. & Martens, E. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature* 10:323-335.
- OMS (Organización Mundial de la salud, 2015a). Obesidad y sobrepeso; Nota descriptiva N 311. Consultada el 10 de en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Quiñones, A. (2010). Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto insulina y expresión génica de SREBP-1. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM
- Ramirez, A.; Reynoso, R; Loarca, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipid Food Research International. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.002>
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera; 2012). Cierre de la producción agrícola por cultivo y Consultado el 10 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>
- Salinas, G. (2014). Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijo negro (*Phaseolus vulgaris*) vari aplicación en formulaciones de alimentos. Tesis profesional. México: Facultad de Química, UNAM.





INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

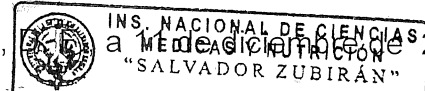
*Laura Zavala R*  
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

*Acuse*

2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón

DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

México,



15 DIC 2015  
DIRECCIÓN DE  
INVESTIGACIÓN

**Dra. Nimbres Torres y Torres**

Depto. Fisiología de la Nutrición  
Presente.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

INCMNSZ



15 DIC 2015

12 31

DEPARTAMENTO DE  
INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
Y BIOTERIOLOGÍA

REF: CINVA-1744 FNU-1744-16/18-1

Estimada Dra. Torres.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

**“Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiper glucemiante”.**

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

1. Se indica que: “los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo”, describir a que se refieren con procedimientos refinados
2. El proyecto es descrito en tercera persona, refiriéndose a la Dra. Torres y Dr. Tovar y no parece haber sido elaborado por la investigadora responsable.
3. En la parte de restricción de agua y/o alimento por ocho horas indican que no se realizará. Sin embargo, si se pretende cuantificar parámetros bioquímicos que muy probablemente los animales serán sometidos a periodos de ayuno previo a la prueba. Favor de especificar.
4. No es clara la descripción de los grupos experimentales. En el tratamiento 5, únicamente se aclara que se dará una dieta con frijol cocido, se asume que es la dieta control donde se sustituye la proteína por el frijol cocido. Es importante aclarar este punto.
5. Agregar las instituciones que participan y colaboradores externos, así como el papel que desempeñará cada uno en la realización del estudio.

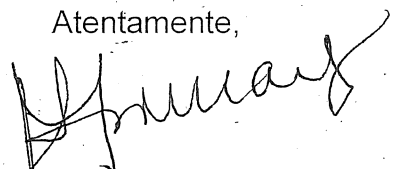
Es importante que las correcciones las hagan en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo

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

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 Ó

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:

CLAVE: FNU-1744-16/18-1

Fecha de registro del Protocolo: 15-10-15

Título del Protocolo: Evaluación *in vivo* en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concentrado de frijol: capacidad antihiperoglucemiante

Propuesta: a) ~~Nueva~~ b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ó

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ó
María Amanda Gálvez Mariscal	Doctor	56225344	galvez@unam.mx

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	Maestra	56225344	Ó

Vigencia del Proyecto.			
Fecha de inicio del proyecto		Enero	2016
Fecha tentativa de finalización.		Enero	2018



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

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"

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

**Principal**

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol cocido en un modelo de obesidad (Rata Wistar).

**Objetivos Particulares**

1) Estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro en un modelo de obesidad, sobre:

- Parámetros bioquímicos en suero: Glucosa, insulina, leptina, LDL, colesterol.
- Ganancia de peso
- Curva de tolerancia a la glucosa.
- Evaluar la existencia de inflexibilidad metabólica mediante la determinación del coeficiente respiratorio y la composición corporal.
- Efecto en la microbiota intestinal.
- Determinación de la composición corporal

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

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional.

En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en el mercado mexicano; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo paso de ser 18 kg/ persona/año a 10 kg/ persona/ año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos y el abandono de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población con sobrepeso, obesidad y enfermedades



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

relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos publicados por la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México en adultos es de 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos).

En la dieta mexicana, el frijol se ha consumido junto al maíz (en forma de tortilla), siendo esto la complementación del consumo de un cereal con una leguminosa, teniendo así un mejor balance de aminoácidos y buena calidad de proteína vegetal.

El equipo de la Dra. Gálvez ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patente en trámite), que busca diversificar el uso del frijol negro. De acuerdo a sus propiedades es posible utilizarlo como un ingrediente funcional en alimentos como productos de panificación, cárnicos y bebidas (Salinas, 2014).

En el grupo de trabajo de la Dra. Torres y el Dr. Tovar, se evaluó este concentrado de frijol mediante el uso de un modelo animal, en la tesis de Maestría de Quiñones titulada Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1 (Quiñones, 2010), obteniendo los siguientes resultados:

- Aumento de peso de los animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado de frijol puede ser considerada de buena calidad.
- El aumento de glucosa en sangre fue similar al de la soya, siendo ambos (aislado de frijol y soya) más lentos en comparación con la proteína de origen animal (caseína).
- Se obtuvo menor relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1, por lo que el aislado de frijol generó un efecto hipolipidémico.

Este concentrado de proteína tiene ciertamente disminuido su contenido de almidón y de antocianinas, y probablemente también sus compuestos fenólicos, pero tiene alrededor de un 70% de proteína, cuyo papel en el metabolismo se está estudiando actualmente por el grupo de los Dres. Tovar y Torres. Los estudios arriba mencionados del trabajo de Alejandra Quiñones indican un interesante comportamiento de la proteína del concentrado en el metabolismo de grasas.

En este estudio con la finalidad de conocer mejor las propiedades del concentrado ya desarrollado, se busca evaluar el efecto bioquímico y metabólico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad.

- 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.



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

### Categoría B.

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

### Categoría C

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

### Categoría D

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

### Categoría E

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

Para más información consultar: [www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf](http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf)

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

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

**Para mayor información consultar:**

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

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=6, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

- 6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.



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

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

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	36	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:	6			
No. de animales por grupo:	6			
No. TOTAL DE ANIMALES:	36			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.  
 Los animales permanecerán en el bioterio entre 4 y 5 meses.

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			



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

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.

A) Se utilizarán 6 grupos con una n=6 por grupo, en total 36 ratas Wistar. Las dietas se prepararan en el planta piloto del Depto. de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ

Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacárosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	5.0
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014
Manteca	17

Tratamiento 3: Dieta con 20% de proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 4 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + proteína procedente del concentrado de





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

frijol negro.

Tratamiento 5: Dieta con frijol cocido.

Tratamiento 6 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + frijol cocido.

B) Para estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol en un modelo animal de OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 4 meses.

Durante los 4 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana.

Al término del 4to mes, se realizará una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) después de un ayuno de toda la noche, al administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. También se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta de acuerdo a lo previamente reportado (Chávez-Santoscoy, 2014), así como la determinación de parámetros bioquímicos séricos (glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina), bajo anestesia con sevoflurano.

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior al consumo de las dietas. Se extraerá el DNA de la muestra y se llevará a cabo la amplificación del gen 16S de phylas específicas por medio de PCR cuantitativo utilizando primers específicos para cada phyla.

Transcurridos los 4 meses, las ratas serán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con  $\text{CO}_2$  previo a una punción cardíaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la acumulación de grasa.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes.

D) Las ratas serán machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

- 11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.



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

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

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevoflurano		Inhalada	1 vez

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

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

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

No habrá procedimientos quirúrgicos

15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

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			



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

e) Conducta provocada.	X			
------------------------	---	--	--	--

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

**Criterios de punto final**

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

- a. Variación de peso corporal:
  - 1. Aceptable una disminución del 5-10%
  - 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.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

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

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO<sub>2</sub>)

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

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

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



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

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

18) 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)

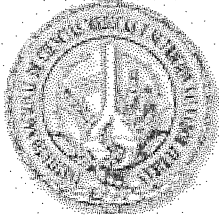
19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?  
 Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

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

Nombre y firma del Investigador Responsable

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Nimbe Torres y Torres

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



Instituto Nacional de Ciencias  
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ  
INSTITUCIONAL DE  
INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA EN  
HUMANOS

**FORMATO DE  
EVALUACIÓN  
DE PROYECTO  
DE  
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH: FNU-1744-16/18-1

**1. Título del proyecto**

Evaluación in vivo en un modelo murino de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta de un concent antihiperglucemiante.

**2. Investigadores**

**2a. Identificación**

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
GÁLVEZ MARISCAL MARÍA AMANDA		Investigador asociado		galvez@unam.n
<b>CE</b>		Investigador invitado		<b>O</b>
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

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

**3. Instituciones participantes**

- Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional
- Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
- Universidad Nacional Autónoma de México
- Universidad Nacional Autónoma de México

**4. Patrocinio**

**4a. Organismos patrocinadores**

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

**5. Marco teórico**

ANTECEDENTES:

ANTECEDENTES:

## **El Frijol en la dieta tradicional mexicana**

Para México, el frijol es un producto estratégico en el desarrollo rural del país, debido a que conjuntamente con el maíz es la tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y socioeconómico que le han dado hasta la actualidad (SIAP, 2012). Su presencia a lo largo de la historia de México, lo ha convertido no sólo en un alimento, sino también en un elemento de identificación cultural, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de ayer, hoy y mañana (SIAP, 2012).

## **Composición nutrimental y principios bioactivos del frijol**

*Phaseolus vulgaris* es una de las leguminosas más consumidas alrededor del mundo. Los frijoles son una excelente fuente de carbohidratos, fibra dietaria, vitaminas, minerales y fitoquímicos.

Los carbohidratos son el mayor componente, su contenido en la semilla es de 50% - 76% dependiendo de la variedad. El almidón es el de mayor proporción, el cual representa del 32% al 52% y la fibra dietética total representa de 15 a 45%. El contenido de la semilla seca varía entre 17-30%, de 2 a 5% de minerales (entre ellos Potasio, Fósforo, Calcio, Hierro, Sodio y Selenio) y vitaminas (Vitamina C, Niacina, Colina, Vitamina K y Vitamina E (Ramírez et al., 2015; USDA, 2015).

El frijol tiene un bajo índice glicémico (IG), es decir, que después de que se consume, a pesar de su alto contenido de carbohidratos, no eleva marcadamente la glucosa en sangre. Presenta un IG=30 y cuando se combina con tortilla y sal, el índice glicémico se mantiene bajo (IG=39), cuando la tortilla sola puede tener hasta un IG de 52 (Foster-Powell *et al.*, 2002).

Los frijoles son una fuente importante de componentes bioactivos que promueven diversos efectos benéficos para la salud. Entre los compuestos más relevantes son los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a su actividad antioxidante, anticarcinogénica; polisacáridos no digeribles e inhibidores de enzimas, además de un potencial bifidogénico, y propiedades antihipertensivas, saponinas y fitoesteroles, los cuales se ha confirmado que tienen beneficios hipolipídicos (Ramírez et al., 2015).

Los carbohidratos no digeribles presentes en el frijol negro incluyen almidones resistentes y hemicelulosa.

Estos componentes sufren fermentación mediante la microbiota presente en el colon, dando como resultado final la generación de ácidos grasos de cadena corta, como acético, butírico y propiónico. El acetato y propionato actúan como moduladores del metabolismo de la glucosa, ya que generan una menor respuesta glicémica al consumo de glucosa esto debido a que generan una mayor sensibilidad de la insulina (Guarner et al., 2003). A su vez provocan la disminución de los niveles de colesterol (Campos-Vega et al., 2009).

La fibra dietética insoluble presente en el frijol negro (celulosa y hemicelulosa), ayuda a prevenir la constipación y baja el índice glicémico. Se ha encontrado que la fibra dietética mejora los niveles de lípidos séricos mediante la inhibición parcial de la absorción de colesterol en el intestino (Campos-Vega et al., 2015; Sanchez-Muñiz, 2012).

A pesar de que el frijol en general se considera también como una fuente importante de

importante mencionar que su contenido de almidón forma parte de la fracción no digerible. El almidón resistente es la porción del almidón que no puede ser degradado por las enzimas humanas por lo que este transita hacia el colon sin ser digerido. Las propiedades de este almidón pueden alterarse mediante la cocción, debido a la gelatinización que ocurre cuando el almidón está en presencia de agua y al proceso de retrogradación causado por la cristalización de la amilosa al enfriamiento.

Diversos estudios sugieren que la utilización de almidón resistente en la dieta mejora la salud al estimular la producción de ácidos grasos de cadena corta, particularmente butirato, el cual tiene beneficios en la salud del colon. Además el consumo de almidón resistente en la dieta resulta en un menor aumento de glucosa liberada durante la digestión, siendo así un componente aceptable para personas diabéticas.

El consumo de frijol en la dieta puede influenciar el grupo de microorganismos que proliferan en el tracto gastrointestinal, ya que los glicanos procedentes de la dieta podrían ser un factor que influyen en el balance de las especies en la microbiota. Esto debido a que el tipo de almidón resistente presentes son degradadas por especies microbianas que difieren en su capacidad por diferentes glicanos.

### **Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal tiene un rol de simbiosis, ayudando al ser humano a digerir los alimentos que nosotros no podemos degradar.

Los microorganismos presentes en el intestino distal son miles de millones de organismos pertenecientes a los reinos bacteria y archaea. *Bacteroidetes* y *Firmicutes* forman parte de más del 90% de la microbiota intestinal en humanos y en ratones (Guo et al., 2008).

Existen diferentes especies microbianas que difieren en sus preferencias por diferentes nutrientes. El consumo selectivo de nutrientes puede influenciar el grupo de microorganismos que proliferan en el tracto gastrointestinal, es decir que los glicanos procedentes de la dieta podría ser un factor que influyen en el balance de las especies en la microbiota (Koropatkin et al., 2012).

Los polímeros de glicanos están unidos mediante diferentes enlaces glicosídicos, por lo que para ser digeridos requiere diversas enzimas capaces de degradar los enlaces específicos. Algunos microorganismos presentes en el tracto intestinal poseen las enzimas necesarias para despolimerizar varios tipos de glicanos hasta obtener sus azúcares básicos. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* puede degradar más de una docena de tipos de glicanos, mientras que muchas especies solo pueden degradar uno o pocos tipos.

*B. thetaiotaomicron* requiere de un locus de 8 genes que codifican para el sistema Sus (Sus system) para metabolizar el almidón. Los productos de este sistema están localizados en el espacio periplásmico de la bacteria. Actúa mediante la unión del almidón en el espacio periplásmico donde se degrada a oligosacáridos, los cuales son transportados al espacio periplásmico y degradados a azúcares simples como la glucosa, e importado a la célula.

La secuenciación del genoma de *B. thetaiotaomicron* ha revelado la presencia de 88 clústeres de genes, siendo que cada uno posee homólogos al menos de 2 de los genes (*SusC* y *SusD*) presentes en *Sus*. Estos loci son denominados como locus de utilización de polisacáridos (PULs), comprenden y abarcan el 18% de los genes totales de esta bacteria; los cuales se denominan como un sistema similar a *Sus* (*Sus*-like system). Esto debido a que funcionan de una manera similar a *Sus* y alberga a genes que codifican para enzimas que degradan otros tipos de glicanos diferentes.

Diversos estudios han descrito que existe una posible relación entre la microbiota intestinal y el peso en los individuos. Se han estudiado grupos de personas obesas, encontrando que el material genético de *Firmicutes* en heces es mayor que la encontrada en individuos delgados. Cuando los individuos obesos pierden peso durante un año, la proporción de *Firmicutes* se vuelve más similar a la de los individuos delgados. Los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son phylas pertenecientes a la mayoría de microorganismos pertenecientes a estos son benignos, sin embargo existen algunos patógenos (Bajzer et al., 2006).

#### **DEFINICION DE PROBLEMAS :**

El frijol en México es un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que tiene una tradición de consumo y producción, así como disponibilidad, accesibilidad y destacable valor nutricional.

En los últimos años el frijol ha presentado una tendencia a la disminución de consumo en México; a lo largo de las últimas tres décadas su consumo pasó de ser 18 kg/ persona/año (SIAP, 2013). Esto debido a las nuevas tendencias de consumo de alimentos y a la pérdida de la dieta tradicional mexicana; teniendo como consecuencia un aumento en la población obesa y enfermedades relacionadas con estos padecimientos como la diabetes. Los datos de la ENSANUT 2012, muestran que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México es del 71.28% (que representa a 48.6 millones de adultos). Por lo que es necesario evaluar el efecto metabólico del consumo del concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad.

#### **JUSTIFICACION :**

##### **Justificación**

En la dieta mexicana, el frijol se ha consumido junto al maíz (en forma de tortilla) como una complementación del consumo de un cereal con una leguminosa, teniendo así un aporte de aminoácidos y buena calidad de proteína vegetal.

El equipo de la Dra. Gálvez ha desarrollado un concentrado de proteína de frijol (Patent pending) que busca diversificar el uso del frijol negro. De acuerdo a sus propiedades es posible utilizarlo como un ingrediente funcional en alimentos como productos de panificación, cárnicos y bebidas (Sánchez et al., 2014).

En el grupo de trabajo de la Dra. Torres y el Dr. Tovar, se evaluó este concentrado de frijol en un modelo *in vivo* de obesidad.



de un modelo animal, en la tesis de Maestría de Quiñones titulada Obtención de un proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y leptina en un modelo animal de obesidad (Quiñones, 2010), obteniendo los siguientes resultados:

- Aumento de peso de los animales similar a la soya, por lo que la proteína del aislado puede ser considerada de buena calidad.
  - El aumento de glucosa en sangre fue similar al de la soya, siendo ambos (aislados) más lentos en comparación con la proteína de origen animal (caseína).
  - Se obtuvo menor relación de insulina/glucagón y disminuyó el factor de transcripción SREBP-1, lo que el aislado de frijol generó un efecto hipolipidémico.
- Este concentrado de proteína tiene ciertamente disminuido su contenido de almidón y probablemente también sus compuestos fenólicos, pero tiene alrededor de un 70% de proteína. En el metabolismo se está estudiando actualmente por el grupo de los Dres. Tovar y Tovar arriba mencionados del trabajo de Alejandra Quiñones indican un interesante efecto de la proteína del concentrado en el metabolismo de grasas.

En este estudio con la finalidad de conocer mejor las propiedades del concentrado de proteína de frijol negro se busca evaluar el efecto bioquímico y metabólico del consumo del concentrado de frijol negro en un modelo animal de obesidad.

## 6a. Hipótesis

El consumo de una dieta con fuente de proteína proveniente de un concentrado de proteína de frijol negro tendrá una actividad antihiper glucemiante en ratas obesas y modificará las principales vías de la obesidad.

## 6b. Objetivos

General:

Determinar el efecto del consumo de un concentrado de proteína de frijol negro y de frijol común en un modelo de obesidad (Rata Wistar).

Específicos:

1) Estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol negro en un modelo animal de obesidad sobre:

- Parámetros bioquímicos en suero: Glucosa, insulina, leptina, LDL, colesterol.

- Ganancia de peso
- Curva de tolerancia a la glucosa.
- Evaluar la existencia de inflexibilidad metabólica mediante la detem. respiratorio y la composición corporal.
- Efecto en la microbiota intestinal.
- Determinación de la composición corporal

### 7. Metodología: Diseño general.

A) Se utilizarán 6 grupos con una n=6 por grupo, en total 36 ratas Wistar. Las dietas se prepararon en la planta piloto del Depto. de Tecnología de Alimentos del INCMNSZ

Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	10.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	5.0
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina bitartrato	0.25
TBHQ	0.0014
Manteca	17

Tratamiento 3: Dieta con 20% de proteína procedente del concentrado de frijol negro.

Tratamiento 4 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + proteína procedente del concentra

Tratamiento 5: Dieta con frijol cocido.

Tratamiento 6 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada + frijol cocido.

B) Para estudiar el efecto del consumo del concentrado de proteína de frijol en un modo se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada (22 de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Los grupos serán alimentados con estas dietas por un periodo de 4 meses.

Durante los 4 meses, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana.

Al termino del 4to mes, se realizará una curva de tolerancia a la glucosa (CTG) después toda la noche, al administrar sacarosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la sacarosa. Se hará la determinación del cociente respiratorio y el gasto calórico mediante una calorimetría indirecta de acuerdo a lo previamente reportado (Chávez-Santoscoy, 2014), así como la determinación de parámetros bioquímicos séricos (glucosa, triglicéridos, insulina, colesterol total, LDL y HDL, leptina),

sevoflurano.

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior a dietas. Se extraerá el DNA de la muestra y se llevará a cabo la amplificación del g específicas por medio de PCR cuantitativo utilizando primers específicos para cada phyla

Transcurridos los 4 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfi a una punción cardíaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, colon visceral (gonadal y retroperitoneal) localizado en la zona inguinal e intercostal de todo muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a  $-70^{\circ}\text{C}$  hast determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes involucrado: así como en la oxidación de ácidos grasos. Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado y destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la acumulación de grasa

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos e genes

D) Las ratas serán machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

## 8. Metodología: Criterios de selección

A) Ratas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se eliminarán del estudio las ratas que no aumenten de peso o que presenten comparación con las ratas que reciban esta dieta.

## 9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de	Suero	Cuantitativa	mg/dl

	triglicéridos por ensayo enzimático		continua	
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Insulina	Cuantificación por RIA	Suero	Cuantitativa continua	ng/mL

## 10. Riesgos y beneficios del estudio

### BENEFICIO DIRECTO:

Poder conocer la capacidad antihiper glucemiante de un concentrado de proteína de frijol r

### BENEFICIOS INDIRECTOS:

Conocer los mecanismo de acción de los alimentos funcionales en un modelo de obes dieta.

### RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguna

EFFECTOS ADVERSOS : Ninguna

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguna

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración control del peso y consumo de alimento.

PROCEDIMIENTOS : Consulta con el médico veterinario

OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

## 11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00

Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

## 12. Citas bibliográficas

- Bajzer, M. & Seeley, R. (2006). Obesity and gut flora. *Nature.*, 44: 21-28.
- Eckel, R. & Grundy S. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.*, 365:1415-28.
- Foster-Powell, K.; Sha Holt and JC Brand-Miller, "International table of glycemic index and glycemic load values: 2002, 76, pp. 5-56.
- Guarner, F. & Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 360: 512-519.
- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J. & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for Firmicutes and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology.*, 47 : 367-3
- Koropatkin, N., Camero, E. & Martens, E. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature* 10:323-335.
- OMS (Organización Mundial de la salud, 2015a). Obesidad y sobrepeso; Nota descriptiva N 311. Consultada el 10 de en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Quiñones, A. (2010). Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto insulina y expresión génica de SREBP-1. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM
- Ramirez, A.; Reynoso, R; Loarca, G. (2015). Potential role of bioactive compounds of *Phaseolus vulgaris* L. on lipids. *Food Research International*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.002>
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera; 2012). Cierre de la producción agrícola por cultivo y Consultado el 10 de marzo de 2015. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>
- Salinas, G. (2014). Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijo negro (*Phaseolus vulgaris*) y su aplicación en formulaciones de alimentos. Tesis profesional. México: Facultad de Química, UNAM.

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