



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Inmunología y Reumatología

México Cd. Mx., a 9 de Julio del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Informe final: CINVA IRE-1829-16/17-1.

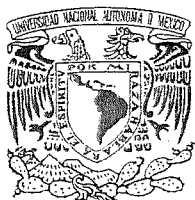
“Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular en ratones C57BL/6”

Este protocolo tenía por objetivo el desarrollo de un suero capaz de inducir nefritis mediada por complejos inmunes para utilizarse como modelo surrogado de nefritis lúpica. Para esto, tres conejos fueron inmunizados en siete ocasiones con extractos glomerulares de ratón, posterior a la 6ta inmunización el suero mostró tener capacidad nefrotóxica, por lo que se inmunizaron por última vez y se sacrificaron como estaba planteado, para obtener el suero. Obtuvimos aproximadamente 150mL de suero, el cual será mantenido en congelación para su uso en proyectos futuros. Se probó en ratones C57BL/6 (usando 50, 100 y 200uL de suero), comprobando su utilidad como un modelo de nefritis mediado por complejos inmunes, por la capacidad de suero de formar complejos inmunes en glomérulos, inducir proteinuria, y cambios histológicos secundarios a la inflamación.

El desarrollo de este modelo formó parte de la tesis de licenciatura de QFB Ada Ramírez Liberia (adjunta) y servirá para realizar otros proyectos en un futuro.

Atentamente,


Dra. Florencia Rosetti
Departamento Inmunología y Reumatología



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

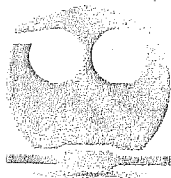
**EVALUACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES GENÉTICAS DE
STAT4 QUE CONFIEREN RIESGO PARA DESARROLLAR
NEFRITIS LÚPICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA

CE



**EXÁMENES PROFESIONALES
MÉXICO, CDMX FACULTAD DE QUÍMICA 2017**

Generación de un modelo experimental murino de glomerulonefritis nefrotóxica.

Los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que las variantes de riesgo tienen un efecto potenciador sobre la expresión de STAT4 lo que tiene como consecuencia incremento en su actividad -fosforilación y producción de IFN- γ . Con el propósito de evaluar estos cambios en un sistema in vivo, se planteó establecer un modelo murino experimental de nefritis inducida por depósito de inmunocomplejos: el modelo de glomerulonefritis nefrotóxica.⁴³

Con este fin, se inmunizaron 3 conejos con lisados glomerulares obtenidos de riñones de ratones C57BL/6. Posterior a 4 inmunizaciones de los conejos, el suero presentó capacidad nefrotóxica leve en ratones C57BL/6: presencia de proteinuria (++) y cambios histológicos moderados de daño renal.

Para comprobar la capacidad nefrotóxica del suero se midió la presencia de proteínas a los días 0, 7, 14 y 21 utilizando tiras reactivas (+/- a ++++). Así, el suero mostró inducir proteinuria leve (++) al día 14 (Figura 13a). Los riñones se colectaron al día 21, posterior a la inyección del suero nefrotóxico para su análisis histológico, mostrando depósitos de complejos inmunes glomerulares (Figura 13b) y cambios moderados inducidos por la inflamación (Figura 13c).

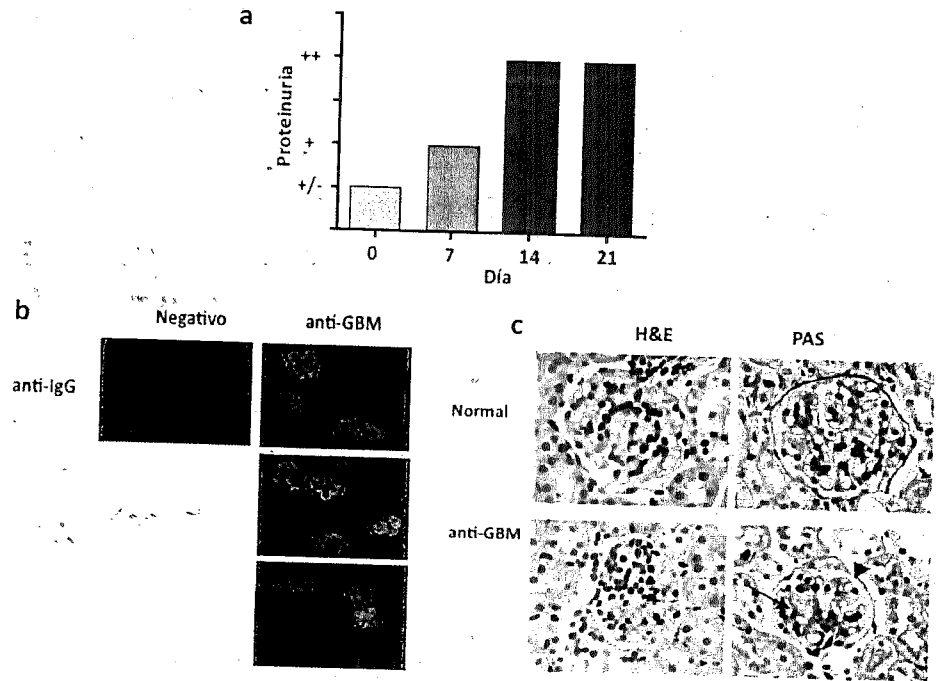


Figura 13. Generación de un suero con propiedades nefrotóxica.

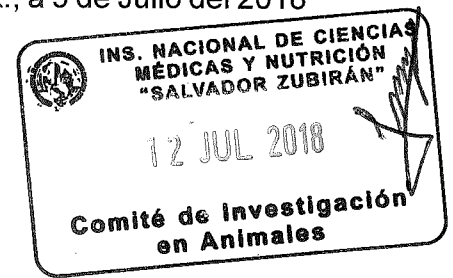
(a) Cuantificación de proteinuria los días 0, 7, 14 y 21 posterior a inoculación del suero nefrotóxico. (b) Evaluación del depósito de IgG de conejo en glomérulos de ratones inoculados. (c) Evaluación histológica (H&E, PAS) de los riñones obtenidos al día 21 posterior a la inyección del suero nefrotóxico, que muestran proliferación mesangial (flecha) y formación de medias lunas (cabeza de flecha).



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Inmunología y Reumatología

México Cd. Mx., a 9 de Julio del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente



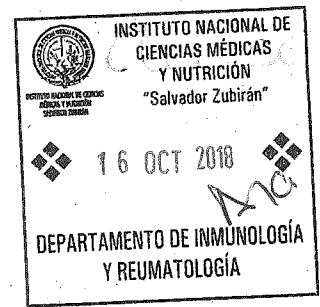
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular en ratones C57BL/6" con registro CINVA IRE-1829-16/17-1 debido a que se ha cumplido el objetivo planteado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente

Dra. Florencia Rosetti
Departamento de Inmunología y Reumatología



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, CdMX., a 15 de octubre de 2018.

DRA. FLORENCIA ROSETTI SCIUTTO
Depto. INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA
P r e s e n t e.

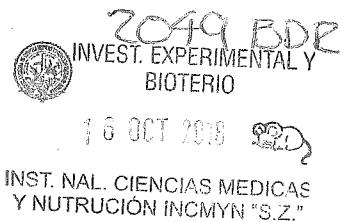
Estimada Dra. Rosetti:

Por este medio, nos permitimos informarle que el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio comentó que hubo un error en la minuta del 5 de octubre de 2106 en el protocolo IRE-1829-16/17-1, intitulado **"GENERACIÓN DE SUERO NEFROTÓXICO EN CONEJO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE NEFRITIS INDUCIDA POR ANTICUERPOS ANTI-MEMBRANA BASAL GLOMÉRULAR"** en el que se especificó incorrectamente que los cadáveres de animales se incinerarían y la investigadora responsable contestó que así sería. Dado que no se incineran los animales en nuestro Instituto, ésta minuta se corrige éste error previo.

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

México Cd. Mx., a 26 de abril de 2018.

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.

No. Oficio CINVA 074-18

Estimada Dra. Rosetti.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: **"GENERACIÓN DE SUERO NEFROTÓXICO EN CONEJO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE NEFRITIS INDUCIDA POR ANTICUERPOS ANTI-MEMBRANA BASAL GLOMÉRULAR"**, con registro CINVA IRE-1829-16/17-1. Debido a que el 11 de Abril solicito la terminación del mismo, le solicito de la manera más atenta lleve a cabo el cierre del proyecto y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Forma única para registro de proyectos con firmas.
2. Formato de cierre del protocolo, el cual adjunto, este debe de ir en hoja membretada e impreso.
3. Informe final
4. 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,

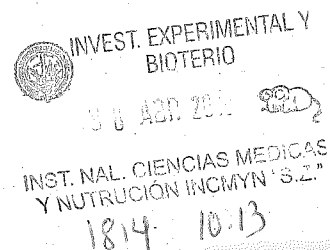
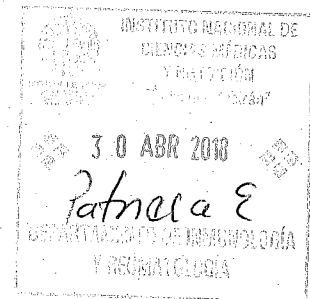
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

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

NABS/nom

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





México, D.F. a 11 de Abril, 2018

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

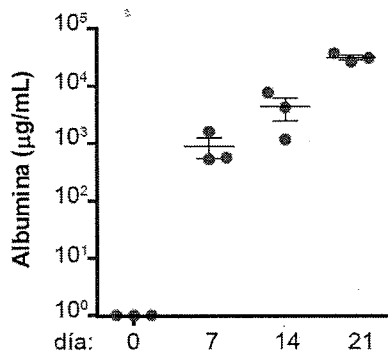
Dra. Norma Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Estimada Dra. Bobadilla,

Por medio de esta carta quisiera informar los avances del protocolo titulado **“Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular en ratones C57BL/6”** con REF. 1829, para solicitar terminación del mismo.

Los conejos fueron inmunizados en siete ocasiones con extractos glomerulares de ratón, posterior a la 6ta inmunización el suero mostró su capacidad nefrotóxica, por lo que se inmunizaron por última vez y se sacrificaron los conejos, con lo que obtuvimos aproximadamente 150mL de suero. Se probó en ratones C57BL/6 (usando 200uL de suero), comprobando su utilidad como un modelo surrogado de nefritis lúpica. A continuación se muestra la inducción de proteinuria, la cual se asoció con cambios importantes a nivel histológico, sugerentes de inflamación intensa inducida por el depósito de complejos inmunes.



Agradezco a Usted y al Comité el tiempo dedicado en evaluar esta solicitud.

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Investigadora en Ciencias Médicas

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



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

ACUSE

"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución de los Estados Unidos Mexicanos"

México, D. F., a 9 de noviembre de 2017.

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. Inmunología y Reumatología
Presente.

REF: CINVA-IRE-1829-16/17-1

Estimada Dra. Rosetti.

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular".

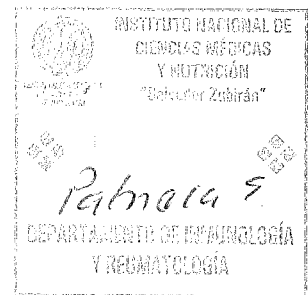
Este comité ha dictaminado que **SE AUTORIZA** el addendum y uso de **50 ratones de fin reproductivo.**

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma 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

NAB/nom

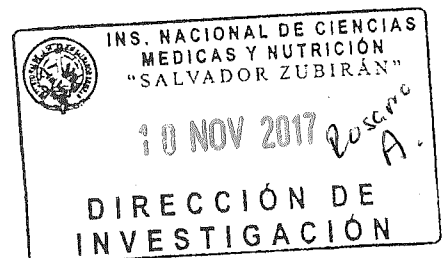


INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

10 NOV 2017

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."

15/11/17 9.57
DMSE



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

1690



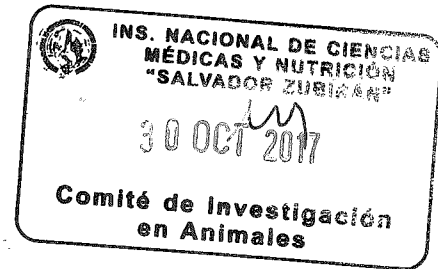
INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 27 de Octubre, 2017

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora

Comisión de Investigación en Animales



Estimada Dra. Bobadilla,

Escribo este *addendum* para solicitar que se me autorice modificar la técnica propuesta en el protocolo titulado "Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular" con REF. CINVA 1829.

Aunque hemos inmunizado a los conejos y les hemos aplicado 3 refuerzos, el suero obtenido aún no alcanza la nefrotoxicidad necesaria. Causa cambios histológicos moderados y depósito glomerular de IgG (Figura 1), pero niveles bajos de proteinuria. Consideramos necesario administrar 2 refuerzos adicionales y requerimos más ratones para probar los nuevos sueros.

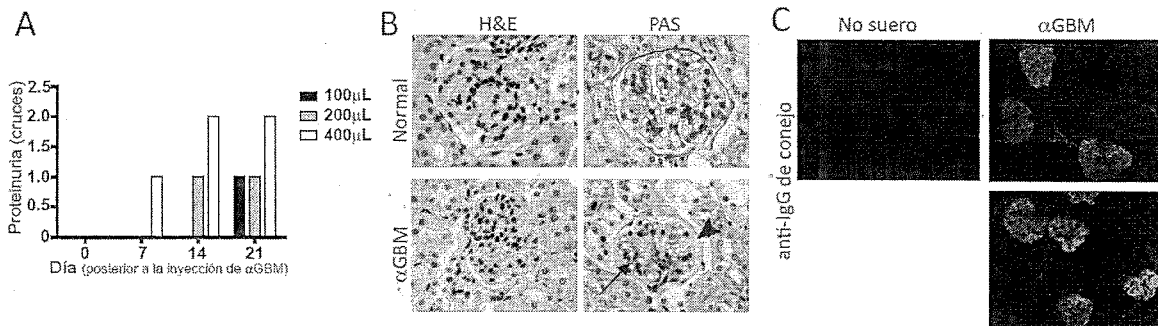


Figura 1. Evaluación de la capacidad nefrotóxica de suero de conejos inmunizados con extractos glomerulares murinos. A) Proteinuria inducida por la transferencia de suero de conejos a ratones B6 (3 dosis de suero fueron evaluadas: 100, 200 y 400 μ L). La transferencia de 400 μ L de suero indujo proteinuria leve, 2+. B) Evaluación histológica 21 días después de la transferencia de suero. Se observan cambios leves en la estructura glomerular (flecha) y formación incipiente de media lunas (cabeza de flecha). C) Depósito de IgG de conejo en glomérulos de ratones después de la transferencia del suero nefrotóxico.

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




INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Por esto, solicitamos:

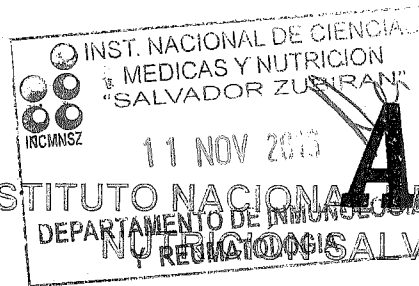
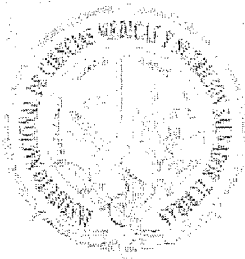
40 ratones para extraer glomérulos – edad y sexo indiferente.

10 ratones para probar la capacidad nefrotóxica del suero que se genere.

Quedo en espera de su amable respuesta,


Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Departamento de Inmunología y Reumatología

Ccd. MVZ Mariela Contreras Escamilla



ACUSE

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

Ciudad de México, a 08 de Noviembre de 2016.

Dr. Florencia Rosetti Sciutto
INVESTIGADOR(A) PRINCIPAL
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA Y REUMATOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
AV. VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI
MÉXICO, D.F., C.P. 14080
PRESENTE

Por este medio, nos permitimos informarle que La Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha revisado y dictaminado como **APROBADO** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular

Con clave de protocolo IRE-1829-16/17-1

La vigencia de la aprobación termina el día **08-11-2017**. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

Comentarios:

Se autoriza el uso de 20 ratones C57BL/6 de sexo indistinto, 16 ratones C57BL/6 hembra y 3 conejos.

Sin más por el momento quedamos de usted.

ATENTAMENTE,

DRA. NORMA BOBADILLA SANDOVAL
COORDINADORA DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

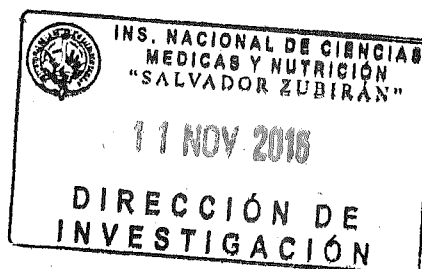
c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
c.c.p. MVZ. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB.



1101
INVEST. EXPERIMENTAL
BIOTERIO

11 NOV 2016

INST. NAL. CIENCIAS MEDIC/ Y NUTRUCIÓN INCMYN "S."



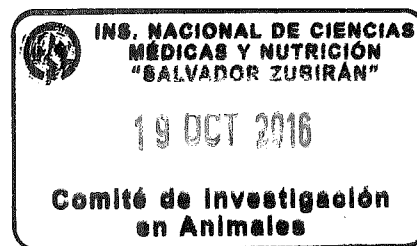


INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 13 de Octubre, 2016

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

- Coordinadora
- Comisión de Investigación en Animales
INCMNSZ
Presente



Estimada Dra. Bobadilla,

Agradezco a Usted y al Comité el tiempo dedicado en evaluar mi proyecto titulado **"Generación de suero nefrotóxico en conejos para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular"**, con REF: CINVA 1829; Clave: IRE-1829-16/17-1. De acuerdo con lo sugerido por Usted, he realizado los siguientes cambios y aclaraciones:

1. No se incluyen los ratones C57 en el título.
Se ha modificado el título y ahora incluye la cepa de los ratones C57BL/6.
2. Debido a que el área de conejos presenta deficiencias, se deben poner en contacto con el DIEB para llevar a cabo las inmunizaciones.
Si, como está estipulado en investigadores participantes y en el punto 8, todo lo relacionado con conejos, será realizado con ayuda de la MVZ Mariela Contreras (tanto en la coordinación/contacto con el área de conejos así como en la parte técnica de la inmunización, sangrado y sacrificio de conejos).
3. Describir las funciones de cada participante en el desarrollo del protocolo.
Las funciones realizadas por cada participante fueron aclaradas en el punto 8.
4. Los antecedentes son claros y adecuados. Se encuentran descuidos en la escritura, ya que no coinciden el protocolo en extenso con el FAEP.

Se han corregido las incongruencias entre el protocolo en extenso y el FAEP.

Un tanto escueto y faltó abordar los estudios que ya se han realizado con este suero nefrotóxico y los resultados encontrados.

Este es un modelo ampliamente utilizado como subrogado de nefritis lúpica por múltiples grupos. Los mecanismos efectores que desencadenan daño tisular son comparables entre este y otros modelos de lupus murino, y la evaluación de estos modelos en decenas de ratones genéticamente modificados (knockout y transgénicos) han hecho evidente esta similitud (se adjunta revisión del tema).

5. Pretenden generar anticuerpos anti-membrana basal glomerular, pero utilizarán un extracto de glomérulos que contienen múltiples proteínas de diferentes zonas del glomérulo como células endoteliales, epiteliales mesangiales y de la cápsula de Bowman, por eso, es necesario apoyarse mucho en la literatura para este fin y justificar como se logrará esto.

Si, el suero nefrotóxico incluirá anticuerpos contra múltiples estructuras glomerulares (y no glomerulares, ya que las preparaciones de glomérulos no son 100% puras). Sin embargo, el objetivo es generar un suero que esté enriquecido con anticuerpos contra estructuras glomerulares, capaz de incitar inflamación en respuesta al depósito de estos anticuerpos.

6. En la metodología del protocolo en extenso en el punto 1, mencionan que los ratones serán anestesiados con pentobarbital sódico (40mg/kg) y se perfundirán con 20mL de PBS a través del corazón. Los ratones se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico y los riñones se colectarán.

Esto fue un error, ya se ha modificado: Se inyectará de manera intraperitoneal pentobarbital sódico (40 mg/kg) para poder perfundir con 20 mL de PBS, con el fin de eliminar la sangre de los riñones que serán posteriormente lisados (para realizar las inmunizaciones) o colectados para evaluar su histología (ratones experimentales).

7. En el punto número 4 de métodos en el protocolo en extenso, menciona: "Dos semanas después del Booster, los conejos serán anestesiados y exanguinados por punción cardiaca" la exanguinación será con el objetivo de obtener la mayor cantidad de sangre posible del animal y poder obtener aproximadamente 500mL de los 3 conejos como lo explican en el FAEP, este procedimiento hará que los ratones mueran antes de administrar los 210mg/kg de pentobarbital, por lo que el método de sacrificio será la exanguinación. Corregir este párrafo.

Si, es un error, ya ha sido modificado.

8. En el punto 3 del FAEP está muy clara la justificación del experimento, pero no se incluyen los procedimientos en el uso de animales.

Se ha agregado una explicación de los procedimientos a realizar en los animales solicitados.

9. Los investigadores mencionan que la potencia del suero nefrotóxico varía cada vez que se prepara y como probarán 3 diferentes dosis, sería conveniente determinar si el número de ratones que usarán en el punto 4 inciso c) de FAEP tienen el suficiente impacto estadístico.

Efectivamente, cada suero tiene distinta actividad nefrotóxica. Por eso se juntarán todos los sueros que se colecten de los conejos, y posteriormente, ese *pool* de sueros es el que se evaluará para determinar su capacidad nefrotóxica. El fenotipo es muy homogéneo cuando se inyecta la misma cantidad de suero, por lo que evaluarlo en 4 ratones es suficiente para determinar la mejor dosis a usar posteriormente.

Especificar en el protocolo en extenso que algunos procedimientos se llevarán a cabo en machos y otros en hembras.

Se agregó en el protocolo en extenso que el sexo, tanto de los conejos como de los ratones de donde se extraerán los glomérulos es indistinto, pero la evaluación de la capacidad nefrotóxica se evaluará utilizando únicamente hembras.

En el punto número 5 del FAEP solo menciona tres grupos experimentales, pero los 12 ratones hembra que se utilizarán para evaluar el efecto nefrotóxico recibirán dosis diferentes de suero lo que genera otros grupos de experimentación.

Se modificó el número de grupos experimentales como fue indicado.

Se sugiere contemplar un grupo control para las comparaciones histológicas.

Si, se agregará un grupo de ratones que sean presensibilizados pero que no reciban suero nefrotóxico que nos servirá de control sano en las evaluaciones histopatológicas y de la función renal.

Si bien es un modelo caracterizado por el investigador, parece que es la primera vez que lo desarrollará en el Instituto, ¿no sería conveniente solicitar más animales para repetir el ensayo de efecto nefrotóxico y ver la reproducibilidad puesto que se requiere un modelo reproducible? **Este es un modelo que se estableció desde 1990 (Schrijver G et al. 1990), que se utiliza ampliamente como modelo para estudiar mecanismos de daño tisular mediado por complejos inmunes, y por lo tanto sirve como subrogado de modelos de nefritis lúpica (Fu Y, et al. 2007). Por lo que el objetivo es únicamente generar el suero nefrotóxico y determinar la dosis para inyectar en los ratones que nos permita obtener el efecto nefrotóxico que buscamos.**

10. En el FAEP mencionan que los ratones se utilizarán para la extracción de riñones y valoración del efecto nefrotóxico serán sacrificados con CO₂, pero en el protocolo en extenso dice que serán sacrificados con sobredosis de pentobarbital sódico.

Estas incongruencias han sido modificadas.

En el punto 8 del FAEP falta agregar que se pasarán 20mL de PBS.

Si, ya fue incluido.

Para la administración de CFA+IgG en la pata de los ratones, dice que será subcutánea, esto será en el muslo, cojinete plantar o en la ingle?

Se realizará en el cojinete plantar.

El punto 14 no coincide con el protocolo en extenso
Si, ya fue aclarado el método de eutanasia.

11. En el punto 16 es conveniente aclarar que el destino final de los cadáveres será la incineración.
Si, ya fue aclarado.

12. Se utilizará algún método estadístico para evaluar el efecto y reproducibilidad del suero?

No, ya que el propósito de este experimento es determinar la menor dosis que logre el efecto nefrotóxico que buscamos: en promedio 3×10^2 gAlb/gCre en orina y una calificación que alcance al menos 4 en la escala de daño que utilizaremos, descrita por Duffau P et al, 2010. Esta escala incluye la evaluación de proliferación endocapilar, infiltración leucocitaria y presencia de media lunas.

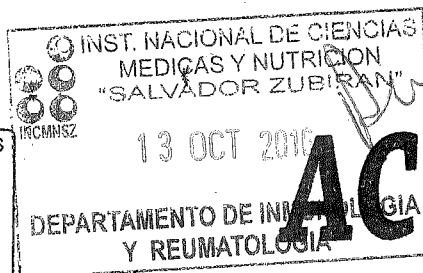
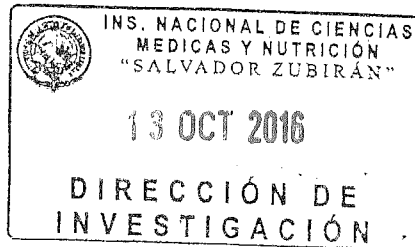
Atentamente,



Dra. Florencia Rosetti
Investigadora en Ciencias Médicas



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE



1061
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

Ciudad de México., a 10 de octubre de 2016

Dra. Florencia Rosetti Sciutto
Depto. de Inmunología y Reumatología
Presente.

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."

REF: CINVA-1829 IRE-1829-16/17-1

Estimada Dra. Rosetti:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular”

La Comisión decidió dejar **Pendiente la Aprobación** del proyecto hasta que se resuelvan los cuestionamientos siguientes:

- No se incluyen los ratones C57 en el título.
- Debido a que el área de conejos presenta deficiencias, se deben poner en contacto con el DIEB para llevar a cabo las inmunizaciones.
- Describir las funciones de cada participante en el desarrollo del protocolo.
- Los antecedentes son claros y adecuados. Se encuentran descuidos en la escritura, ya que no coinciden el protocolo en extenso con el FAEP. Un tanto escueto y faltó abordar los estudios que ya sean realizado con este suero nefrotóxico y los resultados encontrados.
- Pretenden generar anticuerpos anti-membrana basal glomerular, pero utilizarán un extracto de glomérulos que contienen múltiples proteínas de diferentes zonas del glomérulo como células endoteliales, epiteliales mesangiales y de la cápsula de Bowman, por eso es necesario apoyarse mucho en la literatura para este fin y justificar como se logrará esto.
- En la metodología del protocolo en extenso en el punto 1, menciona que “los ratones serán anestesiados pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Los ratones se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico (210 mg/kg) y los riñones se colectarán”. El procedimiento de punción cardiaca y/o infundir 20 ml de PBS matará al animal, ya que se desplazaría completamente el volumen de sangre del ratón, en este caso para que administrar 210 mg/kg de pentobarbital cuando el ratón ya murió? se solicita aclarar este punto en la metodología.

g) En el punto número 4 de métodos en el protocolo en extenso, menciona: “Dos semanas después del último booster, los conejos serán anestesiados y exanguinados por punción cardiaca. Al terminar se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital

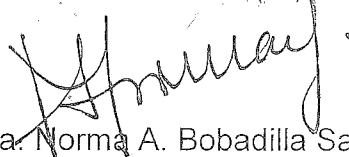
Avenida Gaspar de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

sódico", la exanginación será con el objetivo de obtener la mayor cantidad de sangre posible del animal y poder obtener aproximadamente 500 ml de los 3 conejos como lo explican en el FAEP, este procedimiento hará que los ratones mueran antes de administrar los 210 mg/kg de pentobarbital, por lo que el método de sacrificio será la exanginación. Corregir este párrafo.

- h) En el punto 3 del FAEP está muy clara la justificación del experimento, pero no se incluyen los procedimientos en el uso de animales
- i) Los investigadores mencionan que la potencia del suero nefrotóxico varía cada vez que se prepara y como probaran 3 dosis diferentes, sería conveniente determinar si el número de ratones que usaran en el punto 4 inciso c) del FAEP tienen el suficiente impacto estadístico. Especificar en el protocolo en extenso que algunos procedimientos se llevarán a cabo en machos y otros en hembras. En el punto número 5 del FAEP solo mencionan tres grupos experimentales, pero los 12 ratones hembra que se utilizarán para evaluar el efecto nefrotóxico recibirán dosis diferentes de suero lo que genera otros grupos de experimentación. Se sugiere contemplar un grupo control para comparaciones histológicas. Si bien es un modelo caracterizado por el investigador, parece que es la primera vez que lo desarrollará en el Instituto, ¿no sería conveniente solicitar más animales para repetir el ensayo de efecto nefrotóxico y ver la reproducibilidad puesto que quieren un modelo reproducible?
- j) En el FAEP mencionan que los ratones que se utilizarán para la extracción de riñones y valoración de efecto nefrotóxico serán sacrificados con CO2 seguido de dislocación cervical, pero en el protocolo en extenso dice: se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico (210 mg/kg), corregir esta diferencia. En el punto 8 del FAEP falta agregar que se pasaran 20 ml de PBS a los ratones de los que se extraerán los riñones. Para la administración del CFA+IgG en la pata de los ratones, dice que será subcutánea, esto será en el muslo, en el cojinete plantar o en la ingule?. El punto 14 del FAEP eutanasia para ratones: no coincide con el protocolo en extenso.
- k) En el punto 18 es conveniente aclarar que el destino final de los cadáveres después de trasladarlos al depósito del INCMNSZ será la incineración.
- l) Se utilizará algún método estadístico para evaluar el efecto y reproducibilidad del suero?

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

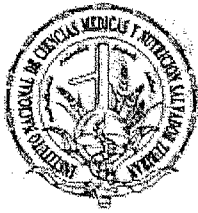


Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

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

NAB/nom



ACUSE

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

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

Fecha de recepción: 2016-07-19

Clave: IRE-1829-16/17-1

Título: Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular

Investigador responsable: Florencia Rosetti Sciutto

Departamento o servicio: DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA

Tipo de investigación: Biomédica

Patrocinadores

Patrocinador: Sin presupuesto	Cantidad: 0
Patrocinador:	Cantidad: 0
Patrocinador:	Cantidad: 0

Vigencia del proyecto: Del 2016-09-01 al 2017-09-01

Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
-------------	-------------	-------------	-------------



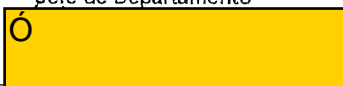
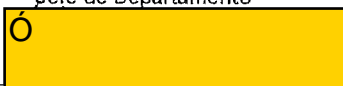
Costo totales de la investigación

Personal (sueldos y sobresueldos al personal)	0
Equipos (de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)	0
Materiales (reactivos, consumibles, desechables, etc.)	0
Animales (adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)	0
Estudios (de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)	0
Viáticos (reuniones científicas y trabajo de campo)	0
Publicaciones (costos directos de publicación, sobregiro)	0
Suscripciones (libros, revistas, software, periódicos, etc)	0
Varios (teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc)	0
Administración de gastos pacientes	0
Fondo de apoyo (15% de la cantidad total del proyecto)	0
Total	0

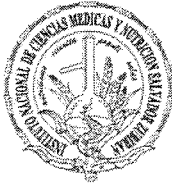
Instituciones participantes

Institución: INCMNSZ
 Institución:
 Institución:

Firmas

 Investigador responsable	 Jefe de Departamento
 Comité de Investigación en Humanos	 Comité de Investigación en Animales
Director de Investigación	Director General

Fecha de resolución



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

126

No. CINVA: 1829-16/17-1
FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo: Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular

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

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Florencia Rosetti Sciutto
Institución de Adscripción	INCMNSZ
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext. 2610
Correo electrónico	florencia.rosettis@incmnsz.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo				
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Mariela Guadalupe Contreras Escamilla	INCMNSZ	MVZ	54870900 Ext 1301	[REDACTED]

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	UNAM	Médico Cirujano	54870900 ext. 2610	[REDACTED]
	UNAM	Químico Farmacéutico Biólogo	54870900 ext. 2610	[REDACTED]

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	1 Octubre 2016		
Fecha tentativa de finalización.	1 Octubre 2017		

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto. INCMNSZ



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

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

El objetivo general de este trabajo es generar suero con capacidad nefrotóxica como herramienta para estudios posteriores.

Con este fin:

- Se obtendrán glomérulos de ratones C57BL/6.
- Se inmunizarán tres conejos con un lisado de proteínas glomerulares (de ratones C57BL/6).
- Demostraremos la capacidad nefrotóxica de este suero en ratones C57BL/6.

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

El Lupus Eritematoso Generalizado es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares y el desarrollo consecuente de daño en tejidos. Existen múltiples modelos murinos de lupus que han sido muy útiles para estudiar la enfermedad. Algunos de éstos se desarrollan espontáneamente (MRL-lpr, o NZWxNZBF1), pero toman varios meses para el desarrollo de manifestaciones clínicas (6-12 meses). Esto incrementa los costos de la investigación y dificulta su estudio pues no se conoce el momento preciso cuando se empieza a desarrollar el daño en órganos blanco.

La glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-glomerulares es ampliamente utilizada como un modelo de inflamación glomerular aguda inducida por depósito de complejos inmunes (Fu et al., Clin Immunol 2007). Aunque la patogénesis de la nefritis lúpica y de la glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-glomerulares es diferente, ambas patologías comparten mediadores y cascadas inflamatorias.

Nuestro laboratorio ha usado este modelo en trabajos previos (Rosetti et al., J Immunol 2012; Venkatesh et al., Immunity 2013; Crispin et al., J Immunol 2012; Yoshida et al., Nat Commun en prensa) en los que hemos podido demostrar la importancia que la respuesta de neutrófilos y la IL-17 tienen en la patogénesis de la nefritis lúpica.

En esta propuesta se contempla la generación de suero nefrotóxico y su estandarización para su uso futuro como modelo de glomerulonefritis aguda.

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

Categoría C

Se encuentra en esta categoría, ya que la inmunización de conejos y posteriormente de ratones se realiza en presencia de adyuvante (CFA) el cual causa inflamación importante en el sitio de administración.

El Investigador deberá consultar:

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

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



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

4) Justificación de la cantidad de animales:

Se utilizarán:

- a) Tres conejos de 3 meses para inmunizar y extraer suero nefrotóxico. Calculamos que, con esta cantidad de conejos, podremos obtener 500mL de suero nefrotóxico.
- b) Riñones de 20 ratones C57BL/6 para preparar material de inmunización.
- c) 12 ratones para evaluar la efectividad nefrotóxica del suero (se evaluarán 3 dosis de suero: 50, 100 y 200uL, con 4 ratones por grupo).

La potencia del suero nefrotóxico varía cada vez que se prepara. Se solicitan 3 conejos con el fin de obtener una cantidad grande de suero que, una vez titulado, se guardará en alícuotas para su uso subsecuente. Esto permitirá tener un modelo reproducible.

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

Los conejos serán manejados dentro de las instalaciones del DIEB, durante las inmunizaciones y durante las tomas de sangre.

Los ratones que serán utilizados para la obtención de riñones, serán llevados al laboratorio en jaulas, donde serán sacrificados bajo las normas establecidas (CO₂, seguido de dislocación cervical). Los cadáveres serán devueltos al DIEB.

Los ratones que se utilicen para evaluar el efecto nefrotóxico del suero serán inmunizados y mantenidos en el bioterio. La colección de orina será realizada ahí mismo. Una vez que termine el experimento serán llevados al laboratorio y ahí serán sacrificados para la obtención de muestras para el análisis histopatológico.

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

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Conejos	3		3 meses	Indistinto
Ratones C57B6 (para la obtención de riñones)	20	20-30g	7-20 semanas	Indistinto
Ratones C57B6 experimentales	12	20g	8-10 semanas	Hembras
No. de Grupos experimentales:3				
No. de animales por grupo: 3, 20 y 12				
No. TOTAL DE ANIMALES: 35 (3 conejos y 32 ratones)				



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

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

Los conejos serán inmunizados y recibirán 3 boosters (uno cada 3 semanas). Por esto se calcula que los conejos se mantendrán en el DIEB aproximadamente 4 meses.

Los ratones que se utilizarán para extraer los riñones, serán obtenidos de ratones que no sean utilizados en la colonia de reproducción y vayan a ser descartados.

Los ratones experimentales, una vez iniciada la inmunización, se mantendrán 21 días para evaluar el curso de la enfermedad.

7) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Conejos: Una vez inmunizados y re-estimulados con el antígeno, se tomará una muestra de sangre (15mL), esto se repetirá cada 3 semanas en 3 ocasiones. Ratones: Una vez iniciado el modelo experimental, se tomará orina cada 7 días.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Conejos: Se inmunizarán de manera subcutánea con adyuvante completo de Freund y extractos renales. Serán re-estimulados con el antígeno de manera subcutánea, sin adyuvante cada 3 semanas. Ratones: Serán inmunizados con IgG de conejo en presencia del adyuvante completo de Freund, de manera intradérmica en la planta de la pata. Tres días después, de manera intravenosa se inyectará suero nefrotóxico obtenido de los conejos.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)		X	Adyuvante completo de Freund
Restricción física		X	Durante las inmunizaciones y toma de sangre.
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.		X	Se producirá un antisuero contra antígenos glomerulares.
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		



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

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

8) 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.

Conejos:

Sujeción: No se sujetará a los conejos por las orejas ni por los miembros posteriores. Se sujetará por la piel dorsal de forma que las patas traseras estén lejos del cuerpo de la persona que lo está sujetando. Si el conejo comienza a moverse violentamente y en rotación, se le colocará sobre una superficie plana y se esperará a que se tranquilice para evitar luxaciones. Ya inmovilizado, se levantará su piel con los dedos índice y pulgar y se introducirá la aguja de la jeringa a 45° hasta llegar al tope e inyectar 250uL de CFA + 50 mg de extractos glomerulares. Tres semanas después serán re-expuestos a 50 mg de antígeno (extractos glomerulares). Catorce días posteriores a esta exposición se realiza una toma de muestra de la oreja (15mL) y serán re-expuestos al antígeno. Esto se repetirá en un total de 3 ocasiones. Finalmente, posterior a la última re-exposición, serán anestesiados con pentobarbital (20-40mg/Kg) y exanguinados por punción cardíaca:

Punción cardíaca: El animal anestesiado se colocará en posición dorsal. Se identificará el área de punción, sintiendo el latido cardíaco en el pecho. Se limpiará el área con una torunda impregnada con alcohol 70% y se introducirá la aguja perpendicularmente al animal. Se usará una aguja de 27G X 12" acoplada a una jeringa. Se mantendrán dos jeringas listas para substituir la jeringa. Llena. El llenado y cambio de las jeringas se hará con la ayuda de un asistente. Una vez obtenida la sangre, se realiza la eutanasia.

El suero aislado de los conejos, tanto el aislado durante las tomas de sangre repetidas como el aislado durante la toma de sangre final, será mezclado. El complemento se inactivará con calor (56°, 45 minutos) y se filtrará para su posterior uso en ratones.

Todos los procedimientos con conejos serán realizados por la M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, quien cuenta con amplia experiencia en el manejo de conejos. Florencia Rosetti apoyará en los procedimientos.

Ratones para obtención de riñones: Una vez sacrificados utilizando CO₂, se obtendrán riñones para extraer los glomérulos (utilizando cortezas, se separaran los glomérulos por un gradiente de densidad). Una vez purificados, se lizarán para ser utilizados para inmunizar a los conejos.

Ratones experimentales: La capacidad nefrotóxica de los sueros de los conejos, será evaluada en ratones que serán previamente sensibilizados con IgG de conejo en presencia de CFA. Para esto, los ratones serán sujetados manualmente y la pata izquierda será inoculada de manera subcutánea con 10 uL del CFA+IgG de conejo. Tres días posteriores a la presensibilización, los ratones recibirán una dosis de suero nefrotóxico vía intravenosa (50, 100 o 200uL). Esto se realizará utilizando un sujetador de ratones. Se colectará orina los días 0, 7, 14 y 21 posterior a la exposición al suero nefrotóxico. Finalmente los ratones serán sacrificados para su análisis histopatológico utilizando asfixia con CO₂.



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

Todo el trabajo con ratones será realizado por Florencia Rosetti. Los estudiantes ayudarán en la colección de muestras, bajo supervisión.

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Anestésico	Pentobarbital	20-40 mg/Kg	IV	Dosis única

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

1. Pérdida de los reflejos oculares.
2. Relajación muscular
3. La frecuencia respiratoria y cardiaca se mantienen regulares.

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

No aplica

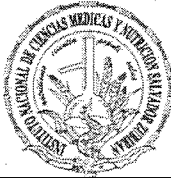
12) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

No se espera que estos parámetros cambien significativamente en este estudio.

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

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

Los procedimientos que se realizarán en los ratones y conejos no se espera que causen deterioro significativo en el aspecto de los animales. A pesar de esto, se observarán y registrarán cambios de comportamiento y apariencia de los animales. En caso de presentarse pérdida de peso moderada (10-20%) o se encuentre afectado su comportamiento, se



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

sacrificará al animal y el estudio se dará por terminado. El valor que en el que se considerará punto final experimental es de 5: pérdida de peso moderada y estado general afectado.

Criterios de punto final

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

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso cortó.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

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

Conejos: Pentobarbital 120mg/kg IP.

Este método de eutanasia permitirá la exanguinación para obtener la mayor cantidad posible de suero.

Ratones: Asfixia con CO₂ seguida de dislocación cervical

15) El protocolo representa riesgo biológico?

No

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

El destino final de todos los animales que se ocupen durante este proyecto se colocarán en bolsas amarillas que tengan la leyenda de "Residuo Peligroso Biológico Infeccioso (RPBI)" y se colocaran en el almacén temporal que se encuentra a un costado del DIEB.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales,



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

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

Florencia Rosetti Sciutto

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



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

zdo

No. CINVA: 1829-16/17-1
FOLIO DE REGISTRO:

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:

Generación de suero nefrotóxico en conejo para el establecimiento de un modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-membrana basal glomerular en ratones C57BL/6

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

Investigador Responsable del Proyecto.

Nombre del Investigador Titular	Florencia Rosetti Sciutto
Institución de Adscripción	INCMNSZ
Departamento de Adscripción	Inmunología y Reumatología
Teléfono	54870900 ext. 2610
Correo electrónico	florencia.rosettis@incmnsz.mx

Investigadores que Participaran en el Protocolo

Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail
Mariela Guadalupe Contreras Escamilla	INCMNSZ	MVZ	54870900 Ext 1301	[Redacted]

Estudiantes

Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
CE	UNAM	Médico Cirujano	54870900 ext. 2610	[Redacted]
	UNAM	Químico Farmacéutico Biólogo	54870900 ext. 2610	[Redacted]

Vigencia del Protocolo.

Fecha estimada de inicio del protocolo	1 Diciembre 2016		
Fecha tentativa de finalización.	1 Diciembre 2017		

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

1) Institución en donde se realizará el proyecto.

INCMNSZ



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

2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

El objetivo general de este trabajo es generar suero con capacidad nefrotóxica como herramienta para estudios posteriores.

Con este fin:

- a) Se obtendrán glomérulos de ratones C57BL/6.
- b) Se inmunizarán tres conejos con un lisado de proteínas glomerulares (de ratones C57BL/6).
- c) Demostraremos la capacidad nefrotóxica de este suero en ratones C57BL/6.

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

El Lupus Eritematoso Generalizado es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por la pérdida de tolerancia a antígenos intranucleares y el desarrollo consecuente de daño en tejidos. Existen múltiples modelos murinos de lupus que han sido muy útiles para estudiar la enfermedad. Algunos de éstos se desarrollan espontáneamente (MRL-lpr, o NZWxNZBF1), pero toman varios meses para el desarrollo de manifestaciones clínicas (6-12 meses). Esto incrementa los costos de la investigación y dificulta su estudio pues no se conoce el momento preciso cuando se empieza a desarrollar el daño en órganos blanco.

La glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-glomerulares es ampliamente utilizada como un modelo de inflamación glomerular aguda inducida por depósito de complejos inmunes (Schrijver et al, Kidney Int 1990, Fu et al., Clin Immunol 2007). Aunque la patogénesis de la nefritis lúpica y de la glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti-glomerulares es diferente, ambas patologías comparten mediadores y cascadas inflamatorias.

Nuestro laboratorio ha usado este modelo en trabajos previos (Rosetti et al., J Immunol 2012; Venkatesh et al., Immunity 2013; Crispin et al., J Immunol 2012; Yoshida et al., Nat Commun en prensa) en los que hemos podido demostrar la importancia que la respuesta de neutrófilos y la IL-17 tienen en la patogénesis de la nefritis lúpica.

En esta propuesta se contempla la generación de suero nefrotóxico y su estandarización para su uso futuro como modelo de glomerulonefritis aguda.

Procedimientos a realizar:

Conejos: Serán inmunizados con el propósito de generar suero nefrotóxico.

Ratones para colección de riñones: Se obtendrán cortezas renales que servirán como antígeno para la generación del suero nefrotóxico en los conejos.

Ratones experimentales: Se evaluará la capacidad nefrotóxica del suero obtenido en conejos en estos ratones y se determinará la dosis de suero óptima para utilizar en estudios subsecuentes.

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

Categoría C

Se encuentra en esta categoría, ya que la inmunización de conejos y posteriormente de ratones se realiza en presencia de adyuvante (CFA) el cual causa inflamación importante en el sitio de administración.



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

El Investigador deberá consultar: www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

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

4) Justificación de la cantidad de animales:

Se utilizarán:

- a) Tres conejos de 3 meses para inmunizar y extraer suero nefrotóxico. Calculamos que, con esta cantidad de conejos, podremos obtener 500mL de suero nefrotóxico.
- b) Riñones de 20 ratones C57BL/6 para preparar material de inmunización.
- c) 16 ratones para evaluar la efectividad nefrotóxica del suero (se evaluarán 3 dosis de suero: 50, 100 y 200uL, y un grupo sin suero, con 4 ratones por grupo).

La potencia del suero nefrotóxico varía cada vez que se prepara. Se solicitan 3 conejos con el fin de obtener una cantidad grande de suero que, una vez titulado, se guardará en alícuotas para su uso subsecuente. Esto permitirá tener un modelo reproducible.

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

Los conejos serán manejados dentro de las instalaciones del DIEB, durante las inmunizaciones y durante las tomas de sangre.

Los ratones que serán utilizados para la obtención de riñones, serán llevados al laboratorio en jaulas, donde serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Los cadáveres serán devueltos al DIEB para su incineración.

Los ratones que se utilicen para evaluar el efecto nefrotóxico del suero serán inmunizados y mantenidos en el bioterio. La colección de orina será realizada ahí mismo. Una vez que termine el experimento serán llevados al laboratorio y ahí serán sacrificados para la obtención de muestras para el análisis histopatológico. Para esto, serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Los cadáveres serán devueltos al DIEB para su incineración.

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

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
-------------------------------------	----------	---------------	---------------	------



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

Conejos	3		3 meses	Indistinto
Ratones C57BL/6 (para la obtención de riñones)	20	20-30g	7-20 semanas	Indistinto
Ratones C57BL/6 experimentales (sin suero, 50uL, 100uL y 200uL)	16	20g	8-10 semanas	Hembras
No. de Grupos experimentales: 6				
No. de animales por grupo: 3, 20 y 16				
No. TOTAL DE ANIMALES: 39 (3 conejos y 36 ratones)				

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

Los conejos serán inmunizados y recibirán 3 boosters (uno cada 3 semanas). Por esto se calcula que los conejos se mantendrán en el DIEB aproximadamente 4 meses.

Los ratones que se utilizarán para extraer los riñones, serán obtenidos de ratones que no sean utilizados en la colonia de reproducción y vayan a ser descartados.

Los ratones experimentales, una vez iniciada la inmunización, se mantendrán 21 días para evaluar el curso de la enfermedad.

7) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.	X		
Toma de muestras biológicas.		X	Conejos: Una vez inmunizados y re-estimulados con el antígeno, se tomará una muestra de sangre (15mL), esto se repetirá cada 3 semanas en 3 ocasiones. Ratones: Una vez iniciado el modelo experimental, se tomará orina cada 7 días.
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.		X	Conejos: Se inmunizarán de manera subcutánea con adyuvante completo de Freund y extractos renales. Serán re-estimulados con el antígeno de manera subcutánea, sin adyuvante cada 3 semanas. Ratones: Serán inmunizados con IgG de conejo en presencia del adyuvante completo de Freud, de



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

			manera intradérmica en la planta de la pata. Tres días después, de manera intravenosa se inyectará suero nefrotóxico obtenido de los conejos.
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)		X	Adyuvante completo de Freund
Restricción física		X	Durante las inmunizaciones y toma de sangre.
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.		X	Se producirá un antisuero contra antígenos glomerulares.
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

- 8) **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.**

Conejos:

Sujeción: No^o se sujetará a los conejos por las orejas ni por los miembros posteriores. Se sujetará por la piel dorsal de forma que las patas traseras estén lejos del cuerpo de la persona que lo está sujetando. Si el conejo comienza a moverse violentamente y en rotación, se le colocará sobre una superficie plana y se esperará a que se tranquilice para evitar luxaciones. Ya inmovilizado, se levantará su piel con los dedos índice y pulgar y se introducirá la aguja de la jeringa a 45° hasta llegar al tope e inyectar 250uL de CFA + 50 mg de extractos glomerulares. Tres semanas después serán re-expuestos a 50 mg de antígeno (extractos glomerulares). Catorce días posteriores a esta exposición se realiza una toma de muestra de la oreja (15mL) y serán re-expuestos al antígeno. Esto se repetirá en un total de 3 ocasiones. Finalmente, posterior a la última re-exposición, serán anestesiados con pentobarbital (40mg/Kg) y exanguinados por punción cardíaca.

Punción cardíaca: El animal anestesiado se colocará en posición dorsal. Se identificará el área de punción, sintiendo el latido cardíaco en el pecho. Se limpiará el área con una torunda impregnada con alcohol 70% y se introducirá la aguja perpendicularmente al animal. Se usará una aguja de 27G X 12" acoplada a una jeringa. Se mantendrán dos jeringas listas para substituir la jeringa llena. El llenado y cambio de las jeringas se hará entre dos personas (Mariela Contreras y Florencia Rosetti).

El suero aislado de los conejos, tanto el aislado durante las tomas de sangre repetidas como el aislado durante la toma de sangre final, será mezclado. El complemento se inactivará con calor (56°, 45 minutos) y se filtrará para su posterior uso en ratones.

Todos los procedimientos con conejos serán realizados por la M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, quien cuenta con amplia experiencia en el manejo de conejos. Florencia Rosetti apoyará en los procedimientos.



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

Ratones para obtención de riñones: Veinte ratones serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Se obtendrán riñones para extraer los glomérulos (utilizando cortezas, se separaran los glomérulos por un gradiente de densidad). Una vez purificados, se lizarán para ser utilizados para inmunizar a los conejos.

Ratones experimentales: La capacidad nefrotóxica de los sueros de los conejos, será evaluada en ratones que serán previamente sensibilizados con IgG de conejo en presencia de CFA. Para esto, los ratones serán sujetados manualmente y la pata izquierda será inoculada de manera subcutánea (en el cojinete plantar) con 10 uL del CFA+IgG de conejo. Tres días posteriores a la presensibilización, los ratones recibirán una dosis de suero nefrotóxico vía intravenosa (50, 100 o 200uL) y un grupo recibirá únicamente la presensibilización. Esto se realizará utilizando un sujetador de ratones. Se colectará orina los días 0, 7, 14 y 21 posterior a la exposición al suero nefrotóxico. Finalmente los ratones serán sacrificados para su análisis histopatológico. Para esto, se inyectará de manera intraperitoneal pentobarbital sódico (40 mg/kg) para poder perfundir con 20 mL de PBS, con el fin de eliminar la sangre de los riñones que serán posteriormente colectados para su análisis.

Todo el trabajo con ratones será realizado por Florencia Rosetti y estudiantes (Ada Ramírez y Diana Fernández).

Inyecciones intravenosas e inmunizaciones de los ratones: Florencia Rosetti

Colección de muestras (orina), sacrificio y colección de órganos: Florencia Rosetti y estudiantes.

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

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Anestésico	Pentobarbital	40 mg/Kg	IV	Dosis única

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

1. Pérdida de los reflejos oculares.
2. Relajación muscular
3. La frecuencia respiratoria y cardíaca se mantienen regulares.

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

No aplica



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

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

No se espera que estos parámetros cambien significativamente en este estudio.

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

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

Los procedimientos que se realizarán en los ratones y conejos no se espera que causen deterioro significativo en el aspecto de los animales. A pesar de esto, se observarán y registrarán cambios de comportamiento y apariencia de los animales. En caso de presentarse pérdida de peso moderada (10-20%) o se encuentre afectado su comportamiento, se sacrificará al animal y el estudio se dará por terminado. El valor que en el que se considerará punto final experimental es de 5: pérdida de peso moderada y estado general afectado.

Criterios de punto final

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

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

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

Conejos: Pentobarbital 40mg/kg IP

Este método de eutanasia permitirá la exanguinación para obtener la mayor cantidad posible de suero.

Ratones: Pentobarbital sódico (40 mg/kg) para poder perfundir con 20 mL de PBS, con el fin de eliminar la sangre de los riñones que serán posteriormente lisados (para



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

realizar las inmunizaciones) o colectados para evaluar su histología (ratones experimentales).

15) El protocolo representa riesgo biológico?

No

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

El destino final de todos los animales que se ocupen durante este proyecto se colocarán en bolsas amarillas que tengan la leyenda de "Residuo Peligroso Biológico Infeccioso (RPBI)" y se colocaran en el almacén temporal que se encuentra a un costado del DIEB, para ser posteriormente incinerados.

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

Nombre y firma del Investigador Responsable

Florencia Rosetti Scitutto

	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	



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

Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	
----------------------------------	-------	--

120

**Generación de Suero Nefrotóxico en Conejo para el Establecimiento de un
Modelo de Nefritis Inducida por Anticuerpos Anti-Membrana Basal
Glomerular**

Investigadores:

Dra. Florencia Rosetti Sciutto¹
M.V.Z. Mariela Guadalupe Contreras Escamilla²

Estudiantes:



¹ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

² Departamento de Investigación Experimental y Bioterio, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

³ Programa de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, UNAM

⁴ Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM

Introducción

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune crónica que causa importante morbilidad y mortalidad. Desde el punto de vista fisiopatogénico, el LEG se desarrolla en dos fases: a) una fase inicial, en la que existe pérdida de tolerancia a antígenos ubicuamente expresados, en particular a ácidos nucleicos y proteínas asociadas; b) una fase subsecuente en la que complejos inmunes derivados de la asociación de autoanticuerpos y autoantígenos se depositan en vasos susceptibles (e.g. glomérulos renales) en donde instigan inflamación (1).

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es estudiar las diferencias genéticas que, a través de promover o evitar cascadas inflamatorias específicas, modifican el fenotipo clínico de los pacientes. Por ejemplo, se sabe que virtualmente todos los pacientes con LEG tienen complejos inmunes depositados en los glomérulos renales (2), pero solo el ~40% desarrollan inflamación clínicamente significativa (3). Esto indica que existen factores intrínsecos al paciente que modulan la respuesta inflamatoria a los complejos inmunes.

En un trabajo previo, demostramos en un modelo murino, que la integrina Mac-1 juega un papel protector contra el desarrollo de inflamación glomerular inducida por complejos inmunes (4). Este concepto es de gran importancia, puesto que un polimorfismo en el gen que codifica para la cadena alfa de Mac-1 (*ITGAM*) causa una mutación en la proteína que disminuye su función (5). Así, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) asociado a LEG en estudios genéticos contribuye al desarrollo de nefritis a través de facilitar la respuesta inflamatoria inducida por complejos inmunes (6).

Con el fin de estudiar el efecto que otros factores genéticos ejercen sobre la inflamación renal inducida por complejos inmunes, es necesario para nosotros estandarizar el modelo de nefritis autoinmune experimental. Este modelo, en el que se inyecta suero de conejo inmunizado con glomérulos murinos a ratones sensibilizados contra inmunoglobulinas de conejo, ha sido ampliamente utilizado por nuestro laboratorio y por otros, para estudiar las cascadas inflamatorias en el glomérulo (7).

En este proyecto, se propone la generación de un suero anti-glomerulo de ratón, producido en conejos, que se usará como herramienta en trabajos futuros.

Objetivos

Objetivo general

Generar suero con capacidad nefrotóxica como herramienta para estudios futuros.

Objetivos específicos

1. Obtener glomérulos de ratones C57BL/6.

2. Inmunizar tres conejos con un lisado de proteínas glomerulares (de ratones C57BL/6).
3. Demostrar y titular la capacidad nefrotóxica del suero obtenido.

Hipótesis

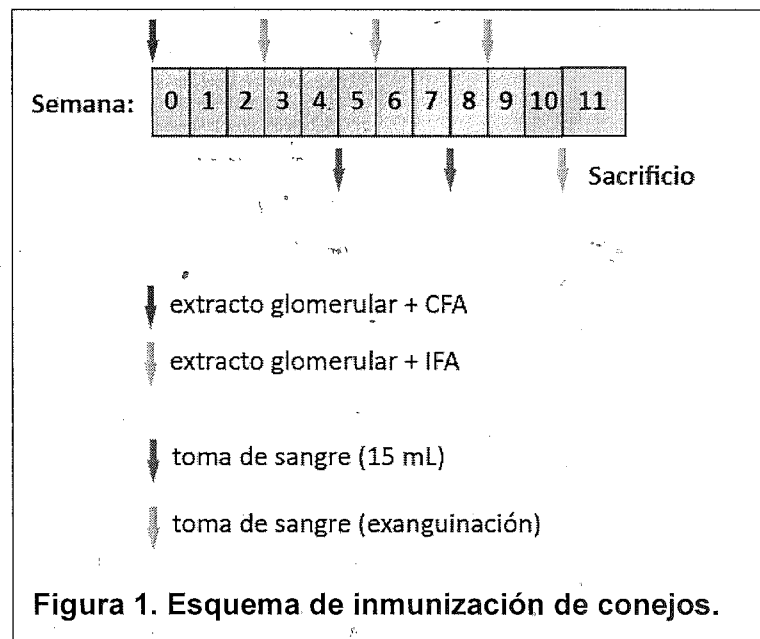
Dado que este no es un protocolo experimental, no se ha planteado una hipótesis.

Métodos

1. Obtención de glomérulos de ratones. Se aislarán los glomérulos mediante centrifugación a través de gradientes de densidad (8). Veinte ratones serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Los ratones se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico (210 mg/kg) y los riñones se colectarán. Se separarán las cortezas, se cortarán en trozos de 1 mm³ y se digerirán en colagenasa (1 mg/mL de colagenasa A, 100 U/mL de desoxirribonucleasa I, en PBS) a 37° C durante 30 minutos con agitación suave. El tejido digerido se presionará suavemente a través de un filtro de 100 µm y se centrifugará a 185 g. El lavado se repetirá 3 veces. El botón se resuspenderá en 3 mL de una solución de Ficoll (27%) y se mantendrá a 4° C. Se añadirán concentraciones decrecientes de Ficoll (2 ml, 23%; 2 ml, 20%; y 3 ml, 11%) para obtener un volumen total de 10 mL de gradiente. Se centrifugará a 1150 g durante diez minutos. Se recogerá el tejido de la interfase 20-11 y se lavarán con PBS. Se corroborará la presencia de glomérulos mediante microscopía.
2. Obtención de lisados glomerulares. El material obtenido en el paso anterior se sonicará en PBS. Una vez obtenido el lisado, las proteínas se cuantificarán mediante reacción de Bradford.
3. Inmunización de conejos. Se formará una emulsión con 50 mg de extractos glomerulares y 250 µL de adyuvante completo de Freund (CFA). La mezcla se inyectará por vía subcutánea a tres conejos. Tres semanas después, se administrará un booster (50 mg de extractos glomerulares en adyuvante incompleto de Freund). En total se administrarán 3 boosters a cada conejo (**Figura 1**).
4. Obtención de suero inmune. Dos semanas después de la administración de cada booster, se obtendrá una muestra de sangre de cada conejo (15 mL, por venopunción a través de la oreja). Dos semanas después del último booster, los conejos serán anestesiados y exanguinados por punción cardiaca. Al terminar se sacrificarán con una sobredosis de pentobarbital sódico (**Figura 1**). El suero se separará por centrifugación y se juntará el suero de todas las

tomas, de los tres conejos. Se incubará a 56° C durante 1 hora para inactivar el complemento. Se esterilizará por filtración y se guardarán alcuotas de 0.5 mL a -80° C.

5. Análisis del potencial nefrotóxico del suero. Se realizará un ensayo de nefritis autoinmune experimental como hemos realizado en trabajos previos (4, 9, 10, 11). Primero, se sensibilizará a los ratones con IgG de conejo. Para esto, se inmunizarán con IgG de conejo en CFA, en la pata izquierda. La inyección se realizará por vía subcutánea, con 10 uL de CFA+IgG de conejo. Tres días después, los ratones recibirán una dosis de suero nefrotóxico por vía intravenosa. Se probarán tres diferentes dosis de suero, 50, 100 o 200 µL. Se colectará orina los días 0 (antes de la inyección de suero), 7, 14 y 21 para medir albúmina. El día 21, los ratones serán sacrificados. Se obtendrán los riñones para análisis histopatológico. Este experimento permitirá determinar qué dosis de suero nefrotóxico es capaz de inducir glomerulonefritis en forma homogénea.



Referencias

1. Crispín, J. C., S.-N. C. Liossis, K. Kis-Toth, L. a Lieberman, V. C. Kyttaris, Y.-T. Juang, and G. C. Tsokos. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 16: 47–57.
2. Zabaleta-Lanz, M. E., L. E. Muñoz, F. J. Tapanes, R. E. Vargas-Arenas, I. Daboín, Y. Barrios, J. a Pinto, and N. E. Bianco. 2006. Further description of early clinically silent lupus nephritis. *Lupus* 15: 845–851.
3. De Zubiria Salgado, A., and C. Herrera-Díaz. 2012. Lupus nephritis: An overview of recent findings. *Autoimmune Dis.* 1.
4. Rosetti, F., N. Tsuboi, K. Chen, H. Nishi, T. Hernandez, S. Sethi, K. Croce, G. Stavrakis, J. Alcocer-Varela, D. Gómez-Martin, N. van Rooijen, V. C. Kyttaris, A. H. Lichtman, G. C. Tsokos, and T. N. Mayadas. 2012. Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J. Immunol.* 189: 3714–23.
5. Rosetti, F., Y. Chen, M. Sen, E. Thayer, V. Azcutia, J. M. Herter, F. W. Luscinskas, X. Cullere, C. Zhu, and T. N. Mayadas. 2015. A Lupus-Associated Mac-1 Variant Has Defects in Integrin Allostery and Interaction with Ligands under Force. *Cell Rep.* 10: 1655–1664.
6. Crispín, J. C., C. M. Hedrich, and G. C. Tsokos. 2013. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9: 476–84.
7. Mohan, C., and C. Puttérman. 2015. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* 11: 329–341.
8. Norgaard, J. O. 1976. A new method for the isolation of ultrastructurally preserved glomeruli. *Kidney Int.* 9: 278–285.
9. Crispín, J. C., S. a Apostolidis, F. Rosetti, M. Keszei, N. Wang, C. Terhorst, T. N. Mayadas, and G. C. Tsokos. 2012. Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 188: 3567–71.
10. Koga, T., C. M. Hedrich, M. Mizui, N. Yoshida, K. Otomo, L. A. Lieberman, T. Rauen, J. C. Crispín, and G. C. Tsokos. 2014. CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J. Clin. Invest.* 124: 2234–2245.
11. Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Luscinskas FW, Zhang Y, Stavrakis G, García-Cardena G, Horwitz BH, Mayadas TN. Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity.* 38(5):1025-37.

2/10

**Generación de Suero Nefrotóxico en Conejo para el Establecimiento de un
Modelo de Nefritis Inducida por Anticuerpos Anti-Membrana Basal
Glomerular en ratones C57BL/6**

Investigadores:

Dra. Florencia Rosetti Sciutto¹
M.V.Z. Mariela Guadalupe Contreras Escamilla²

Estudiantes:

CE 

¹ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

² Departamento de Investigación Experimental y Bioterio, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición-Salvador Zubirán

³ Programa de Estudios Combinados en Medicina, Facultad de Medicina, UNAM

⁴ Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Facultad de Química, UNAM

Introducción

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune crónica que causa importante morbilidad y mortalidad. Desde el punto de vista fisiopatogénico, el LEG se desarrolla en dos fases: a) una fase inicial, en la que existe pérdida de tolerancia a antígenos ubicuamente expresados, en particular a ácidos nucleicos y proteínas asociadas; b) una fase subsecuente en la que complejos inmunes derivados de la asociación de autoanticuerpos y autoantígenos se depositan en vasos susceptibles (e.g. glomérulos renales) en donde instigan inflamación (1).

Uno de los objetivos de nuestro laboratorio es estudiar las diferencias genéticas que, a través de promover o evitar cascadas inflamatorias específicas, modifican el fenotipo clínico de los pacientes. Por ejemplo, se sabe que virtualmente todos los pacientes con LEG tienen complejos inmunes depositados en los glomérulos renales (2), pero solo el ~40% desarrollan inflamación clínicamente significativa (3). Esto indica que existen factores intrínsecos al paciente que modulan la respuesta inflamatoria a los complejos inmunes.

En un trabajo previo, demostramos en un modelo murino, que la integrina Mac-1 juega un papel protector contra el desarrollo de inflamación glomerular inducida por complejos inmunes (4). Este concepto es de gran importancia, puesto que un polimorfismo en el gen que codifica para la cadena alfa de Mac-1 (*ITGAM*) causa una mutación en la proteína que disminuye su función (5). Así, un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) asociado a LEG en estudios genéticos contribuye al desarrollo de nefritis a través de facilitar la respuesta inflamatoria inducida por complejos inmunes (6).

Con el fin de estudiar el efecto que otros factores genéticos ejercen sobre la inflamación renal inducida por complejos inmunes, es necesario para nosotros estandarizar el modelo de nefritis autoinmune experimental. Este modelo, en el que se inyecta suero de conejo inmunizado con glomérulos murinos a ratones sensibilizados contra inmunoglobulinas de conejo, ha sido ampliamente utilizado por nuestro laboratorio y por otros, para estudiar las cascadas inflamatorias en el glomérulo (7).

En este proyecto, se propone la generación de un suero anti-glomerulo de ratón, producido en conejos, que se usará como herramienta en trabajos futuros.

Objetivos

Objetivo general

Generar suero con capacidad nefrotóxica como herramienta para estudios futuros.

Objetivos específicos

1. Obtener glomérulos de ratones C57BL/6.

2. Inmunizar tres conejos con un lisado de proteínas glomerulares (de ratones C57BL/6).
3. Demostrar y titular la capacidad nefrotóxica del suero obtenido.

Hipótesis

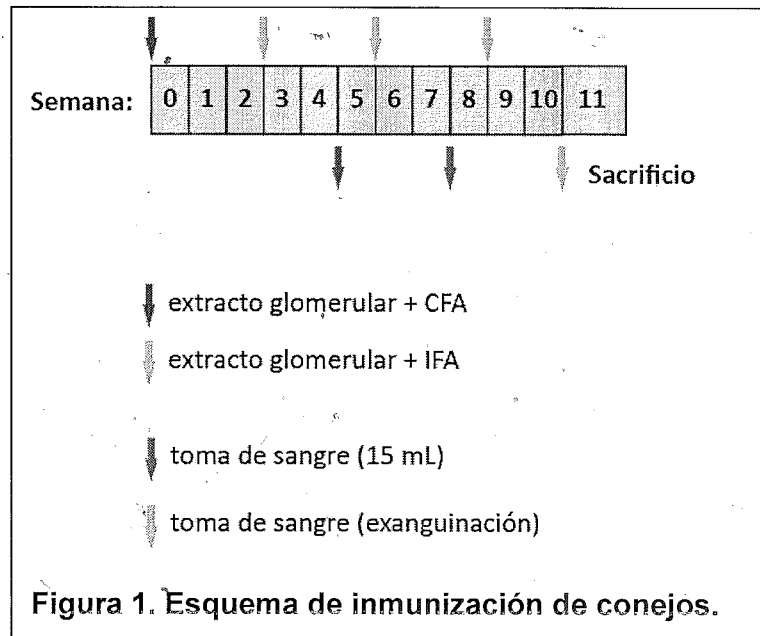
Dado que este no es un protocolo experimental, no se ha planteado una hipótesis.

Métodos

1. Obtención de glomérulos de ratones. Se aislarán los glomérulos mediante centrifugación a través de gradientes de densidad (8). Veinte ratones (indistinto machos y hembras) serán anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón. Se separarán las cortezas, se cortarán en trozos de 1 mm³ y se digerirán en colagenasa (1 mg/mL de colagenasa A, 100 U/mL de desoxirribonucleasa I, en PBS) a 37° C durante 30 minutos con agitación suave. El tejido digerido se presionará suavemente a través de un filtro de 100 µm y se centrifugará a 185 g. El lavado se repetirá 3 veces. El botón se resuspenderá en 3 mL de una solución de Ficoll (27%) y se mantendrá a 4° C. Se añadirán concentraciones decrecientes de Ficoll (2 ml, 23%; 2 ml, 20%; y 3 ml, 11%) para obtener un volumen total de 10 mL de gradiente. Se centrifugará a 1150 g durante diez minutos. Se recogerá el tejido de la interfase 20-11 y se lavarán con PBS. Se corroborará la presencia de glomérulos mediante microscopía.
2. Obtención de lisados glomerulares. El material obtenido en el paso anterior se sonificará en PBS. Una vez obtenido el lisado, las proteínas se cuantificarán mediante reacción de Bradford.
3. Inmunización de conejos. Se formará una emulsión con 50 mg de extractos glomerulares y 250 µL de adyuvante completo de Freund (CFA). La mezcla se inyectará por vía subcutánea a tres conejos (indistinto machos o hembras). Tres semanas después, se administrará un booster (50 mg de extractos glomerulares en adyuvante incompleto de Freund). En total se administrarán 3 boosters a cada conejo (**Figura 1**).
4. Obtención de suero inmune. Dos semanas después de la administración de cada booster, se obtendrá una muestra de sangre de cada conejo (15 mL, por venupunción a través de la oreja). Dos semanas después del último booster, los conejos serán anestesiados y exanguinados por punción cardíaca (**Figura 1**). El suero se separará por centrifugación y se juntará el suero de todas las tomas, de los tres conejos. Se incubará a 56° C durante 1 hora para inactivar

el complemento. Se esterilizará por filtración y se guardarán alícuotas de 0.5 mL a -80°C .

5. **Análisis del potencial nefrotóxico del suero.** Se realizará un ensayo de nefritis autoinmune experimental como hemos realizado en trabajos previos (4, 9, 10, 11). Primero, se sensibilizará a los ratones (hembras) con IgG de conejo. Para esto, se inmunizarán con IgG de conejo en CFA, en la pata izquierda (cojinete). La inyección se realizará por vía subcutánea, con 10 μL de CFA+IgG de conejo. Tres días después, los ratones recibirán una dosis de suero nefrotóxico por vía intravenosa. Se probarán tres diferentes dosis de suero, 50, 100 o 200 μL . Se incluirá un grupo que recibirá la preinmunización pero no el suero nefrotóxico. Se colectará orina los días 0 (antes de la inyección de suero), 7, 14 y 21 para medir albúmina y creatinina. El día 21, los ratones serán sacrificados (mediante una inyección i.p. de pentobarbital sódico, 40 mg/kg y se perfundirán con 20 mL de PBS a través del corazón). Se obtendrán los riñones para análisis histopatológico. Este experimento permitirá determinar cuál es la menor dosis de suero nefrotóxico capaz de inducir el efecto que deseamos: promedio de 3×10^2 Alb/Cre en orina y una calificación que alcance al menos 4 en la escala de daño que utilizaremos (12). Esta escala incluye la evaluación de proliferación endocapilar, infiltración leucocitaria y presencia de media lunas.



Referencias

1. Crispín, J. C., S.-N. C. Liossis, K. Kis-Toth, L. a Lieberman, V. C. Kyttaris, Y.-T. Juang, and G. C. Tsokos. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 16: 47–57.
2. Zabaleta-Lanz, M. E., L. E. Muñoz, F. J. Tapanes, R. E. Vargas-Arenas, I. Daboin, Y. Barrios, J. a Pinto, and N. E. Bianco. 2006. Further description of early clinically silent lupus nephritis. *Lupus* 15: 845–851.
3. De Zubiria Salgado, A., and C. Herrera-Diaz. 2012. Lupus nephritis: An overview of recent findings. *Autoimmune Dis.* 1.
4. Rosetti, F., N. Tsuboi, K. Chen, H. Nishi, T. Hernandez, S. Sethi, K. Croce, G. Stavarakis, J. Alcocer-Varela, D. Gómez-Martin, N. van Rooijen, V. C. Kyttaris, A. H. Lichtman, G. C. Tsokos, and T. N. Mayadas. 2012. Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J. Immunol.* 189: 3714–23.
5. Rosetti, F., Y. Chen, M. Sen, E. Thayer, V. Azcutia, J. M. Herter, F. W. Luscinckas, X. Cullere, C. Zhu, and T. N. Mayadas. 2015. A Lupus-Associated Mac-1 Variant Has Defects in Integrin Allostery and Interaction with Ligands under Force. *Cell Rep.* 10: 1655–1664.
6. Crispín, J. C., C. M. Hedrich, and G. C. Tsokos. 2013. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9: 476–84.
7. Mohan, C., and C. Putterman. 2015. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* 11: 329–341.
8. Norgaard, J. O. 1976. A new method for the isolation of ultrastructurally preserved glomeruli. *Kidney Int.* 9: 278–285.
9. Crispín, J. C., S. a Apostolidis, F. Rosetti, M. Keszei, N. Wang, C. Terhorst, T. N. Mayadas, and G. C. Tsokos. 2012. Cutting edge: protein phosphatase 2A confers susceptibility to autoimmune disease through an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 188: 3567–71.
10. Koga, T., C. M. Hedrich, M. Mizui, N. Yoshida, K. Otomo, L. A. Lieberman, T. Rauen, J. C. Crispín, and G. C. Tsokos. 2014. CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J. Clin. Invest.* 124: 2234–2245.
11. Venkatesh D, Hernandez T, Rosetti F, Batal I, Cullere X, Luscinckas FW, Zhang Y, Stavarakis G, García-Cardena G, Horwitz BH, Mayadas TN. Endothelial TNF receptor 2 induces IRF1 transcription factor-dependent interferon- β autocrine signaling to promote monocyte recruitment. *Immunity.* 38(5):1025-37.
12. Duffau, P., J. Seneschal, C. Nicco, C. Richez, E. Lazaro, I. Douchet, C.

Bordes, J. F. Viillard, C. Goulvestre, J. L. Pellegrin, et al. 2010. Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2: 47ra63.

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