



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DEL AISLADO DE PROTEÍNA DE
AJONJOLÍ SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DE SREBP-1C Y FAS Y SU RELACIÓN CON
LOS NIVELES DE INSULINA, GLUCAGON,
GLUCOSA, COLESTEROL Y
TRIGLICÉRIDOS EN SUERO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
CLAUDIA CECILIA MÁRQUEZ MOTA

Tutor: DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

MÉXICO, D. F.

Agosto 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFFECTO DEL AISLADO DE PROTEÍNA DE AJONJOLÍ SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SREBP-1C Y FAS Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE INSULINA, GLUCAGON, GLUCOSA, COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS EN SUERO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María Amanda Gálvez Mariscal en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Dr. F. Javier Plascencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dr. Armando R. Tovar Palacio	Fisiología de la Nutrición, INCMSZ

Se reconoce la asesoría de la Dra. Nimbe Torres y Torres en el desarrollo de esta tesis.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Armando R. Tovar Palacio	Fisiología de la Nutrición, INCMSZ
Suplente	Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Dra. María Amanda Gálvez Mariscal, gracias por su apoyo en la realización de esta tesis.

Dr. Armando Tovar y Dra. Nimbe Torres, por permitirme formar parte de su laboratorio, donde adquirí conocimientos esenciales para la realización de esta tesis. Gracias por su apoyo.

Gracias por el apoyo a los integrantes del laboratorio del departamento de Fisiología de la Nutrición e integrantes del Programa Universitario de Alimentos (PUAL) de la UNAM.

DEDICATORIAS

A mis padres Cecilia Mota y Rafael Márquez.

A mis hermanos Rafael y Alejandro.

A José Fco. Mateo

ÍNDICE

Tema	Página
Resumen	1
Introducción y antecedentes	2
Efectos metabólicos de la proteína de soya y otras leguminosas	3
Proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein)	5
SREBP-2	7
SREBP-1a y SREBP-1c	7
Ajonjolí	9
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivo	17
General	17
Particulares	17
Metodología	18
Animales de laboratorio utilizados y esquemas de alimentación	18
Protocolo experimental	21
Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero	22
Obtención de mRNA	23
PCR tiempo real cuantitativo (RT-PCR)	24
Estudios histomorfológicos	25
Análisis estadístico	26
Resultados	27
Análisis de aminoácidos	27
Ganancia de peso y consumo de alimento	31
Parámetros bioquímicos y hormonales en suero	35
Concentración de insulina en suero	35
Concentración de glucosa en suero	37
Concentración de glucagon en suero	39
Relación insulina /glucagon	40
Concentración de colesterol en suero	42
Concentración de triglicéridos en suero	44
Concentración de homocisteína en suero	45
Expresión de genes lipogénicos hepáticos: SREBP-1c y FAS	47
Análisis histomorfológico	48
Hígado	49
Tejido adiposo	51
Discusión	60
Conclusiones	66
Bibliografía	68
Anexo I	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de la disposición en la membrana del retículo endoplasmático de SREBP	6
Figura 2. Estructura química del sesamin	12
Figura 3. Degradación de metionina a homocisteína	15
Figura 4. Diagrama de flujo del experimento	19
Figura 5. Ganancia de peso (g) durante el experimento (a) , sección lineal de la ganancia de peso durante el experimento (b) y análisis estadístico de la ganancia de peso (c)	33
Figura 6. Consumo de alimento (g) durante el experimento	34
Figura 7. Concentración de insulina en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	37
Figura 8. Concentración de glucosa en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí.	39
Figura 9. Concentración de glucagon en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	41
Figura 10. Relación insulina/glucagon de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	42
Figura 11 Concentración de colesterol en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	43
Figura 12 Concentración de triglicéridos en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	45
Figura 13. Concentración de homocisteína en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí	47
Figura 14. Expresión relativa de SREBP-1c (a) y expresión relativa de FAS (b) .	48
Figura 15. Histologías de hígado de ratas sacrificadas en ayuno	50
Figura 16. Histologías de hígado de ratas sacrificadas después de 120 minutos de consumir alimento	51
Figura 17. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas en ayuno	52
Figura 18. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas después de 60 minutos de haber consumido alimento.	53
Figura 19. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas después de 120 minutos de haber consumido alimento.	54
Figura 20. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo cero para caseína, soya y ajonjolí	56
Figura 21. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo 60 para caseína, soya y ajonjolí	57
Figura 22. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo 120 para caseína, soya y ajonjolí	58
Figura 23. Efecto del consumo de proteína de ajonjolí en el hígado	66
Figura 24. Diagrama de proceso para la determinación de insulina en suero	74
Figura 25. Diagrama de proceso para la determinación de glucagon en suero	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. PER, R-PER, NPR, R-NPR de la harina de ajonjolí y caseína	13
Tabla 2. Grupos y tipos de proteínas por grupos	18
Tabla 3. Dietas basadas en la recomendación AIN93G	20
Tabla 4. Ensayos fluorogénicos Taqman de Applied Biosystem	24
Tabla 5. Análisis químico proximal	27
Tabla 6. Análisis de aminoácidos de diferentes proteínas utilizadas en el presente trabajo	29
Tabla 7. Valores normales de diferentes parámetros bioquímicos en ratas	35
Tabla 8. Distribución del tejido adiposo en ratas alimentadas con caseína, soya y Ajonjolí	55
Tabla 9. Esquema de pipeteo para medición de triglicéridos	78
Tabla 10. Esquema de pipeteo para medición de colesterol	79
Tabla 11. Reactivos para preparar gel de agarosa 1%	84
Tabla 12. Mezcla de reacción para preparar muestras de RNA para electroforesis	85
Tabla 13. Ejemplo del cálculo para RT	86
Tabla 14. Mezcla de reacción para síntesis de RT	87
Tabla 15. Mezcla de reacción para RT-PCR	88
Tabla 16. Procesamiento del tejido fijado en formalina	89
Tabla 17. Tinción con hematoxilina-eosina	91

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos.

AOAC: Association of Official Analytical Chemist.

Arg: arginina.

bHLH – ZIP: región básica hélice-asa-hélice.

FAS: Ácido graso sintasa (**F**atty **A**cid **S**ynthase).

HDL: lipoproteínas de alta densidad (**H**igh **D**ensity **L**ipoproteins).

HMG – CoA: **H**idroxi **M**etil – **G**lutaril – CoA

INSIG: gen inducido por insulina (Insulin induced gene).

LDL: lipoproteínas de baja densidad (**L**ow **D**ensity **L**ipoproteins).

LDLr: receptores de LDL.

Lys: lisina.

RE: retículo endoplásmico.

Reg: región reguladora.

SCAP: (**S**REBP **C**leavage-**A**ctivating **P**rotein).

SREBP: proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (**S**terol **R**egulatory **E**lement **B**inding **P**rotein).

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (**V**ery **L**ow **D**ensity **L**ipoproteins).

RESUMEN

Las principales fuentes de proteína en la dieta de los organismos superiores, incluyendo al humano, son de origen animal o vegetal. La proteína de origen vegetal que más se ha estudiado es la de soya tanto en humanos como en animales. Uno de los hallazgos más importantes es el mecanismo de acción de la proteína de soya sobre el metabolismo energético. Actualmente se sabe que la proteína de soya disminuye la lipogénesis hepática mediada por SREBP-1c. Es por lo tanto necesario el conocer si otras proteínas provenientes de leguminosas u oleaginosas son capaces de producir estos efectos benéficos a la salud. El objetivo de este proyecto fue evaluar si la proteína aislada de ajonjolí, que es una proteína de origen vegetal, es capaz de regular la lipogénesis hepática a través del mecanismo de expresión génica similar al de proteína de soya. Se alimentaron ratas Sprague Dawley con tres dietas diferentes: caseína (n=25), proteína de soya (n=25) y proteína de ajonjolí (Sesaprot ®) (n=25) durante 21 días en horario restringido. El día 21 se llevó a cabo la eutanasia a diferentes tiempos después de haber consumido alimento: ayuno (n=5), 30 minutos (n=5), 60 minutos (n=5), 90 minutos (n=5) y 120 minutos (n=5). Se determinaron parámetros bioquímicos y lípidos en suero, la expresión génica de SREBP-1 y FAS y el análisis histomorfológico de hígado y tejido adiposo. Se encontró que al alimentar las ratas con aislado de ajonjolí se compromete su crecimiento debido a una baja calificación química. Los parámetros bioquímicos de los tres grupos experimentales se mantienen en el rango normal. Las ratas alimentadas con ajonjolí presentan una mayor relación insulina/glucagon en comparación con los grupos control lo que ocasiona un incremento en la expresión de SREBP-1c y de su gen blanco FAS y por lo tanto un aumento en la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos lo que sugiere un aumento en la lipogénesis hepática. En los estudios histológicos no se encontró ninguna anomalía en el hígado ni en el tejido adiposo. En conclusión, debido a que la proteína de ajonjolí no es de buena calidad y hay un desequilibrio de aminoácidos, se favorece la lipogénesis por un incremento en la expresión de SREBP-1c y su gen blanco FAS y se compromete el crecimiento de animales de laboratorio.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Recientemente con el uso de aceites vegetales como fuente de biodiesel, la industria de alimentos y los productores de algunas proteínas de origen vegetal se han enfrentado con la situación de que existen grandes residuos de proteínas de origen vegetal que queda después de la obtención del aceite (Karp y Richter, 2011). Algunas de estas proteínas son de buena calidad, como la proteína de soya, sin embargo existen otras proteínas como la del ajonjolí de las que no se sabe si son de buena calidad y que se pudieran utilizar como fuente de proteína en humanos. Existe una gran información sobre los efectos de la proteína de soya sobre la salud tanto en ensayos clínicos como a nivel molecular (Velasquez y Bhathena, 2007, y Michelfelder, 2009). Es importante estudiar proteínas con diferente calidad, es decir, algunas de estas proteínas dietarias proporcionan todos los aminoácidos indispensables en cantidad suficiente para llenar el requerimiento de aminoácidos en el organismo (Young y Pellet, 1994). Las fuentes de proteína en la dieta de los organismos superiores, incluyendo al humano son de origen animal o vegetal. En general, se sabe que las primeras cubren el requerimiento de proteínas y se les conoce como proteínas de buena calidad, mientras que las proteínas de origen vegetal son muy heterogéneas en su calidad química. Existen proteínas derivadas de algunas leguminosas, como la de la soya, que tienen una calidad elevada, en tanto que algunas otras, como las proteínas de cereales, presentan deficiencia de varios aminoácidos, lo que las hace proteínas de baja calidad química. En la última década se ha demostrado en animales de experimentación que los cambios metabólicos que genera el consumo de una proteína animal son diferentes a los observados cuando se alimentan animales con ciertas proteínas de origen vegetal (Kritchevsky, 1976). Particularmente se han realizado estudios con la proteína de soya, en los que se ha demostrado su efecto antihiperlipidémico que produce efectos benéficos al prevenir varias alteraciones asociadas con el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, a

pesar de consumir dietas altas en grasas (Ascencio et al, 2004, Torre- Villalvazo, 2008, Jahan-mihan et al, 2011).

Efectos metabólicos de la proteína de soya y de otras leguminosas

El frijol de soya es una leguminosa con alto contenido proteínico (35-40%) en comparación con otras leguminosas y contiene una proporción de aminoácidos indispensables que satisface el requerimiento diario de humanos y roedores. Adicionalmente se ha demostrado que el consumo de proteína de soya ejerce efectos benéficos en la concentración de lípidos circulantes (Torre-Villalvazo, 2008). En un meta análisis del efecto de la proteína de soya sobre el perfil de lípidos en humanos se demostró que reduce el LDL-colesterol en un 13% en comparación con proteína de origen animal (caseína), y adicionalmente se observó una disminución en la concentración de triglicéridos en un 11% (Wang et al, 2003).

Los efectos benéficos de la proteína de soya no solo se pueden atribuir a su perfil de aminoácidos, ya que la planta de soya sintetiza una serie de compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Los flavonoides más abundantes de la soya son las isoflavonas genisteína y dadzeina (Zhang et al, 2007). Las isoflavonas se asocian fuertemente a la proteína y su concentración en aislados de proteína de soya es de aproximadamente de 2 mg/g proteína (Solae Company).

Se ha formulado la hipótesis de que el tipo de proteína dietaria puede regular la secreción de insulina y de glucagon. Se cree que las proteínas de origen animal son más efectivas liberando insulina, mientras que las proteínas vegetales liberan glucagon (Torres y Tovar, 2007). Estudios en islotes pancreáticos incubados con el patrón de aminoácidos similar al del consumo de proteína de soya han demostrado que la secreción de insulina es significativamente menor

que los incubados con el patrón de aminoácidos provenientes de la caseína (Noriega-López et al, 2007).

En estudios con animales alimentados con proteína de soya o caseína, que es la principal proteína de la leche, se ha observado que la concentración de insulina en suero de ratas alimentadas con soya es menor (36%) en comparación con las ratas alimentadas con caseína (Ascencio et al, 2004). De igual manera se han realizado estudios en donde se ha evaluado el efecto de las isoflavonas y con la concentración de aminoácidos presentes en la proteína de soya. Como resultado de este estudio se observó que la secreción de insulina en islotes pancreáticos depende del tipo de aminoácidos y de la presencia de las isoflavonas (Noriega-López et al, 2007). Los efectos benéficos del consumo de la proteína de soya también se pueden observar en un modelo de obesidad en el tejido adiposo, en estudios en los que se alimentaron ratas con dietas en base de caseína y soya se vio que las ratas alimentadas con esta última presentan un tamaño de adipocito pequeño en comparación con ratas alimentadas con caseína (Torre – Villalvazo et al, 2008), lo que indica un adipocito más funcional.

Generalmente las proteínas de origen vegetal tienen una mayor cantidad de aminoácidos dispensables, como arginina, glicina y alanina, mientras que las proteínas de origen animal tienen una mayor cantidad de aminoácidos indispensables, como la lisina. Una baja relación Lys/ Arg se relaciona con altas concentraciones de glucagon en suero. Los cambios en la relación insulina/glucagon pueden también afectar la expresión de genes involucrados en el metabolismo.

La insulina y el glucagon controlan la biosíntesis de colesterol y triglicéridos en suero mediante la modulación de enzimas involucradas en la síntesis y degradación de colesterol así como en la síntesis de ácidos grasos (Torres y

Tovar, 2007). Este proceso se logra a través del control transcripcional de los genes correspondientes y que son regulados por una familia de factores de transcripción conocidos como proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP Sterol Regulatory Element Binding Protein) (Horton et al, 2002).

Proteínas de unión a los elementos de respuesta a esteroides (SREBP; Sterol Regulatory Element Binding Protein)

Las SREBPs son factores de transcripción proteínicos que pertenecen a la familia cierre de Leucina hélice – asa – hélice (bHLH – ZIP). La familia SREBP está constituida por tres miembros: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. En humanos, SREBP-2 está codificada por el gen *SREBF2*. Los otros dos miembros, SREBP-1a y 1c son productos de un gen común *SREBF1* (Eberlé et al, 2004). Las SREBPs se sintetizan como formas precursoras inactivas que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplasmático (RE) en una disposición de horquilla (Vernia Miralles 2007) (figura 1).

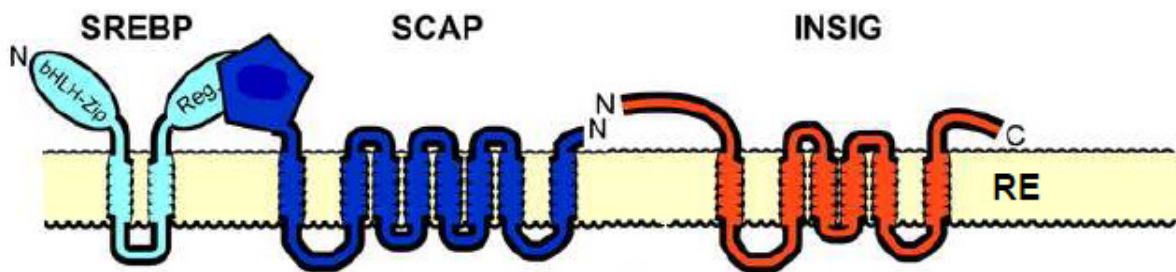


Figura 1. Representación de la disposición en la membrana del retículo endoplasmático de SREBP.

SREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta de esteroides.

SCAP: SREBP-cleavage-activating-protein.

INSIG: Insulin induced gene.

RE: retículo endoplasmático.

bHLH-ZIP: región básica hélice-asa-hélice.

Reg: región reguladora.

SREBP está organizado en tres dominios:

1. El dominio amino terminal, que está orientado hacia el citosol y consta de aproximadamente 480 aminoácidos, en los que acompaña a la región ácida amino terminal una región básica hélice-asa-hélice (bHLH - ZIP) de dimerización y unión al ADN.
2. El segundo dominio tiene unos 90 aminoácidos y consiste en dos hélices transmembrales hidrófobas que están unidas por un asa de unos 30 aminoácidos que se proyectan hacia el lumen del RE y
3. El tercer dominio es la región reguladora carboxilo terminal de unos 590 aminoácidos que se encuentra orientada hacia el citosol.

El dominio carboxilo terminal de SREBP interacciona con el extremo carboxilo terminal de la proteína SCAP (SREBP **C**leavage-**A**ctivating **P**rotein), otra proteína de membrana del RE (ver fig. 1). SCAP consta de 1276 aminoácidos distribuidos en dos dominios: un dominio amino terminal de 703 aminoácidos,

constituido por ocho hélices transmembranales hidrófobas unidas por asas hidrofílicas que se proyectan a cada lado de la membrana, y el dominio carboxilo terminal citosólico de 546 aminoácidos que interacciona con SREBP. Cuando hay bajas concentraciones de insulina en sangre, el complejo SCAP-SREBP interacciona con proteínas de la familia Insig (Insulin Induced Gene) y es retenido en el RE (Vernia Miralles, 2007).

La familia de proteínas Insig está compuesta por dos miembros Insig-1 e Insig-2, son proteínas de membrana que se encuentran en el RE y ejercen un papel central en la regulación de la síntesis de colesterol y ácidos grasos. La expresión de Insig-1 es controlada positivamente por SREBP nuclear, mientras que la expresión de Insig-2 es regulada negativamente por insulina (Feramisco et al, 2003).

A continuación se explica cómo son regulados los tres miembros de la familia SREBP por el tipo de proteína dietaria ingerida.

SREBP-2

El factor de transcripción SREBP-2 se induce por bajas concentraciones de colesterol. Después del consumo de proteína de soya disminuyen las concentraciones de colesterol debido a su efecto hipocolesterolemico, y esto aumenta la transcripción de SREBP-2 (Torres y Tovar, 2007). SREBP-2 se une a promotores de genes involucrados en la respuesta y biosíntesis de colesterol como la hidroximetil – glutaril – CoA reductasa (HMG – CoA reductasa) y receptores de LDL (LDLr) (Torres et al, 2006) para sintetizar colesterol

SREBP-1a y SREBP-1c

El SREBP-1a es la isoforma dominante en cultivos de líneas celulares, mientras que SREBP-1c lo es en tejidos de mamíferos como el hígado y el tejido adiposo (Felder et al, 2005). Los factores de transcripción SREBP-1a y 1c regulan las enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Torres et al, 2006). El SREBP-1a activa genes para la síntesis de ácidos grasos y los genes involucrados en la síntesis y degradación de colesterol y SREBP-1c activa solamente genes para la síntesis de ácidos grasos (Berdanier y Moustaid, 2004). El SREBP-1c está regulado por los cambios de insulina en sangre, activa los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos, es decir, la actividad de SREBP-1c aumenta cuando las concentraciones de insulina son elevadas (Berdanier y Moustaid, 2004). Las primeras ideas sobre el control transcripcional de SREBP-1c por insulina surgieron a partir de experimentos con roedores, en donde se demuestra que cambios en el régimen nutricional, de ayuno a post-prandio, regulan la expresión de SREBP-1c en hígado, tejido adiposo blanco y en músculo esquelético. Por lo tanto la expresión de SREBP-1c disminuye durante el ayuno y aumenta cuando se suministra una dieta alta en carbohidratos. En experimentos subsecuentes en adipocitos y hepatocitos aislados se demuestra que la transcripción de SREBP-1c es inducida por insulina (Eberlé et al, 2004 y Stoeckman y Towle, 2002).

La inducción de SREBP-1c en el hígado es un proceso rápido. En ratas en ayuno, después del consumo de caseína, la concentración de insulina en suero aumenta rápidamente, alcanzado su concentración máxima después de una hora. En estos animales la concentración hepática de mRNA de SREBP-1c aumenta en proporción a los niveles de insulina en suero. Cuando las ratas se alimentan con proteína de soya se observa una reducción del 36% de la concentración de insulina en suero, que a su vez reduce los niveles de mRNA de SREBP-1c en el hígado aproximadamente un 54% (Ascencio et al, 2004).

Uno de los genes blanco de SREBP-1c es la sintasa de los ácidos grasos (FAS). Esta enzima cataliza el último paso de la síntesis de ácidos grasos, es una enzima dimerica que se localiza en el citosol (Liu et al, 2010). Cuando hay una expresión elevada y prolongada de FAS, se corre el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la acumulación de lípidos como la esteatosis hepática. Además de la proteína de soya existen estudios en los que se ha demostrado que la proteína de otra leguminosa como la del frijol también regula a SREBP-1c y por lo tanto la lipogénesis, sin embargo existe escasa evidencia de que la proteína de otras leguminosas u oleaginosas pudieran tener un efecto semejante al de la proteína de soya o a la del frijol. Es por esta razón que es necesario realizar más estudios para caracterizar los efectos de estas proteínas. En particular, el interés de la presente tesis se centra en el estudio de la proteína de ajonjolí el cual se obtiene como un subproducto industrial que pudiera tener un potencial importante sobre sus beneficios para la salud, y que por lo tanto pudiera utilizarse en la generación de nuevos productos con propiedades funcionales importantes en individuos con problemas de obesidad y síndrome metabólico.

Ajonjolí

Se eligió trabajar con la proteína de ajonjolí, porque es un subproducto importante de la extracción de aceites del ajonjolí que se produce en México es una torta de la cual se puede obtener un aislado con un alto contenido de proteína (84.54%). Este proceso fue diseñado por el grupo de las Dras. Farrés, Quirasco y Gálvez en la Facultad de Química y se ha llevado a cabo a nivel industrial en la empresa DIPASA de México quien registró el aislado con la marca Sesaprot®. El ajonjolí es una semilla oleaginosa que contiene 25% de proteína y 50% de grasa (Sen y Bhattacharyya, 2001). Es cultivado extensamente en varias regiones a nivel mundial, que incluyen India, Indochina, Japón, África, la costa mediterránea y actualmente, Estados Unidos, México y varios países de América latina. Existen diferentes variedades de ajonjolí, pero las más cultivadas son *Sesamum indicum* y

Sesamum radiatum; las cuales presentan diferencias en sus características químicas y físicas principalmente en el color de la semilla, que pueden ser blanco crema, rojo oscuro, café y amarillo (Sato et al, 2004).

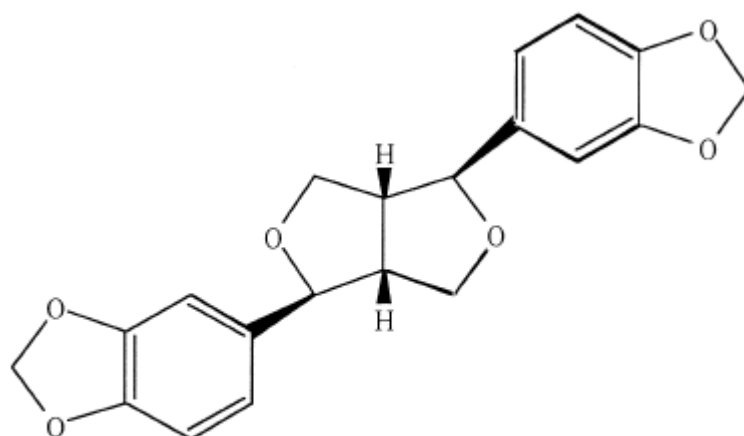
La semilla blanca de ajonjolí es la que se siembra principalmente en México. En el año 2000 la producción de ajonjolí alcanzó las 40,773 toneladas mientras que para el 2009 se obtuvieron, de acuerdo a la SAGARPA, 22,404 toneladas lo que significa que en diez años la producción cayó un 45%. El estado de Sinaloa es el mayor productor nacional de ajonjolí, con una participación de 35.8% en la producción. Otros estados productores son Guerrero con el 18.83%, Oaxaca con 14.6% y Chiapas con 14%. El ajonjolí se adapta a distintas latitudes con la condición de que el clima sea caluroso. Todos los estados productores tienen acceso al mar (Financiera Rural, 2010).

La semilla de ajonjolí es importante en la industria para la obtención de aceites, por su alto contenido de grasa (50%) y es en los residuos de la obtención del aceite de donde se puede obtener el aislado de la proteína de ajonjolí. Actualmente existen pocos estudios sobre el efecto benéfico de la proteína aislada de ajonjolí.

En un estudio realizado por Chen et al en 2005, se evaluó el efecto de la semilla de ajonjolí sobre la disminución de lípidos en el suero y su capacidad antioxidante en 21 pacientes hiperlipidémicos. Durante este estudio a los sujetos se les dio una dieta experimental con 40 g de ajonjolí tostado durante cuatro semanas y después su dieta regular por otras cuatro semanas. En la semana cero, cuatro y ocho se determinó el peso y lípidos en sangre, y se observó que la dieta con ajonjolí disminuye los niveles de colesterol total en suero. Mientras que la oxidación de LDL aumentó por la ingesta de ajonjolí disminuyendo su

concentración a valores deseables. En experimentos realizados en ratas hipercolesterolémicas en donde se suministró harina de ajonjolí al 5 y al 10% como suplemento alimenticio en dietas normales o hipercolesterolémicas, se observó que las ratas alimentadas con el ajonjolí como suplemento presentan una disminución significativa en los niveles de lípidos, colesterol y LDL en plasma junto con un aumento de HDL en plasma. Además, estos animales presentan en sus excreciones esteroides neutros, un aumento en la actividad de la HMG - CoA reductasa, y por último el consumo de ajonjolí incrementó la capacidad antioxidante disminuyendo la peroxidación de los lípidos (Visavadiya y Narasimhacharya, 2008).

El ajonjolí tiene antioxidantes conocidos como lignanas, que tienen varias funciones biológicas además de su capacidad antioxidante. El sesamin (ver Figura 2) y el sesamolin son las principales lignanas del ajonjolí. Se ha observado que las lignanas suministradas en la dieta de ratas disminuyen colesterol en plasma y en el hígado, adicionalmente incrementan la excreción de esteroides neutros (Sugano et al, 1990). El efecto del sesamin en el metabolismo se ha evaluado en ratas (Hirose et al, 1991) y se ha demostrado que cuando se añade 0.5% de sesamin a la dieta de ratas, después de un período de 4 semanas se observa que la concentración de colesterol en suero e hígado disminuye significativamente, independientemente de la presencia de colesterol en la dieta y la actividad de la HMG – CoA reductasa disminuye por el consumo de sesamin.



Sesamin

Figura 2. Estructura química del sesamin

Fuente: Kushiro et al, 2002.

Como se mencionó anteriormente se han hecho estudios de la semilla total de ajonjolí y demostrado sus efectos benéficos, sin embargo no se han realizado estudios sobre el posible efecto benéfico de la proteína de ajonjolí. En el grupo de trabajo de la Facultad de Química de la UNAM, se ha desarrollado con éxito un aislado proteico del ajonjolí con propiedades fisicoquímicas funcionales útiles para su aplicación como emulsificante y espumante (López et al, 2003). En el mismo grupo de trabajo se ha caracterizado la harina residual posterior a la obtención del aislado de ajonjolí (Meza, 2002). En este trabajo se llevó a cabo una evaluación nutricional de la harina de ajonjolí en donde se determinó la relación de la eficiencia de la proteína (PER) y relación neta de la proteína (NPR). La determinación del valor de PER de la harina de ajonjolí y de caseína se llevó a cabo de acuerdo con el método 960.48 del AOAC (Association of Official Analytical Chemist) y consistió en alimentar ratas Sprague-Dawley, machos, recién destetados que se distribuyeron por peso en lotes de 6 ratas por cada tipo de proteína. Cada rata se mantuvo en una jaula individual de piso de rejilla y se le administró agua acidificada y dieta *ad libitum*. Se determinó el consumo neto de

alimento y el peso de cada rata tres veces por semana y por último el día 28. Adicionalmente, se calculó el valor de PER Relativo (R-PER) de la harina de ajonjolí expresando el PER de a harina como porcentaje con respecto al de la caseína.

Para calcular los valores de NPR de la harina de ajonjolí y de caseína se utilizaron los datos registrados hasta el día 14 de las ratas del bioensayo realizado para determinar PER, pero incluyendo un lote adicional al cual se le administró una dieta libre de nitrógeno. De igual manera se calculó el valor de NPR Relativo (R-NPR) de la harina de ajonjolí expresando el valor NPR de la harina como porcentaje con respecto al de la caseína. En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos de PER, R-PER, NPR y R-NPR en este bioensayo.

Tabla 1. PER, R-PER, NPR, R-NPR de la harina de ajonjolí y caseína

PER (harina de ajonjolí)	PER caseína	R-PER (harina ajonjolí) (%)	NPR (harina ajonjolí)	NPR caseína	R-NPR (harina ajonjolí) (%)
2.10	3.09	67.75	3.34	4.38	76.22

Fuente: Meza, 2002

El resultado de R-PER no significa que la calidad de la proteína de ajonjolí sea el 67.75% del valor de la caseína ya que PER no es un valor directamente proporcional a la calidad, mientras que NPR, al acreditar la proteína usada para el mantenimiento del organismo, si lo es, lo que indica que la calidad de la proteína de ajonjolí es equivalente al 76.22% de la de caseína, de acuerdo al dato de R-NPR.

Para caracterizar mejor el aislado de ajonjolí, se propone estudiar el efecto de esta proteína a una concentración de 20% en la dieta de las ratas ya que es la que determina el American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993) en el

crecimiento de los animales así como en algunos parámetros bioquímicos como son insulina, glucagon, glucosa, triglicéridos, colesterol y los posibles factores de transcripción regulados por esta proteína y poderla comparar con otras proteínas para poder hacer recomendaciones sobre su uso y su posible aplicación en la alimentación humana. El aislado de ajonjolí empleado en este estudio, es un aislado comercial conocido por el nombre de Sesaprot.

Por otra parte desde hace tiempo se sabe que la proteína es necesaria en la dieta para proporcionar los aminoácidos esenciales. Todas las pruebas indican que sólo ocho aminoácidos (metionina, triptófano, fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina, valina y treonina) son necesarios para el sostenimiento humano, aunque otros dos más, la arginina y la histidina, pueden ser necesarios para el crecimiento. En general, las proteínas de los alimentos de origen animal contienen estos diez aminoácidos aproximadamente en las proporciones necesarias al organismo animal para producir tejidos. Por lo tanto, los aminoácidos de la proteína de origen animal usualmente son bien utilizados. Las proteínas de las plantas, por el contrario, difieren ampliamente en la composición de aminoácidos. Algunas carecen completamente de uno o más aminoácidos esenciales y todas carecen de la conveniente distribución de los mismos para la nutrición que caracteriza a los alimentos de origen animal. La metionina es un aminoácido de interés ya que a partir de esta se obtiene la homocisteína, la cual se considera como factor aterogénico en diversas patologías (Sánchez et al, 2009, Ford et al, 2010). En la figura 3 se presenta la ruta de degradación de metionina a homocisteína.

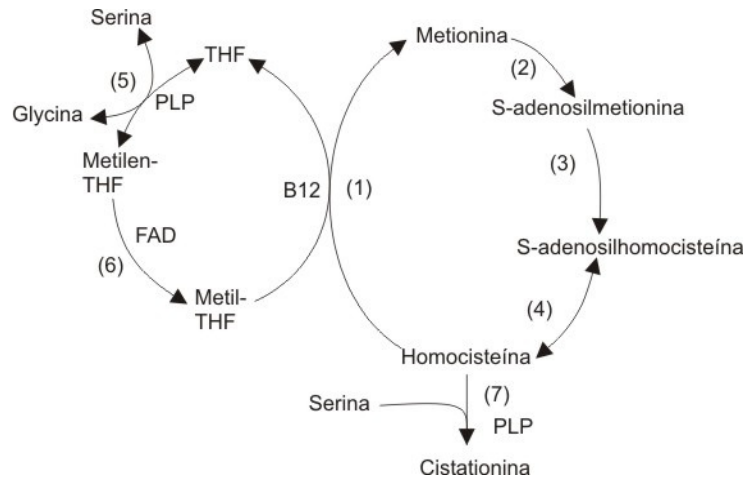


Figura 3. Degradación de metionina a homocisteína

Fuente: Voet et al, 1992.

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado en algunos estudios que existen diferencias en la respuesta metabólica que se producen cuando se consume una proteína de origen animal en comparación con una proteína de origen vegetal. Como se indicó anteriormente las proteínas obtenidas de leguminosas como la soya o el frijón disminuyen la lipogénesis hepática mediada por SREBP-1c. Esto produce beneficios, ya que en animales de experimentación la reducción de la lipogénesis en el hígado se asocia con una disminución en la formación de hígado graso, el cual ocurre frecuentemente cuando en humanos o en animales de experimentación se desarrolla síndrome metabólico. Es necesario por lo tanto conocer si otras proteínas provenientes de leguminosas u oleaginosas son capaces de producir estos efectos benéficos a la salud. Además, es necesario establecer si estos efectos benéficos se llevan a cabo a través de los mecanismos moleculares establecidos para los efectos observados particularmente con la proteína de soya. Es decir, si estas proteínas son capaces de reducir la expresión del factor de transcripción SREBP-1c, y en consecuencia reducir la expresión de sus genes blanco, como la sintasa de los ácidos grasos, lo cual disminuiría la lipogénesis.

En esta tesis se estudiará si la proteína aislada de ajonjolí es capaz de regular tanto las concentraciones de insulina como glucagón y si esto a su vez regula al factor de transcripción SREBP-1 a través del mecanismo de expresión génica similar al de proteína de soya. El ajonjolí es una oleaginosa que se produce en el país y cuyo uso principal es la obtención de aceite, como un subproducto de este proceso se obtiene una pasta residual con un alto contenido proteínico. En la actualidad no existe un estudio sobre cuál podría ser el mecanismo de acción de la proteína del ajonjolí, esto podría brindar la oportunidad de emplear una nueva fuente de proteína que pudiera tener potenciales efectos benéficos para la salud.

HIPÓTESIS

De manera semejante a la proteína de soya, la proteína de ajonjolí reducirá la expresión de SREBP-1c y de su gen blanco FAS como consecuencia de un cambio hormonal de insulina y glucagon generado por su consumo.

OBJETIVO

General

Conocer el efecto de la proteína de ajonjolí sobre el crecimiento de ratas, así como en la expresión génica de SREBP-1c y de la sintasa de los ácidos grasos (FAS), y sobre las concentraciones de insulina, glucagon, triglicéridos y colesterol.

Particulares

Evaluar el efecto de la proteína sobre:

- El crecimiento de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas por un periodo de 18 días en un horario restringido.
- La concentración de insulina, glucagon, colesterol, triglicéridos, glucosa y homocisteína después de la ingestión de la dieta correspondiente durante 21 días y posterior a su sacrificio.
- La expresión génica de SREBP-1c y FAS en hígado de ratas alimentadas con los diferentes tipos de proteínas en la dieta, en las mismas condiciones.
- El efecto de la proteína dietaria sobre la morfología de hígado y tejido adiposo.

METODOLOGÍA

Animales de laboratorio utilizados y esquemas de alimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 200-250 g. Se trabajó con 3 grupos (25 animales por grupo) que se alimentaron con caseína al 20%, proteína de soya al 20% y proteína de ajonjolí al 20% (Tabla 2). En total se utilizaron 75 ratas siguiendo el esquema que a continuación se describe (figura 4).

Tabla 2. Grupos y tipo de proteína por grupo.

GRUPO	TIPO DE PROTEÍNA
1	Caseína
2	Soya
3	Ajonjolí

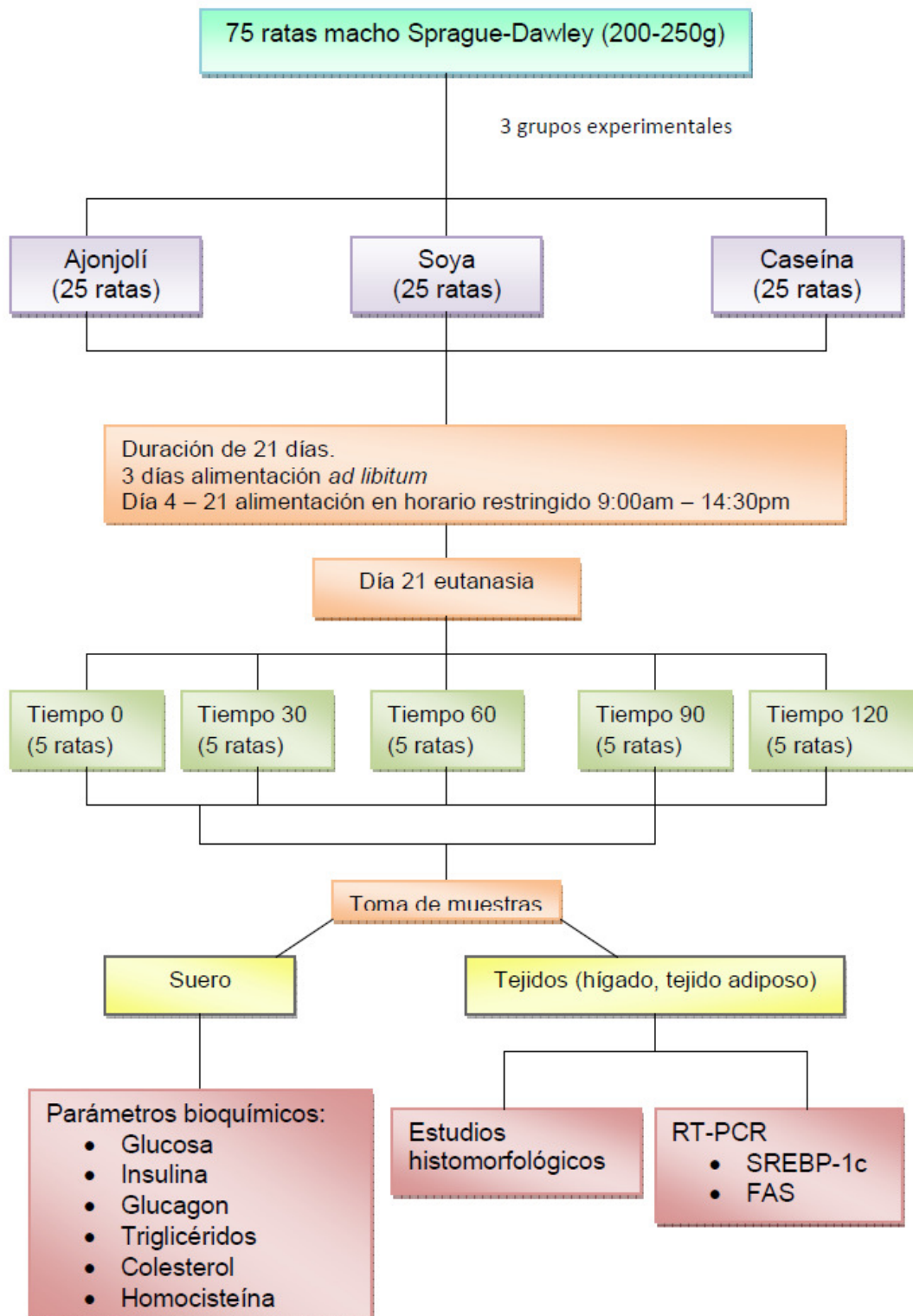


Figura 4. Diagrama de flujo del experimento.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con agua *ad libitum* y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. La formulación de la dieta se realizó siguiendo los lineamientos del American Institute of Nutrition (AIN-93) para dietas de roedores de laboratorio. Por lo tanto la formulación empleada (Tabla 3) para las ratas de este experimento es la AIN-93G, ya que se trata de ratas en la etapa de crecimiento (Reeves et al, 1993).

Tabla 3. Dietas basadas en la recomendación AIN-93G*

Componente	Caseína	Proteína de soya	Sesaprot
	%		
Proteína	22.08	22.2	23.66
Almidón	39.75	39.75	38.75
Maltodextrinas	12.16	12.16	13.2
Sacarosa	8.96	8.96	10
Aceite de soya	7.00	6.8	6.38
Fibra	5.00	5.00	4.92
Mezcla de minerales	3.50	3.50	3.5
Mezcla de vitaminas	1.00	1.00	1
L-cistina	0.30	0.30	0.3
Citrato de Colina	0.25	0.25	0.25
Ter-butilhidroquinona	0.0014	0.0014	0.0014

*AIN – 93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. J. Nutr.123: 1939-1951, 1993

Protocolo experimental

El estudio tuvo una duración de 21 días por grupo. Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales con piso de malla. La composición de las dietas experimentales está referida en la Tabla 4. Las dietas tuvieron el mismo contenido energético y proteínico; sólo se ajustó la cantidad de proteína a añadir conforme a la pureza del aislado o la fuente proteínica a utilizar. Las dietas se administraron *ad libitum* los tres primeros días en comederos de acero. A partir del día cuatro hasta el día 21 se alimentaron en un horario restringido introduciendo la comida a las 9:00 hrs y retirándola a las 14:30 hrs. Durante el estudio se registró diariamente el consumo de alimento y la ganancia de peso se registró cada dos días. Al día 21 del estudio, se sacrificaron cinco animales a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento. La eutanasia se realizó colocando los animales en una cámara saturada con CO₂ para sedarlos, para su posterior decapitación. Se recolectó la sangre de las ratas en tubos con gel separador (BD Vacutainer®, REF 368159, BD Franklin, Lakes NJ, USA) para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, glucagon, triglicéridos y colesterol). A los animales se les realizó necropsia para obtener el hígado para la extracción de RNA total. El tejido se colocó en tubos de microcentrífuga Eppendorf (Microtube, REF 311-08-051, Axigen, Union City, USA) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -70°C (ultracongelador, ULT-1685-A, Revco, Rielsa, México). Se tomaron paralelamente muestras frescas de hígado y tejido adiposo de aproximadamente 1 cm x 1 cm y se colocaron en cassetes para histología (Shandon Cassete, REF 1000957, Thermo Fisher Scientific, Runcorn Cheshire, UK). Los cassetes con el tejido se conservaron en un frasco de vidrio que contenía formalina al 10%, con el propósito de prevenir la autólisis del tejido.

Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero

Las determinaciones de los todos los parámetros hormonales se hicieron en suero. La concentración de insulina (Millipore Rat Insulin RIA KIT, #Cat RI-13K, Millipore, St Charles, Missouri, USA) y glucagon (Millipore Glucagon RIA KIT, Cat. # GL-32K, St Charles, Missouri, USA) se determinaron por medio de radioinmunoensayos, los cuales contienen un antígeno con marca radiactiva. En esta prueba se mezcla una cantidad constante de antígeno marcado radioactivamente y una cantidad constante de un anticuerpo para ese antígeno, se produce la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac) y se cuantifica en un contador de gamas (Quantum D5002, Packard, Lumant, USA) (ver Anexo I).

Las concentraciones de glucosa sérica se analizaron por el método de glucosa oxidasa con el analizador YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI Life Science, Ohio, USA). La concentración de colesterol se determinó con la prueba enzimática fotométrica CHOD-PAD (Cholesterol FS, Diagnostic System International, Germany). El principio de esta prueba es la determinación de colesterol después de su hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador colorimétrico es la quinoneimina, que se genera a partir de la 4-aminoantipirina y fenol por el peróxido de hidrógeno, bajo la acción catalítica de la peroxidasa, y que se produce en cantidades proporcionales a la oxidación enzimática de colesterol (ver Anexo I).

La determinación de triglicéridos se llevó a cabo por medio de un ensayo colorimétrico enzimático que utiliza glicerol-3-fosfato-oxidasa (Triglycerides FS, Diagnostic System International, Germany). El principio de esta prueba es la determinación de los triglicéridos después de la catálisis enzimática con lipoproteína lipasa. El indicador es la quinoneimina la cual se genera a partir de la

4-aminoantipirina y el 4-clorofenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (ver Anexo I).

La homocisteína se cuantificó por el Homocysteine kit para el equipo AxSYM System del laboratorio Abbott (Illinois, USA). Es un inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA) que emplea la homocisteína en su forma oxidada para reducirla con ditioneitol (DTT) a homocisteína libre y la cual es convertida enzimáticamente con adenosil-L-homocisteína hidrolasa a S-adenosil-L-homocisteína (ver Anexo I)

Obtención de mRNA

El RNA total de hígado se aisló por el método de Chomczynski y Sacchi 1986, que tiene una duración de tres días, de la siguiente manera: *Día uno:* 500 mg de tejido congelado en 8 mL de solución de tiocianato de guanidina/ β -mercaptoetanol se homogenizaron con un politrón a máxima velocidad (Polytron, MOD. PT 2000, USA). Se agregaron 400 μ L de N-laurilsarcosina 10% y se centrifugó por 15 minutos, 18°C, 14,000 rpm (23 665 g) (Centrifuga Beckman J2-MC, USA, rotor JA-20). El sobrenadante se transfirió a un tubo de polialómero con 4 mL de cloruro de cesio y se sometió a ultracentrifugación por 18 horas, 18°C, 29 000 rpm (149 309 g) (Ultracentrífuga Beckman XL-90, USA, rotor SW 40TI). *Día dos:* Después de las 18 horas, se eliminó el sobrenadante de los tubos y se disolvió la pastilla de RNA con 300 μ L de agua DEPC (dietilpirocarbonato), posteriormente se agregaron 30 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 750 μ L de etanol 100% frío para precipitar el RNA y se almacenaron por un mínimo de 24 horas a -70°C. *Día tres:* Se descongelaron las muestras en hielo y se centrifugaron 30 minutos, a 4°C y 14,000 rpm (20 817 g) (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11). Se desechó el sobrenadante y se dejaron escurrir los tubos por

inversión sobre una toalla de papel. Se añadió 1 mL de etanol 70% frío y se mezcló hasta que se desprendiera la pastilla. Se centrifugó 15 minutos, a 4°C y 14,000 rpm (20 817 g) (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11) se tiró el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 500 µL de agua DEPC y se almacenó a -70°C (ver anexo I).

Cuantificación de RNA. Para la cuantificación de RNA total de hígado se descongelaron las muestras en hielo y se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) empleando como blanco de la cuantificación agua DEPC. *Electroforesis de RNA.* Para evaluar la integridad del RNA total de hígado se analizaron 15 µg de RNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

PCR tiempo real cuantitativo (RT-PCR)

Para el análisis del contenido de mRNA, es necesario sinterizar el transcrito reverso (RT) de RNA total de hígado. Se realizó por PCR en tiempo real usando ensayos fluorogénicos Taqman de Applied BioSystems cuyos números de identificación aparecen en la Tabla 4 y el equipo ABI prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, User Bulletin no.2).

Tabla 4. Ensayos fluorogénicos Taqman de Applied Biosystem

Tipo de gen	Nombre del gen	Tejido	No. de Identificación del Ensayo Taqman
Genes lipogénicos	SREBP-1c	Hígado	Rn01495769_m1
	FAS	Hígado	Rn00569117_m1
Estructural	Actina	Hígado	Rn00667869_m1

Las muestras se corrieron por triplicado. En la curva de amplificación se determinó el ciclo al corte (Ct) y se determinó el valor de la expresión con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (User Bulletin no.2). Los valores obtenidos se normalizaron empleando el valor de amplificación del gen estructural (ver anexo I).

Estudios histomorfológicos

Las muestras de hígado y tejido adiposo que se encontraban en los cassetes conservados en formalina 10% se embebieron en parafina (Paraplast Plus, Cat-23-021-400, Fisher Scientific Company, Houston, Tx). Este proceso se inicia con la deshidratación del tejido mediante lavados de alcohol, posteriormente se removió el agente deshidratante con xilol que es miscible con la parafina que se utiliza al final para embeber el tejido. Se realizaron cortes con el micrótopo (Leica RM 2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). Los cortes son de diferente grosor dependiendo del tejido a estudiar: para el tejido adiposo se hacen cortes de 10 μm y para el hígado de 4 μm . Los cortes se tiñeron por el método hematoxilina-eosina (Ver anexo I).

Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas bioquímicas lo largo de todo el estudio se expresaron como el valor promedio de cada experimento hecho por duplicado \pm error estándar de la media (SEM). Para cada tiempo de alimentación de los animales de laboratorio se tuvo una $n = 5$, y cada determinación realizada por RT-PCR se hizo por triplicado. La diferencia entre los valores de ganancia de peso, consumo de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales se evaluaron por un análisis de varianza (ANOVA) para múltiples tratamientos con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Para la formulación de la dieta fue necesario conocer la composición química proximal del aislado de ajonjolí (Sesaprot®) que fue llevada a cabo por Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para conocer los análisis proximales de caseína y la soya se emplearon los datos de la ficha técnica de los aislados comerciales (ver Tabla 5)

Tabla 5. Análisis químico proximal.

Componente	Caseína*	Soya**	Ajonjolí***
	Porcentaje		
Humedad	6	5.5	4.24
Proteína cruda	90.6	90	84.54
Extracto etéreo	0.5	0.5	2.61
Cenizas	1.9	4.5	8.25
Fibra cruda	0.0	0.0	0.35

* Análisis químico proximal de la caseína (Harlan, Teklad. Catalog No.160040)

** Análisis químico proximal de proteína aislada de soya (Protein Technologies International SUPRO® 710, proteína aislada de soya)

*** Análisis químico proximal del aislado de ajonjolí (Sesaprot®) de acuerdo a los métodos de ACOAC 1990

Análisis de aminoácidos.

Se ha descrito que la naturaleza de la fuente de proteína dietaria puede influir en los niveles de colesterol en suero. En experimentos con animales se ha demostrado que las proteínas de origen vegetal presentan actividad hipocolesterolémica y las proteínas de origen animal hipercolesterolémicas (Vega – López et al, 2010). Por lo tanto resulta importante conocer el perfil de aminoácidos de las fuentes proteínicas ya que la disponibilidad de los aminoácidos puede regular la expresión de genes de transportadores de aminoácidos, de

factores de transcripción y de proteínas involucradas en la transducción de señales. Para este trabajo los aminogramas se mandaron a hacer al laboratorio Silliker Ibérica y se presentan en la siguiente Tabla, donde se comparan con los valores estándar de la FAO para la proteína ideal para la alimentación de preescolares y se presenta su relación Lys/Arg.

Tabla 6. Análisis de aminoácidos de diferentes proteínas utilizadas en el presente trabajo.

AMINOÁCIDOS	PROTEÍNA				
	FAO	CASEÍNA (Silliker)	SOYA (Silliker)	AJONJOLÍ (Silliker)	AJONJOLÍ (DIPASA)
	mg /g proteína				
Ácido Aspártico		73.95	115.67	92.03	101.4
Ácido Glutámico		224.72	187.78	224.51	225.2
Serina		58.94	55.56	55.36	76.7
Histidina	19	26.60	24.78	26.73	27.0
Glicina		19.32	41.00	54.77	62.6
Treonina	34	44.70	38.11	39.03	28.4
Arginina		37.31	76.33	149.40	13.3
Alanina		32.01	43.22	52.40	38.3
Tirosina		56.95	36.67	43.29	32.0
Valina	35	56.84	39.00	40.81	43.7
Metionina		26.16	12.67	34.07	34.1
Metionina + cistina	25	29.36	23.22	52.99	50.2
Fenilalanina		57.17	54.44	54.29	58.1
Fenilalanina + tirosina	63	1141.28	911.11	97.59	90.1
Isoleucina	28	45.47	38.44	33.36	37.8
Leucina	66	95.58	77.00	72.51	69.6
Lisina	58	77.70	61.11	24.49	22.2
Prolina		116.45	54.11	41.28	
Cistina		3.20	10.56	18.93	16.1
Triptófano	11	12.36	12.00	16.44	31.22
Lys/Arg		2.1	0.8	0.2	1.7

Una baja relación Lys/Arg se asocia con una concentración elevada de glucagon en suero, lo que a su vez disminuye la relación insulina/glucagon y puede influir en la expresión génica de SREBP-1c (Torres et al, 2006). Otro aminoácido de interés es la metionina ya que se cree que está contribuye al desarrollo de hipercolesterolemia en modelos animales (Blachier et al, 2010). De

acuerdo a los aminogramas (Tabla 6) se observa que la caseína y el ajonjolí presentan la mayor concentración de metionina 26.26 mg/g proteína y 34.07 mg/g proteína respectivamente, lo que nos indica que al alimentar ratas con estas proteínas, estas presentarían la mayor probabilidad de desarrollar riesgo aterogénico.

De acuerdo a los resultados obtenidos del aminograma (Tabla 6), el aislado de ajonjolí es deficiente en lisina. En la tabla 8 también se presenta el aminograma para el aislado de ajonjolí de la empresa DIPASA, el cual no presenta similitud con el perfil de aminoácidos reportado por laboratorio Silliker Ibérica. Para los fines de evaluación de los resultados se tomaron los aminogramas de la compañía Silliker ya que los aminogramas de las otras proteínas, como la caseína y soya que se analizaron, concordaban con lo reportado en la literatura. Los perfiles de aminoácidos del aislado de soya y caseína cumplen con el estándar de la FAO para preescolares en edad de 2-5 años,

Cuando existe una deficiencia prolongada de varios aminoácidos en la dieta de roedores se presenta un menor crecimiento y desarrollo en comparación con los alimentados con dietas control (Canfield y Chytil, 1978). Por lo que se esperaba que esta deficiencia pudiera afectar el crecimiento de los animales en este experimento. A continuación se muestra la ganancia de peso y consumo de alimentos de los grupos alimentados con caseína, proteína de soya y proteína de ajonjolí.

Ganancia de peso y consumo de alimento.

Los animales consumieron las dietas antes descritas durante 21 días *ad libitum* (tres días). A partir del cuarto día se inició la alimentación en un horario, restringido entre las 9:00 am y las 2:30 pm, esto con la finalidad de sincronizar el consumo de alimento y así obtener mediciones de parámetros bioquímicos con menor variabilidad tanto en el ayuno como a diferentes tiempos después de consumir el alimento. En la figura 5a, se observa que durante el tiempo de alimentación *ad libitum* los animales aumentaron de peso, sin embargo al iniciar la alimentación restringida los animales no consumen suficiente alimento por que están acostumbrados a tenerlo *ad libitum* y a comer en el ciclo de oscuridad. Mientras aprenden a comer, en el periodo impuesto se observa una disminución en el peso, que recuperan después de un periodo de adaptación, el cual para las ratas alimentadas con proteína de ajonjolí fue mayor a cinco días, mientras que las ratas alimentadas con las dietas control, caseína y soya, tuvieron un periodo de adaptación al horario de alimentación de tres días. A partir del día 11 las ratas alimentadas con ajonjolí consumen suficiente alimento, que compensa la deficiencia de lisina de este aislado y presentan una mayor ganancia de peso; a pesar de la compensación, si el experimento se hubiera prolongado por más tiempo las ratas alimentadas con ajonjolí probablemente no hubieran alcanzado el mismo nivel del crecimiento que el de las ratas alimentadas con las dietas control. Este comportamiento de las ratas alimentadas con la proteína de ajonjolí se explica por su bajo contenido de lisina (Ver Tabla 6), lo que resulta en un bajo crecimiento de la rata (Canfield y Chytil, 1978).

En la figura 5b se observa la gráfica de la sección lineal de crecimiento de los animales, esta sección se consideró a partir del día 11 de experimentación, junto con estas gráficas se presentan las ecuaciones de la recta en donde la pendiente nos indica la ganancia de peso en gramos por día de los animales y es

importante resaltar que la ganancia de peso por día de los tres grupos de animales presenta diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) (ver figura 5c) siendo las ratas alimentadas con ajonjolí las que presentaron una menor ganancia de peso por día (3.19 g/día) en comparación con las ratas alimentadas con proteína de soya (3.38 g/día) y las ratas alimentadas con caseína (3.71 g/día).

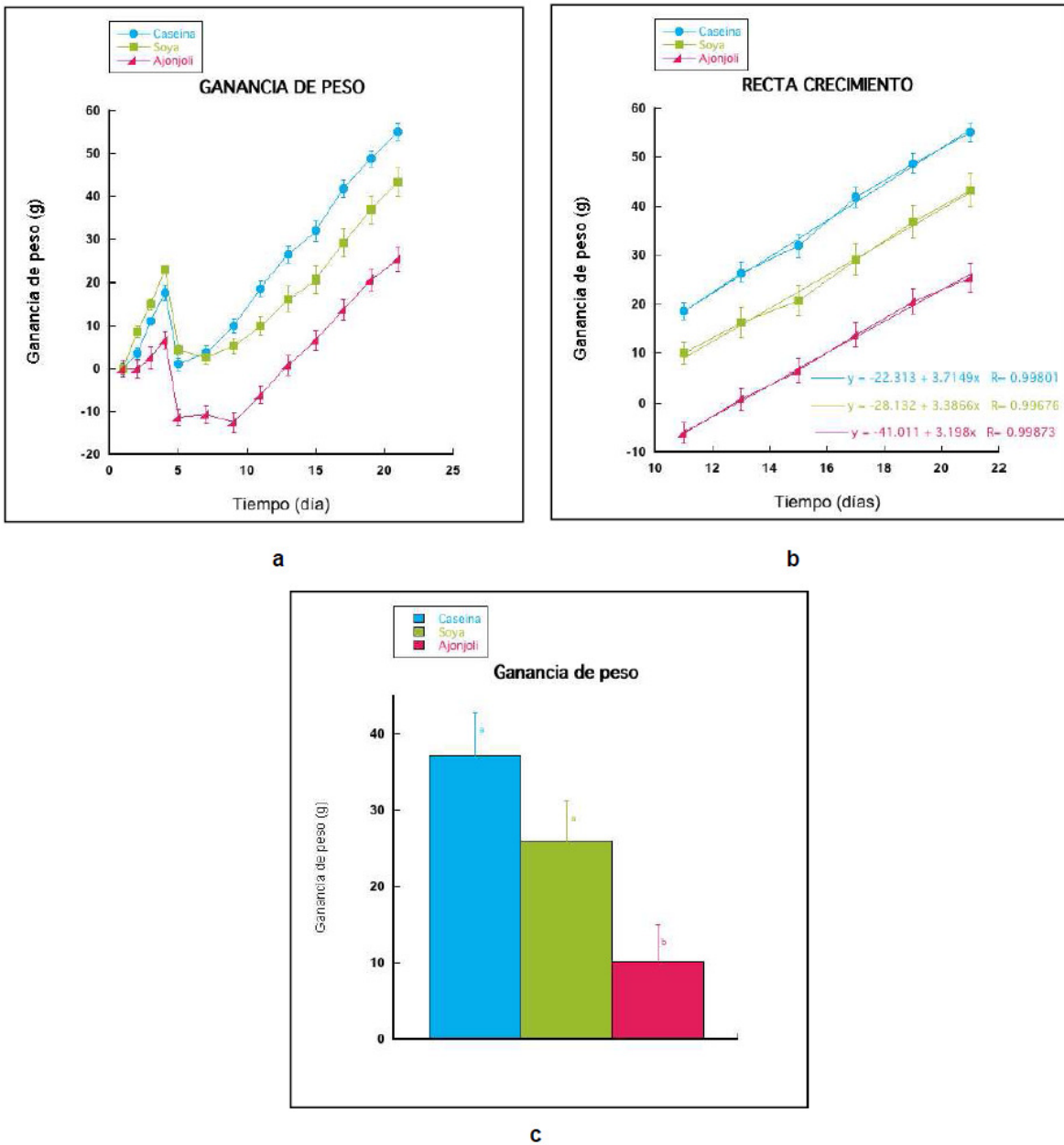


Figura 5. Ganancia de peso (g) durante el experimento (a), sección lineal de la ganancia de peso durante el experimento (b) y análisis estadístico de la ganancia de peso (c). n=25, a>b las letras indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Con respecto al consumo de alimento, en la figura 6a se presenta el consumo de alimento durante el experimento, como se observa al cuarto día de experimento (cuando inicia la alimentación restringida) los tres grupos presentan una notable disminución en el consumo de alimento, que después del horario de adaptación se recupera. De las tres dietas el consumo de proteína de ajonjolí fue significativamente menor (Ver figura 6b) durante el experimento (12.42 g/día), en comparación a la dieta de proteína de soya (15.09 g/día) y la dieta de caseína (15.70 g/día).

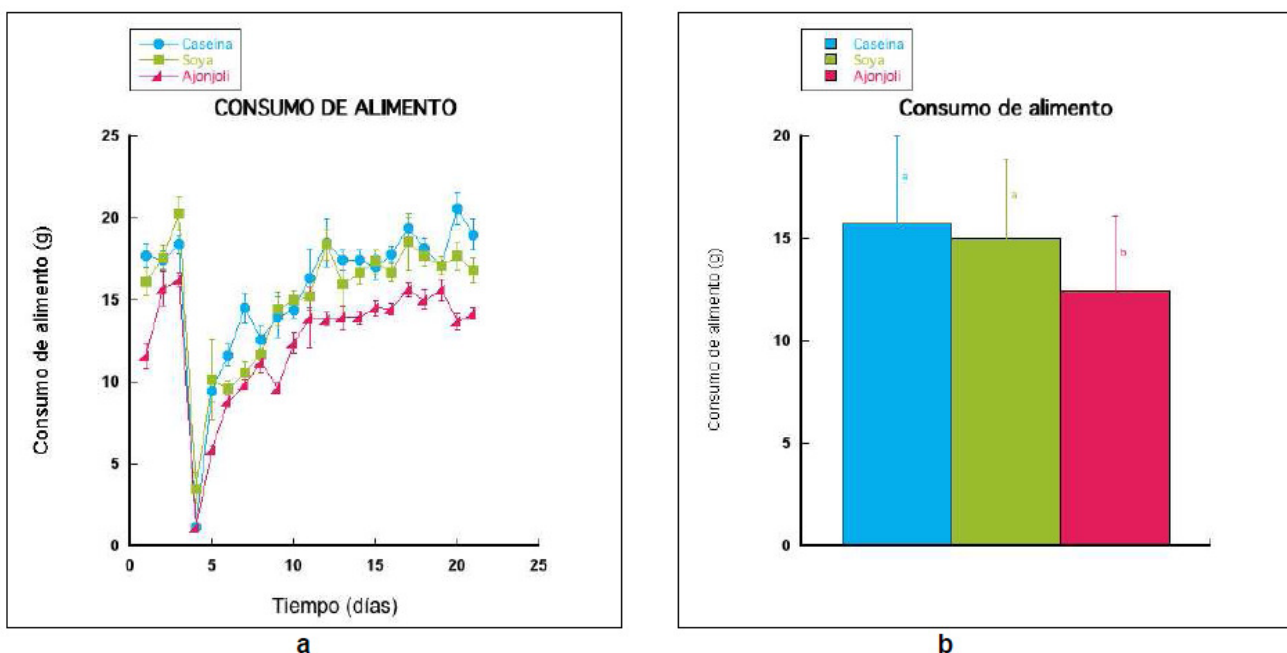


Figura 6. Consumo de alimento (g) durante el experimento **(a)**, análisis estadístico del consumo de alimento (g) durante el experimento **(b)**. n=25, a>b las letras indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Parámetros bioquímicos y hormonales en suero.

Para determinar los cambios metabólicos que se producen por el consumo de una proteína dietaria específica es necesario realizar la determinación de parámetros bioquímicos en suero. Antes de comenzar el análisis de los parámetros observados es importante conocer cuáles son los valores normales de referencia en animales sanos, los cuales se presentan a continuación.

Tabla 7: Valores normales de diferentes parámetros bioquímicos en ratas

Parámetro bioquímico	Intervalo
Glucosa	80 – 150 mg/L
Insulina ¹	0.5 – 2.0 ng/mL
Glucagon ¹	50 – 150 pg/mL
Colesterol ²	200 mg/dL
Triglicéridos ²	150 mg/dL
Homocisteína ³	5 – 12 μ mol/L

Fuente: 1 Thorell, 1979. 2 Rifai, 1999. 3 Sánchez, 2009

Concentración de insulina en suero.

Para evaluar si la proteína de ajonjolí era capaz de mantener la concentración de insulina en niveles normales se determinó la concentración de insulina en suero. Como se puede observar en la figura 7 la concentración de insulina de los tres grupos experimentales se encuentran dentro de los rangos normales para animales sanos, es importante resaltar que las ratas alimentadas con caseína alcanzan el pico máximo de concentración a los 60 minutos de haber

consumido alimento y posteriormente disminuye; siendo esta concentración 37.08% mayor que el de las ratas alimentadas con proteína de soya y 28.15% mayor que el de las ratas alimentadas con proteína de ajonjolí. Las ratas alimentadas con soya mantienen la concentración de insulina en niveles más bajos, con menor variación y sin un pico tan marcado como lo muestra la caseína. Las ratas alimentadas con proteína de ajonjolí presentan el máximo de concentración de insulina a las dos horas de haber consumido alimento siendo esta concentración 21,17% mayor que el de las ratas alimentadas con caseína y 73.72% mayor que el de las ratas alimentadas con soya. De acuerdo a la tendencia que presenta la gráfica posiblemente tienda a mantenerse elevada por más tiempo. En el hígado la transcripción de la mayoría de los genes que sintetizan enzimas metabólicas, son inducidos por la insulina (Foufelle y Ferré, 2002). De acuerdo a lo anterior probablemente las ratas alimentadas con proteína de ajonjolí presenten una lipogénesis más activa en comparación con las ratas alimentadas con las dietas control.

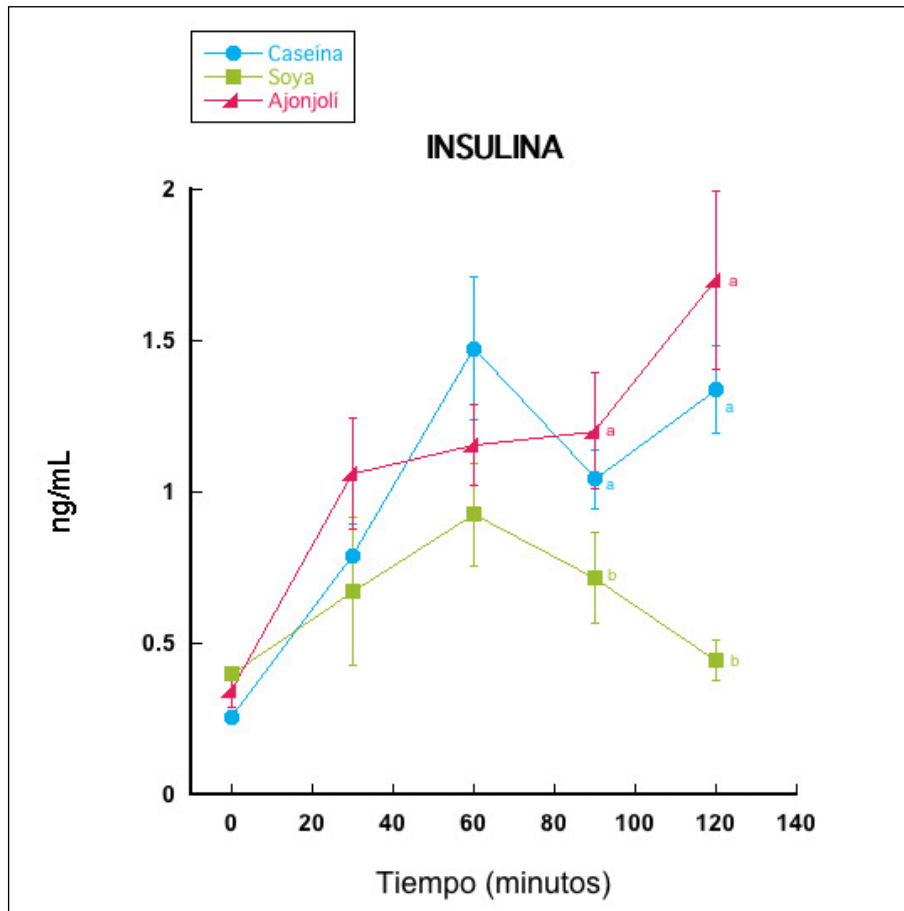


Figura 7. Concentración de insulina en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Concentración de glucosa en suero.

En la figura 8 se presenta la concentración de glucosa en suero. En este figura los valores de glucosa de los tres grupos se encuentran en concentraciones normales, sin embargo los animales alimentados con ajonjolí presentan una tendencia mayor a elevar el valor de glucosa en sangre de forma significativa a los 30 minutos, comparado con caseína y soya, siendo la última la que mantiene en menor concentración la glucosa. La tendencia en la concentración de glucosa que

presentan las ratas alimentadas con ajonjolí se relaciona con la concentración de insulina. Cuando la glucosa llega a la sangre desde el intestino, tras una comida rica en hidratos de carbono, el aumento de glucosa en sangre provoca la secreción de insulina y una disminución de la secreción de glucagon. Debido a la captación acelerada de la glucosa sanguínea, la concentración de glucosa en sangre disminuye hasta niveles normales y también disminuye la liberación de insulina por las células β del páncreas. Por lo tanto hay una estrecha relación retroactiva entre la velocidad de secreción de insulina y la concentración de glucosa en sangre (Nelson et al, 2000, Benyon, 2003). De acuerdo a lo anterior al tener una concentración elevada de glucosa en suero se liberará insulina, comportamiento que se observa en las ratas alimentadas con ajonjolí, es decir, tienen la concentración más elevada de glucosa de entre los tres grupos y por ende presentan una concentración alta de insulina.

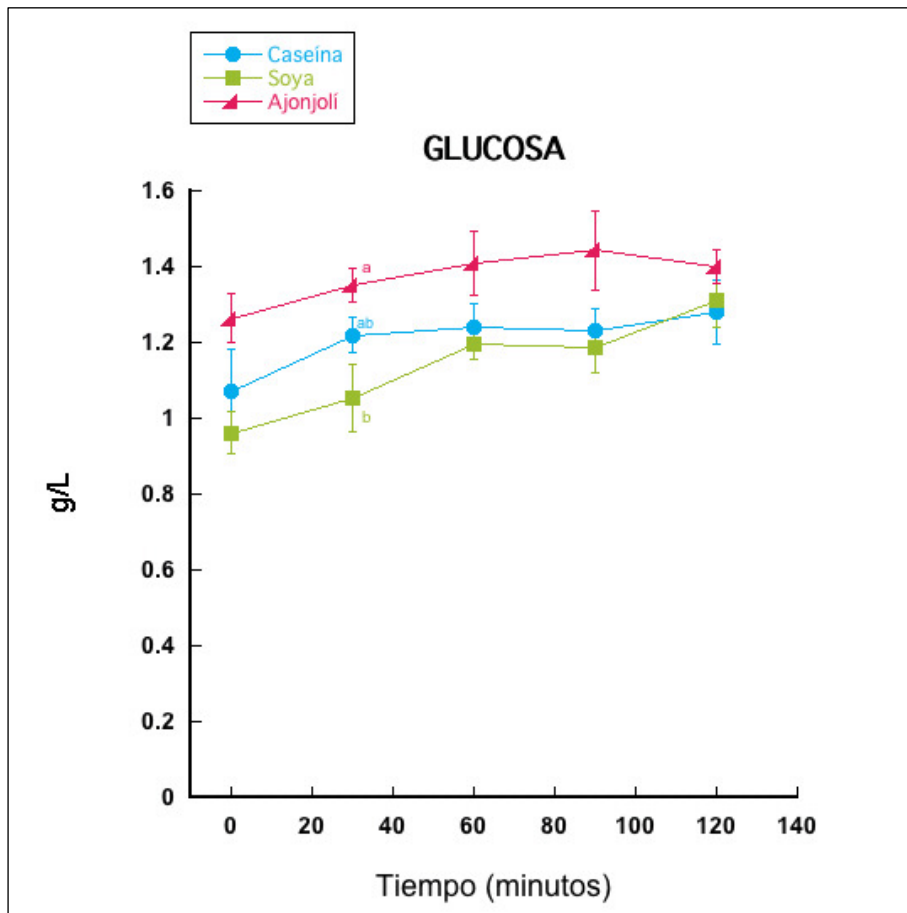


Figura 8. Concentración de glucosa en suero de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas

Concentración de glucagon en suero.

La insulina y el glucagon participan en la homeostasis de glucosa y lípidos, produciendo efectos opuestos en las rutas biosintéticas y catabólicas del hígado (Saltiel y Kahn, 2001). La concentración de glucagon en suero depende de la cantidad y composición de la proteína ingerida, generalmente proteínas vegetales

tienen una mayor cantidad de aminoácidos dispensables, mientras que las proteínas de origen animal tienen una mayor cantidad de aminoácidos indispensables. Una relación Lys/Arg (2.0) elevada se asocia con concentraciones elevadas de glucagon en suero (Torres et al, 2006). En estudios realizados sobre el efecto de la proteína dietaria se encontró que el consumo a largo tiempo de proteína soya aumenta la concentración de glucagon en comparación con ratas alimentadas con caseína (Torres et al, 2006). Como se observa en la figura 9 las ratas alimentadas con proteína de ajonjolí y proteína de soya mantienen la concentración glucagon en los niveles más bajos en comparación a las ratas alimentadas con caseína y es importante resaltar que estas elevan significativamente la concentración a los 60 y 90 minutos de haber consumido alimento. Esto nos indica que la proteína de ajonjolí es efectiva para disminuir los niveles de glucagon en suero al igual que la proteína de soya. Estas variaciones en la concentración de glucagon afectan la relación insulina / glucagon en los tres grupos. Es importante hacer notar que las concentraciones van a variar dependiendo del tiempo de ayuno y del tiempo de postprandio.

Relación insulina / glucagon.

Con los valores obtenidos de la concentración de insulina y glucagon se calculó la relación insulina / glucagon la cual tiene injerencia sobre la expresión génica de SREBP-1c, donde una baja relación insulina / glucagon disminuye la expresión de SREBP-1c (Torres et al, 2006). En la figura 10 se presenta la relación insulina / glucagon de las ratas alimentadas con caseína, proteína de soya y proteína de ajonjolí siendo esta última la que presenta una relación significativamente mayor a los 30 minutos después de haber consumido alimento y mantiene esta tendencia durante el tiempo. Es importante resaltar que las ratas alimentadas con la proteína de soya presentan la menor relación de entre los tres grupos experimentales y que las ratas alimentadas con caseína presenta una

relación similar a la de soya y menor que la de ajonjolí. Esta relación es un indicativo de una posible elevada expresión del SREBP-1c, es decir mientras más alta sea esta relación mayor hay mayor expresión de este factor de transcripción, por lo tanto probablemente las ratas alimentadas con la proteína de ajonjolí presentan una mayor expresión de SREBP-1c.

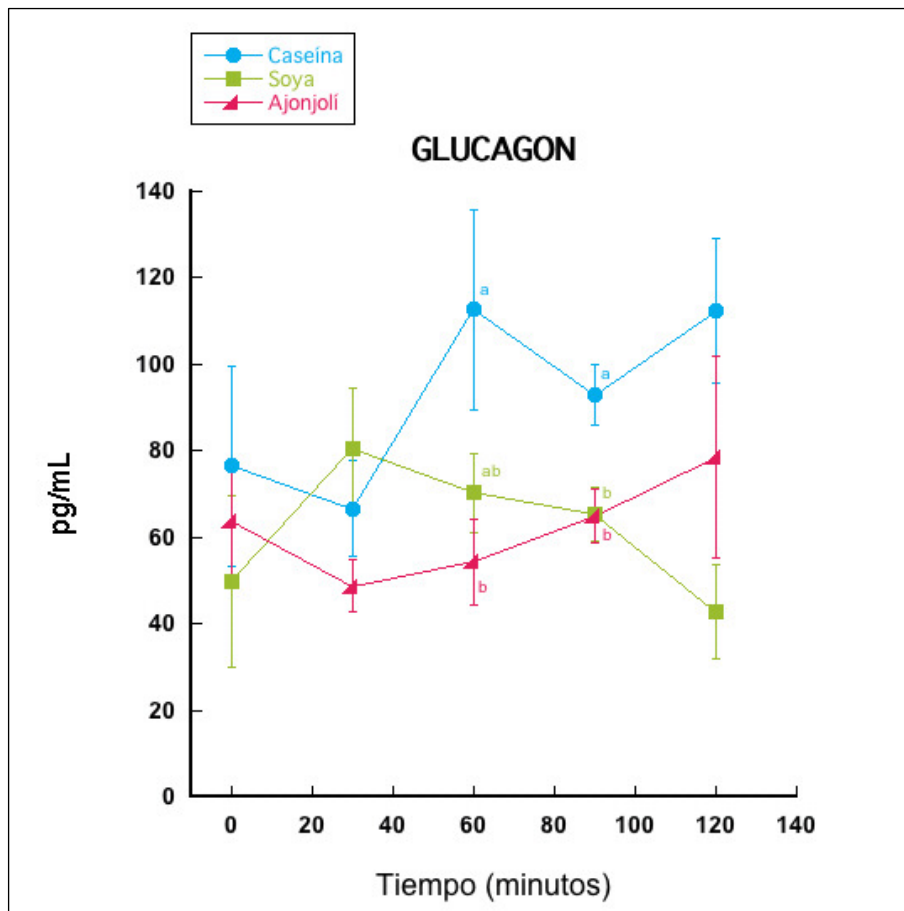


Figura 9. Concentración de glucagon en suero para ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

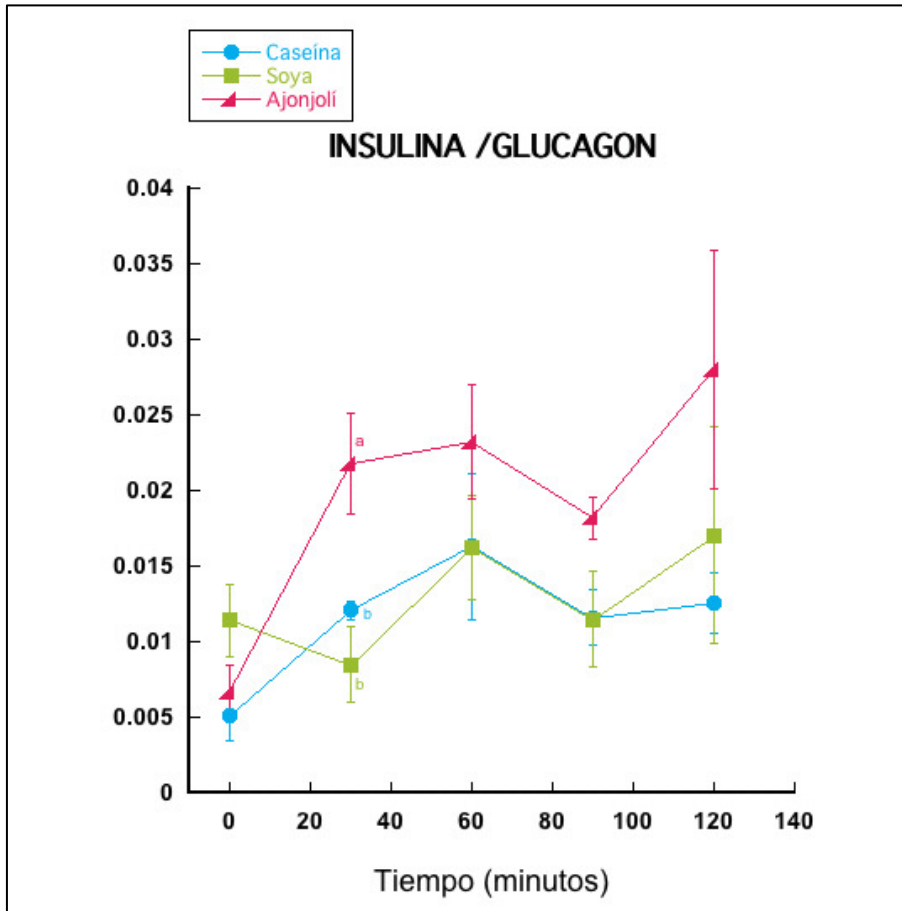


Figura 10. Relación insulina/glucagon de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Concentración de colesterol en suero.

En la figura 11 se presenta la concentración de colesterol en suero de las ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. Como se observa en esta figura la concentración de colesterol no varía entre los grupos experimentales, sin embargo existe diferencia a los 60 y 90 minutos después de haber consumido alimento en las ratas alimentadas con ajonjolí en comparación a las ratas alimentadas con caseína y soya. Se ha reportado el efecto hipocolesterolémica de la proteína de

soya sin embargo este efecto solo se aprecia en animales con hipercolesterolemia (Torres et al, 2006), es por lo anterior que no se observan variaciones en la concentración de este parámetro bioquímico ya que para el presente estudio se trabajo con animales sanos. El colesterol en suero no presenta cambios significativos en estudios de corto tiempo, como en este caso.

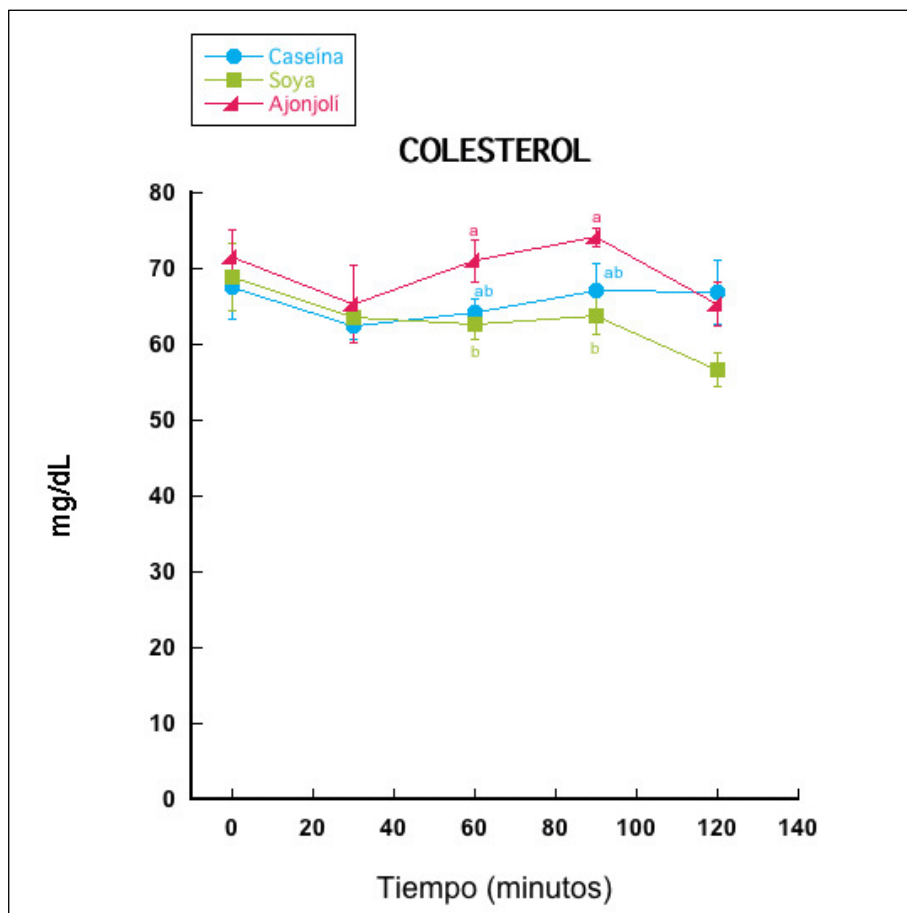


Figura 11. Concentración de colesterol de animales alimentados con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Concentración de triglicéridos en suero.

En general, los tres grupos presentaron concentraciones de triglicéridos dentro de los valores normales (figura 12). Sin embargo, las ratas alimentadas con soya presentaron un aumento de la concentración de triglicéridos a los 60 y 90 minutos después de haber consumido alimento que es significativamente mayor a la concentración de triglicéridos de ratas que consumieron caseína en los mismos tiempos, y esta diferencia no se nota con las ratas alimentadas con ajonjolí ya que no presentan diferencia con las ratas alimentadas con soya.

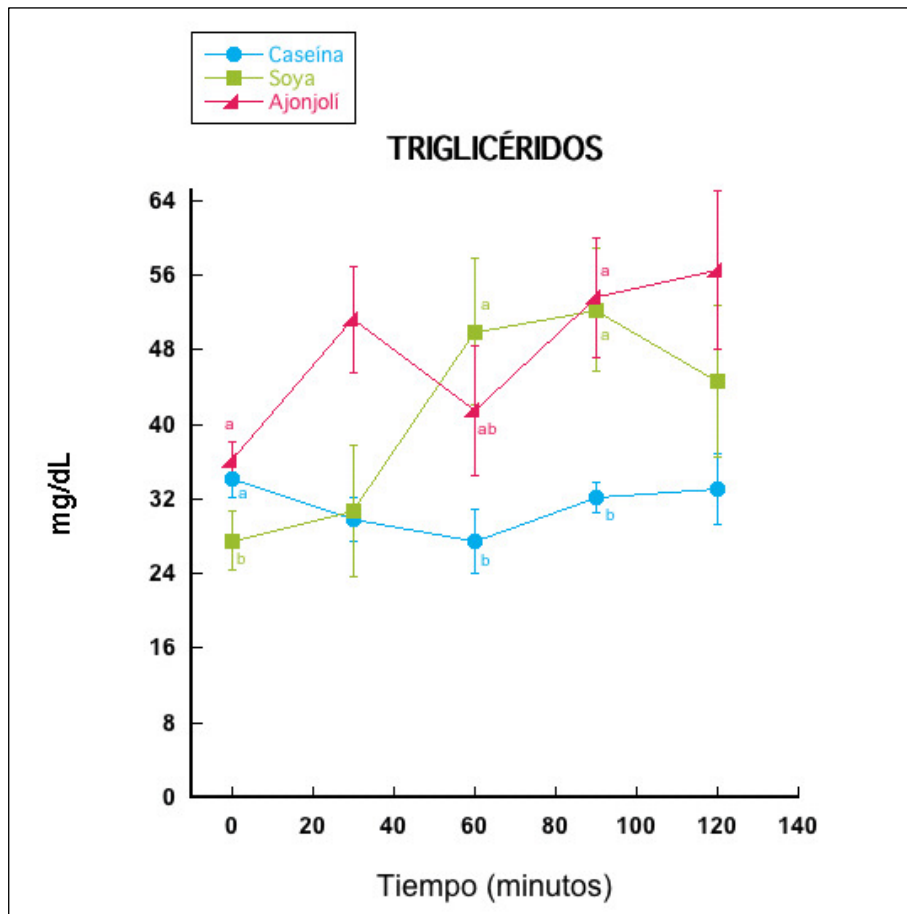


Figura 12. Concentración de triglicéridos de animales alimentados con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Concentración de homocisteína en suero.

Como se mencionó con anterioridad el perfil de aminoácidos de cada proteína tiene un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de animales de laboratorio. Un aminoácido de interés es la metionina, ya que a partir de esta

se obtiene la homocisteína, la cual se considera como factor aterogénico en diversas patologías (Sánchez et al, 2009). De acuerdo a los aminogramas (Tabla 6) se observa que el ajonjolí presenta la mayor concentración de metionina 34.07 mg/g proteína, mientras que para la caseína el contenido de metionina es de 26.16 mg/g proteína y para la proteína de soya es de 12.67 mg/g de proteína. Esto nos indica que probablemente las ratas alimentadas con caseína presenten la mayor concentración de homocisteína en suero al igual que las ratas alimentadas con ajonjolí. En la figura 13 se presenta la concentración de homocisteína en suero en donde se observa que las ratas alimentadas con caseína presentan la mayor concentración de homocisteína a los diferentes tiempos alcanzando su concentración máxima después de dos horas de haber consumido alimento, mientras que las ratas alimentadas con soya y ajonjolí presentan la menor concentración de homocisteína. En el caso de las ratas alimentadas con ajonjolí estas presentan una baja concentración de homocisteína en suero.

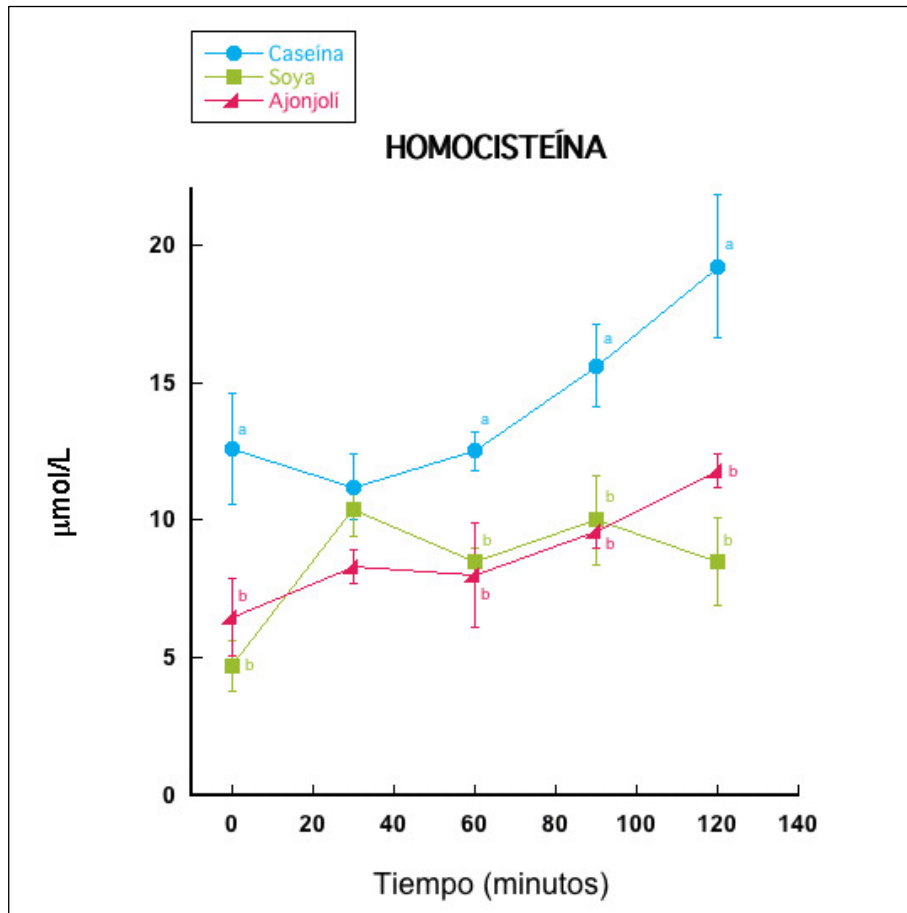


Figura 13. Concentración de homocisteína en ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. n=5, a>b las letras en un tiempo dado indican diferencias significativas con las diferentes proteínas.

Expresión de genes lipogénicos hepáticos: SREBP-1c y FAS.

En la figura 14a se presenta la expresión relativa de SREBP-1c para las ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí, en esta figura se observa que las ratas alimentadas con ajonjolí presentan la mayor expresión relativa de este gen durante el tiempo, mientras que las ratas alimentadas con soya presentan un comportamiento esperado, es decir, la expresión relativa de las ratas alimentadas con proteína de soya es menor que el de las ratas alimentadas con caseína. En la

figura 14b se presenta la expresión relativa de FAS, en esta figura se observa que existe correlación entre la expresión de SREBP-1c y FAS, es decir, las ratas alimentadas con ajonjolí presentan la mayor expresión relativa durante el tiempo, presentando su pico máximo de actividad a los 60 minutos de haber consumido alimento. En el caso de las ratas alimentadas con soya presentan una baja expresión de este gen, mientras que las ratas alimentadas con caseína presentan una expresión relativa mayor en relación a las ratas alimentadas con soya, sin embargo ésta no sobrepasa la de las ratas alimentadas con ajonjolí.

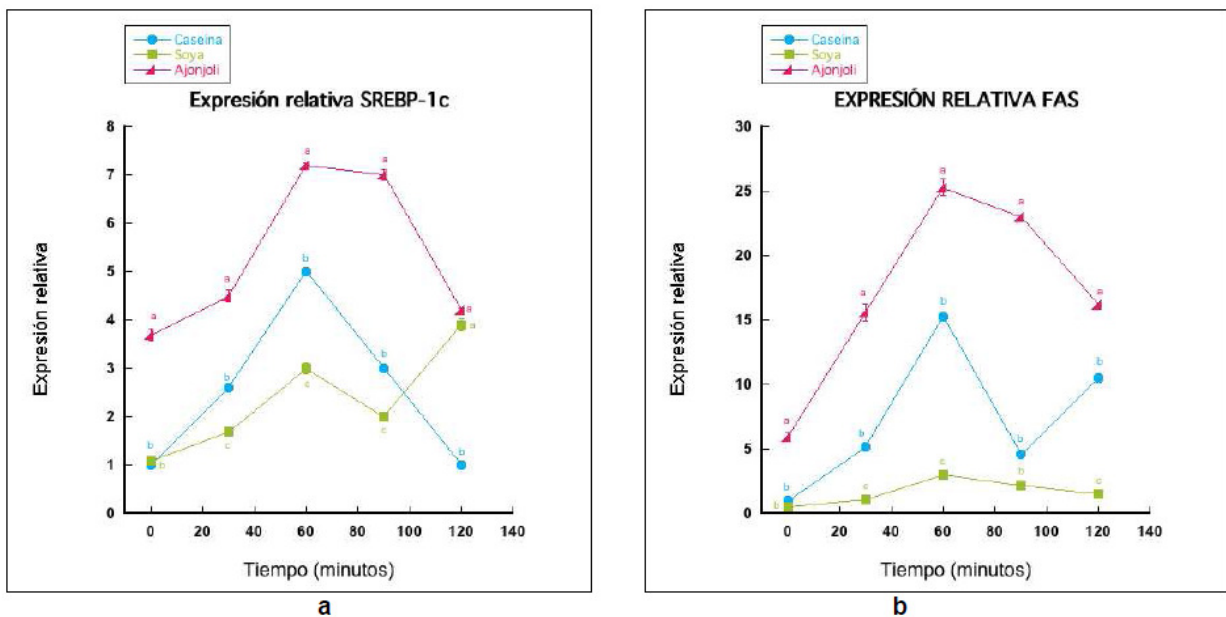


Figura 14. Expresión relativa de SREBP-1c (a) y expresión relativa de FAS (b).

Análisis histomorfológico.

Los estudios histomorfológicos analizan la estructura microscópica de los tejidos y es de interés en este proyecto realizar la histología del hígado y el tejido adiposo de ratas alimentadas con las distintas dietas y así de esta manera observar si existe algún cambio en la morfología de los tejidos por efecto de la

fuentes de proteína consumida. Para el hígado sólo se emplearon tejidos de dos tiempos el cero y el 120 min. Se eligieron estos puntos por que son el punto inicial y el punto final del protocolo experimental.

En el caso de tejido adiposo, se emplearon los tejidos de las ratas sacrificadas en tres tiempos diferentes: cero (ayuno), 60 y 120 minutos después de haber consumido alimento para observar si había cambios significativos en el tamaño de los adipocitos. Fue necesario estandarizar el grosor del corte histológico así que se ensayaron cortes de 4 μm , 6 μm y 10 μm ; con el primer y segundo grosor resultaba difícil manipular el corte y con el de 10 μm se logró una buena tinción en donde se pudo distinguir con facilidad los adipocitos.

- **Hígado**

A continuación, en las figuras 15 y 16, se presentan las fotografías de los cortes histológicos de hígado en ayuno y a los 120 minutos, de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. Un hígado sano en mamíferos se caracteriza por la disposición radial de los hepatocitos en torno a una vena grande (vena central), constituyendo pequeñas unidades histológicas, o lobulillos hepáticos. Los lobulillos pueden estar separados unos de otros por tejido conjuntivo (Welsch y Storch, 1976). Estas características se observan en las figuras 15 y 16 lo que indica que las dietas suministradas no afectaron a las células del hígado.

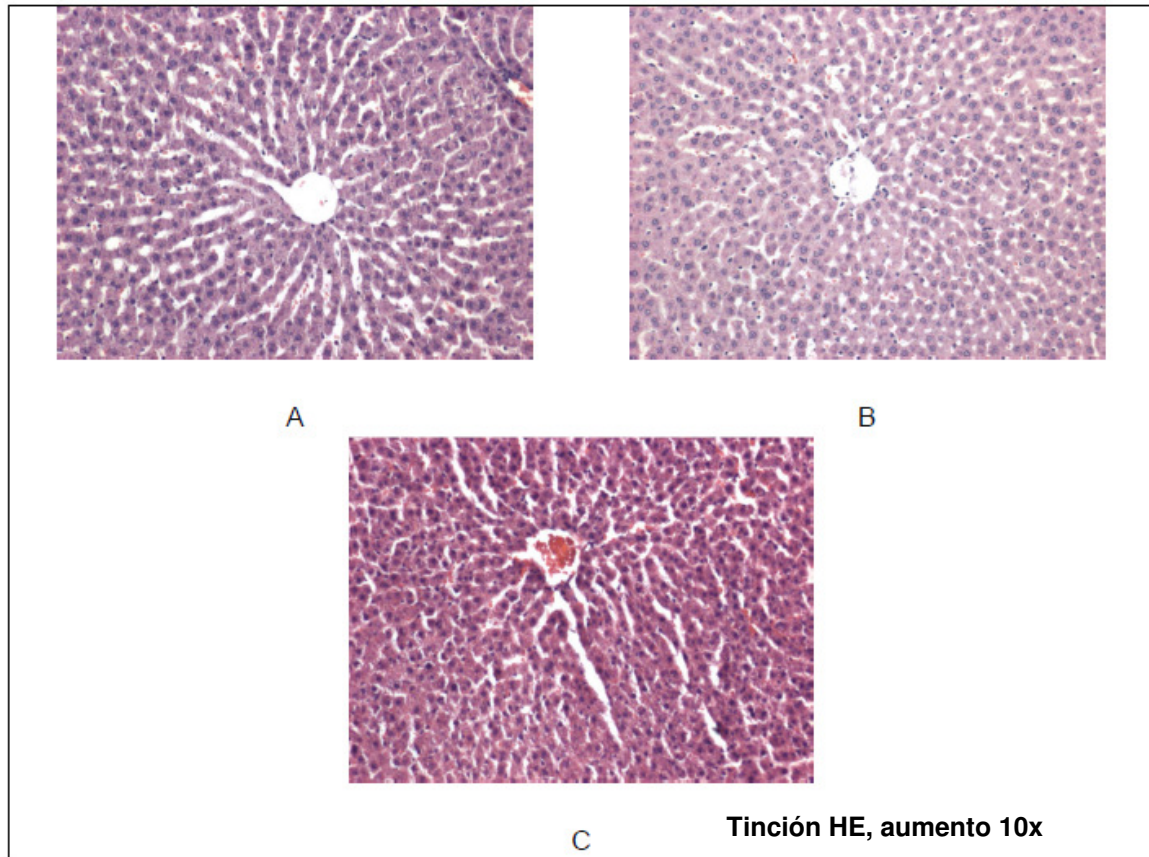


Figura 15. Histologías de hígado de ratas sacrificadas en ayuno (A) caseína, (B) soya y (C) Sesaprot. Tinción con hematoxilina-eosina

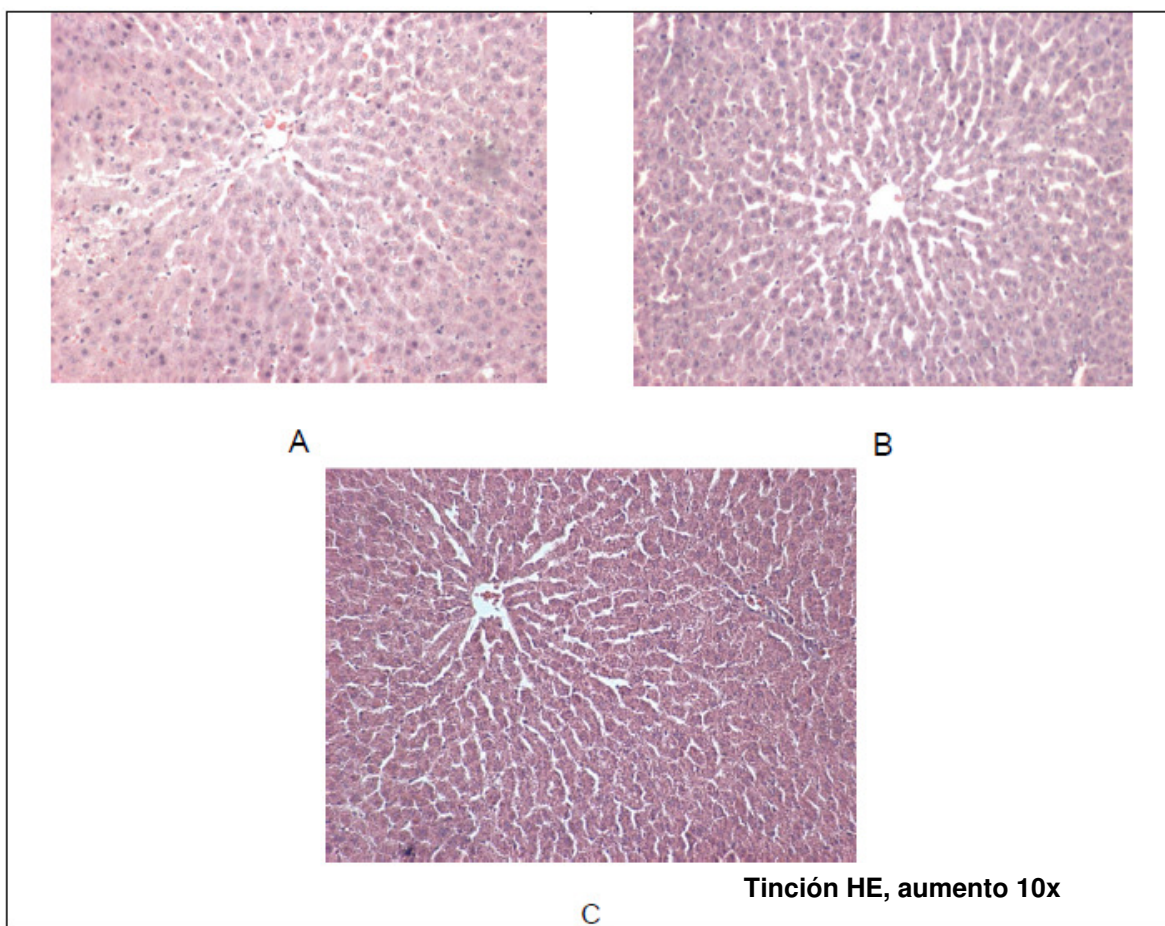


Figura 16. Histologías de hígado de ratas sacrificadas después de 120 minutos de consumir alimento (A) caseína, (B) soya y (C) Sesaprot. Tinción con hematoxilina-eosina

- **Tejido adiposo**

El estudio histológico de este tejido permitió observar si la proteína suministrada afectaba la distribución del tamaño de los adipocitos. En las figuras 17, 18 y 19 se presentan las fotografías de los cortes histológicos de tejido adiposo de ratas sacrificadas en ayuno, 60 minutos y a 120 minutos de haber consumido alimento, respectivamente. En este caso se realizó un análisis de cada fotografía empleando el programa ImageJ que requiere la delineación de las células elegidas para ser medidas. Una vez delineados los contornos de 100

células, el programa permite el cálculo del área de cada célula en micras² para conocer la distribución de los tamaños que presenten dichos adipocitos. En la Tabla 7 se presentan los resultados de las mediciones hechas para 100 células, de acuerdo con una serie de intervalos de aproximadamente 500 micras.

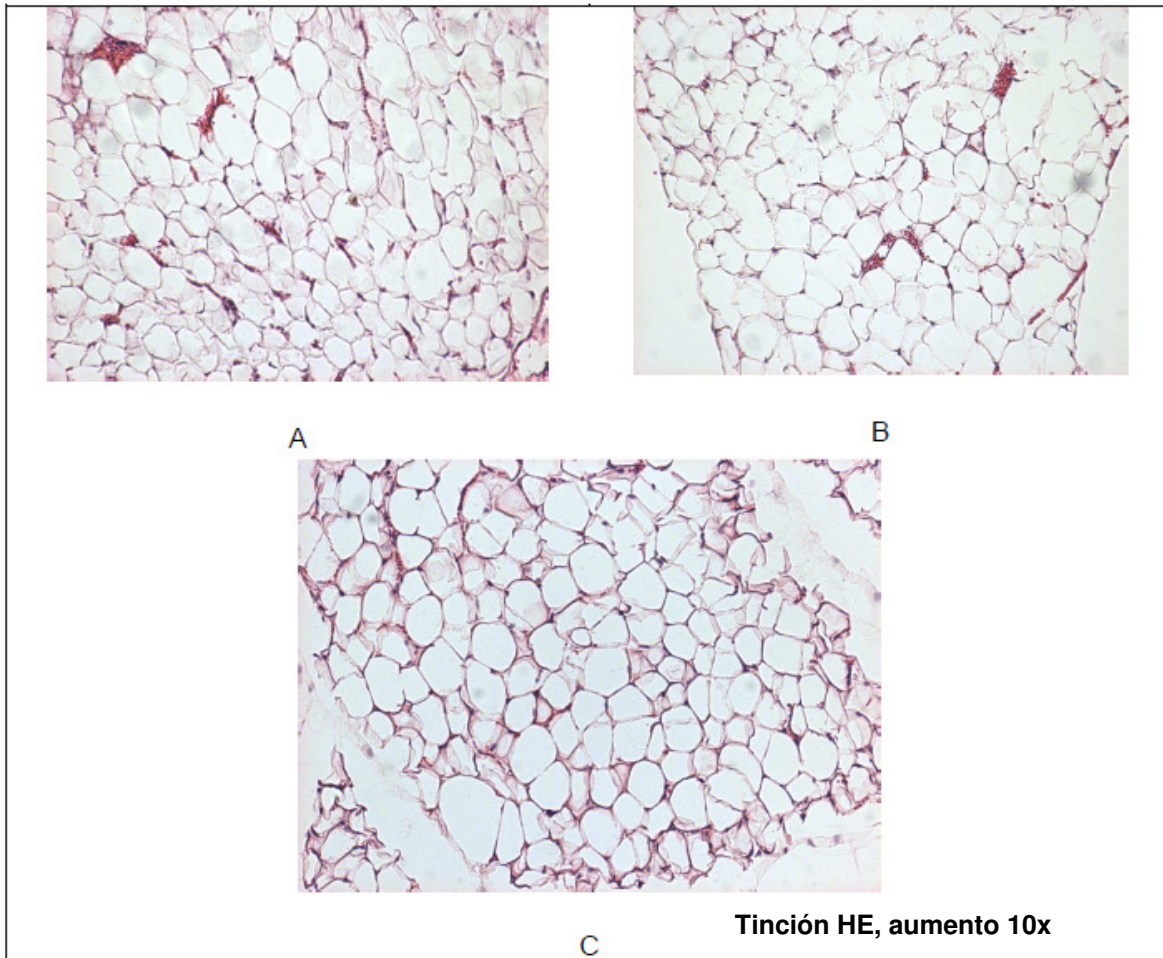


Figura 17. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas en ayuno (A) caseína, (B) soya y (C) Sesaprot. Tinción con hematoxilina-eosina.

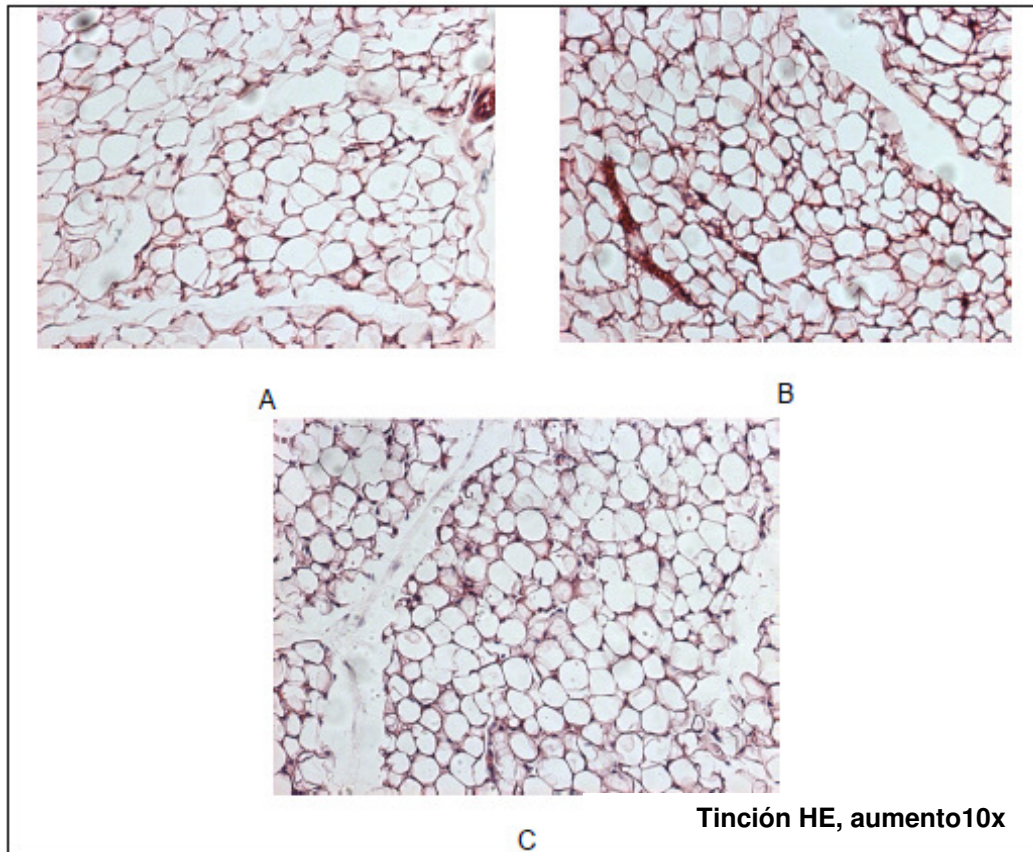


Figura 18. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas después de 60 minutos de haber consumido alimentos (A) caseína, (B) soya y (C) Sesaprot. Tinción con hematoxilina-eosina.

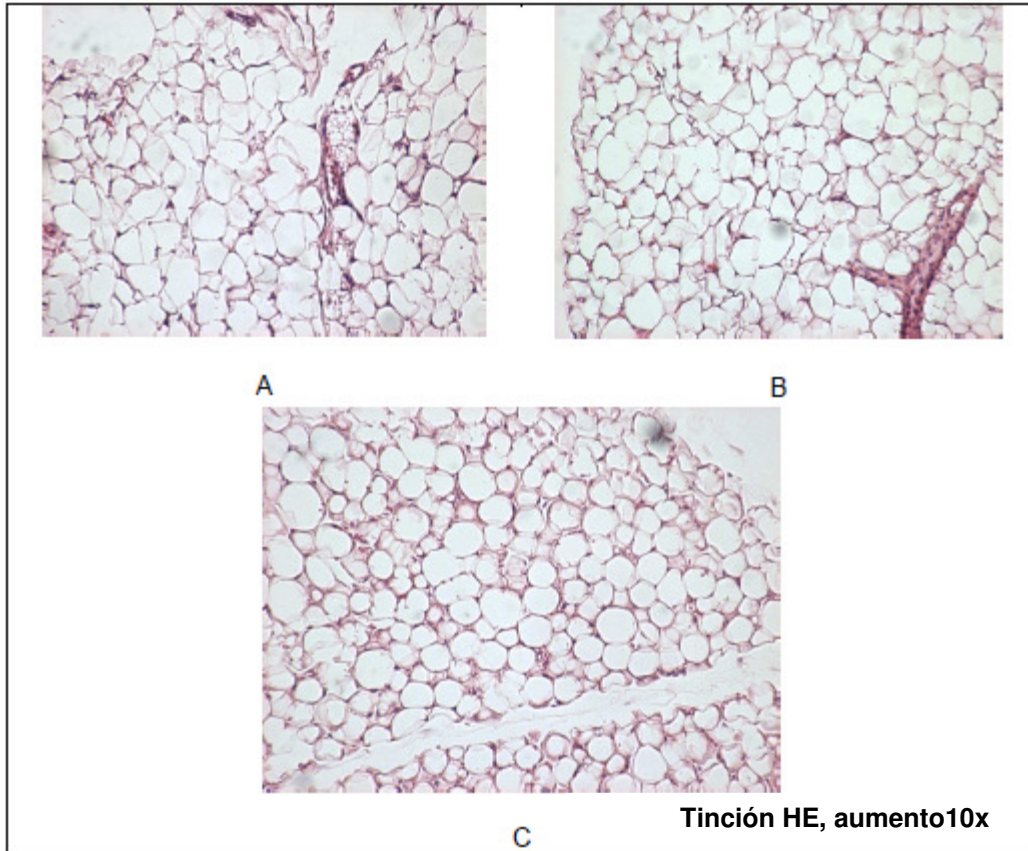


Figura 19. Histologías de tejido adiposo de ratas sacrificadas después de 120 minutos de haber consumido alimentos (A) caseína, (B) soya y (C) Sesaprot. Tinción con hematoxilina-eosina

Tabla 8. Distribución del tamaño de adipocitos de ratas alimentadas con caseína, soya y ajonjolí. La distribución se calculó sobre una base de 100 células para cada caso.

	Tamaño (μm^2)	Caseína			Soya			Ajonjolí		
		T0	T60	T120	T0	T60	T120	T0	T60	T120
1	200-500	5.6±0.64	13.3±1.05	15.2±1.02	10±0.63	21.4±2.52	13.6±2.77	15.8±0.56	23±1.35	13.2±0.53
2	500-1000	25.4±0.82	26.3±0.55	37±0.35	24.6±1.17	40.4±1.17	31.6±7.98	35.4±0.66	42.6±1.01	36.2±0.97
3	1000-1500	23.4±0.57	25.0±0.12	22.6±0.61	27.4±4.08	26±3.30	18.4±3.23	25.8±0.71	20.6±0.85	24±0.57
4	1500-2000	17.6±0.38	18.3±0.88	13.6±0.66	16±1.48	9.8±1.32	9.2±3.60	12.2±0.47	8±1.28	13.8±0.84
5	2000-2500	11.8±0.60	9.7±0.11	5.2±0.47	10.4±1.78	1.4±0.24	6.2±2.42	5.4±0.44	3±1.20	7.6±0.89
6	2500-3000	8±0.86	4.7±0.31	2.6±0.46	4.8±0.97	1±0.32	3.6±1.21	2±0.50	1.6±0.47	2.4±0.56
7	3000-3500	4±0.79	2.0±0.71	1.2±0.53	2.4±0.81	0	3.8±1.85	1.4±0.43	0.8±0.41	1.4±0.63
8	3500-4000	1.6±0.19	0	0.6±0.32	2.4±0.93	0	3.6±2.29	0.4±0.39	0.4±0.39	0.4±0.63
9	4000-4500	1.4±0.34	0.3±0.58	1±0.55	1±0.45	0	3.6±2.29	0.6±0.52	0	0.2±0.45
10	< 4500	1.2±0.53	0.3±0.58	1±0.55	1±0.45	0	6.4±4.12	1±0.77	0	0.8±0.42

Abajo aparecen las graficas de la distribución del tamaño de los adipocitos de las ratas alimentadas con los tres tipos de dieta.

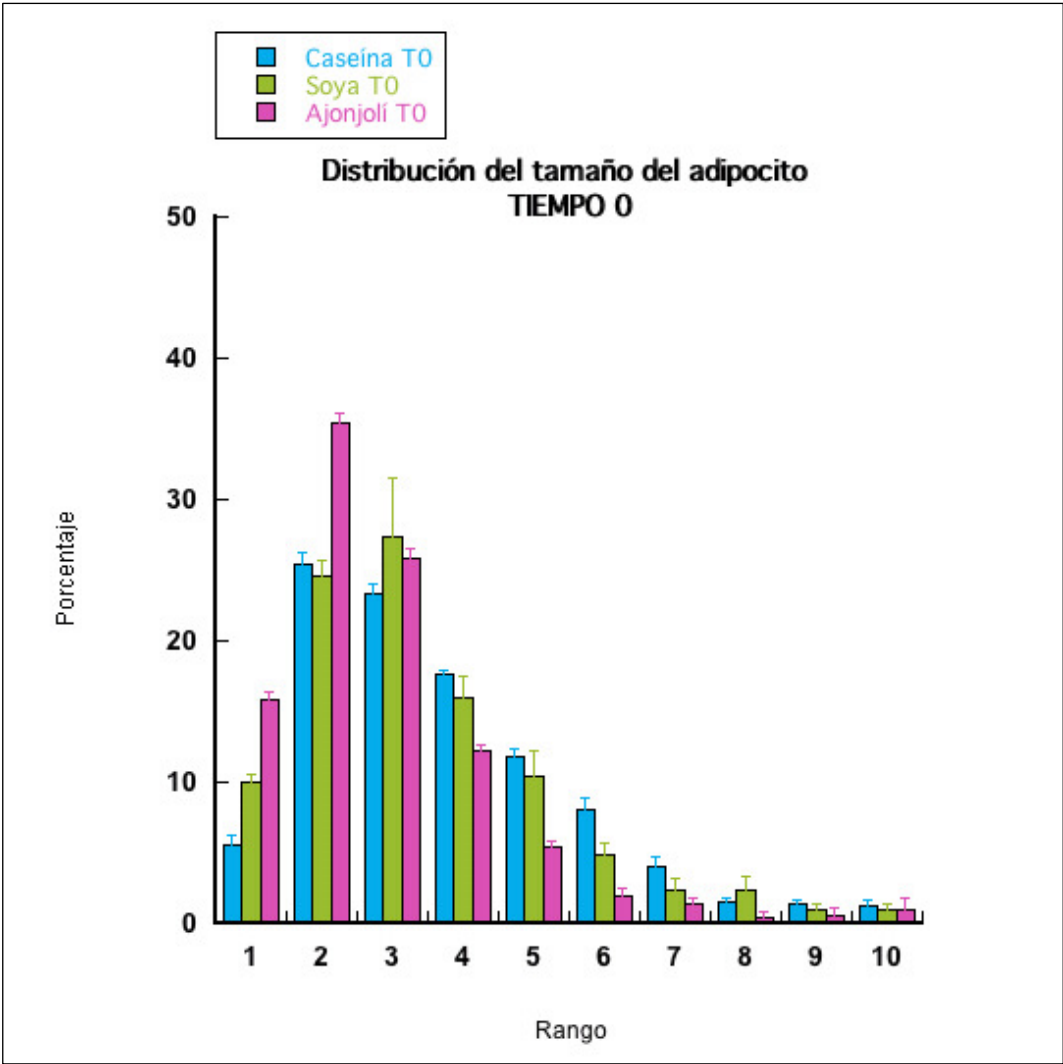


Figura 20. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo cero para caseína, soya y ajonjolí.

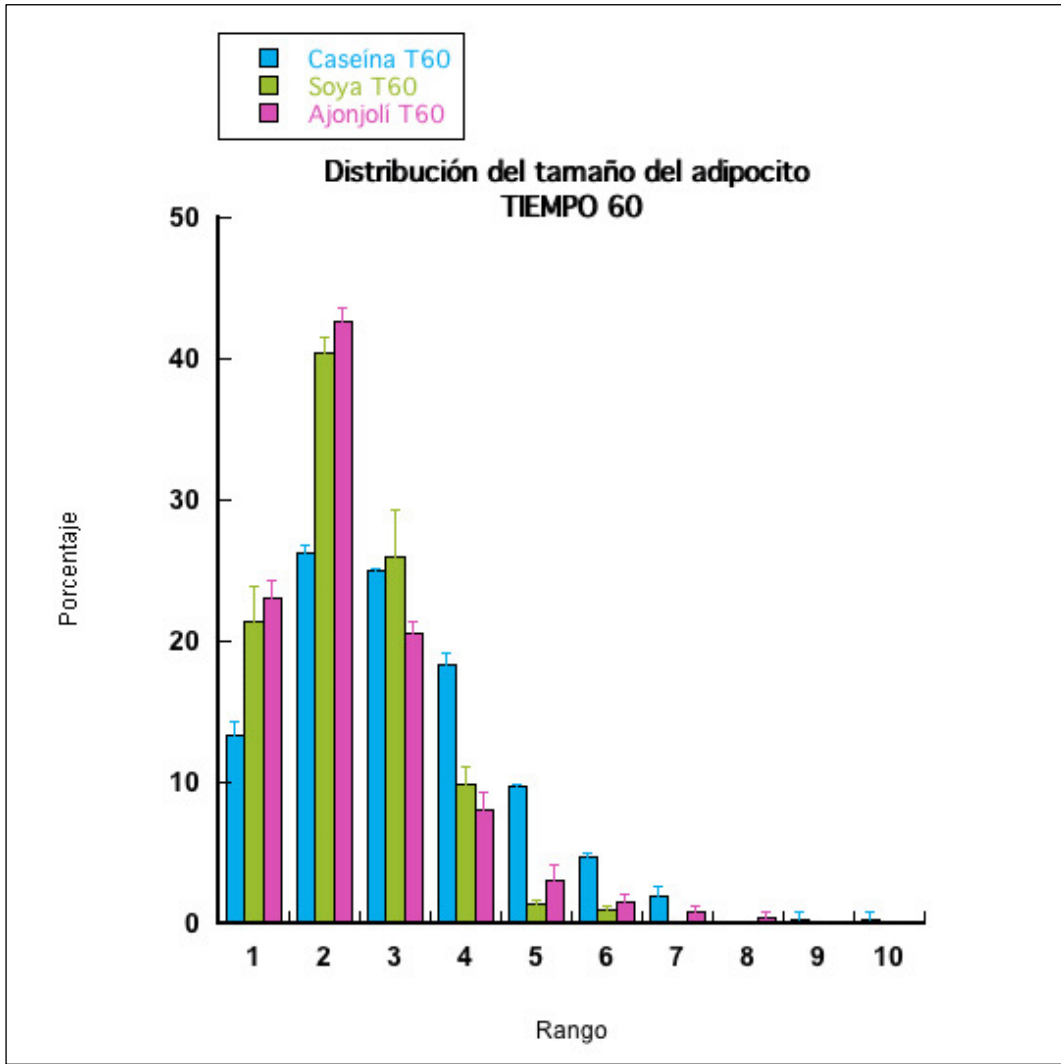


Figura 21. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo 60 para caseína, soya y Ajonjolí.

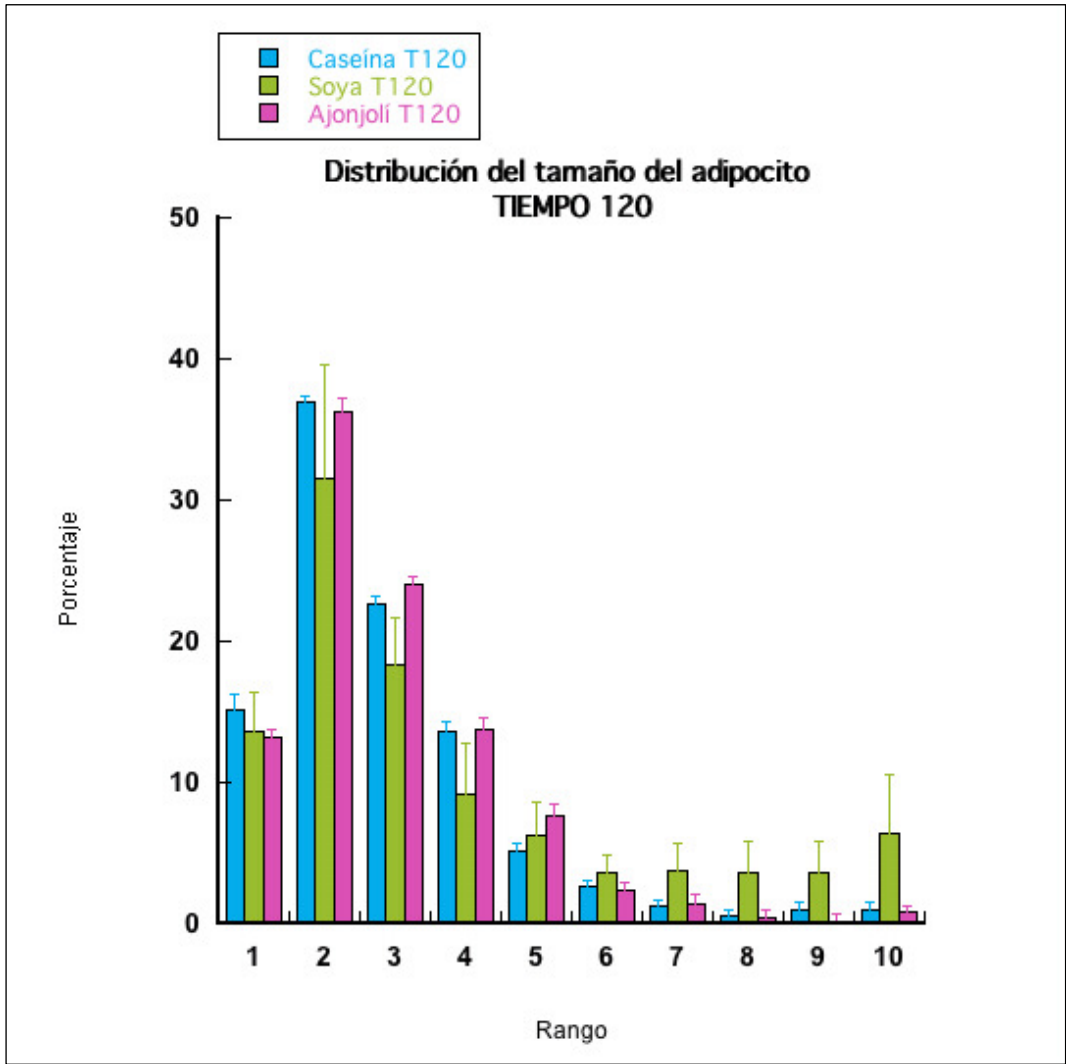


Figura 22. Distribución del tamaño de los adipocitos en el tiempo 120 para caseína, soya y Ajonjolí.

Para los tres tiempos de sacrificio (figuras 20, 21 y 22) se observó que el mayor porcentaje de los adipocitos se encuentra siempre en el intervalo de 500-1000 μm^2 . Para el tiempo cero en este intervalo las ratas alimentadas con ajonjolí presentan el mayor porcentaje de células de tejido adiposo siendo 28% mayor que el de las ratas alimentadas con caseína y 31% mayor que el de las ratas alimentadas con soya. Esto indica que existe una mayor cantidad de células

(hiperplasia) de tejido adiposo pequeño en las ratas alimentadas con ajonjolí en ayuno del día del sacrificio. Se observa el mismo tipo de distribución para los tiempos 60 y 120 posteriores al consumo de alimento para las tres dietas ensayadas. De acuerdo a lo anterior se puede decir que las ratas alimentadas con ajonjolí presentan un mayor porcentaje de tejido adiposo pequeño, factor que se correlaciona con una menor ganancia de peso, es decir, las ratas alimentadas con ajonjolí presentaron un menor crecimiento y por lo tanto su tejido adiposo es más pequeño.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han presentado cambios en los patrones de consumo de alimentos. Estos cambios se caracterizan en un aumento en el consumo de calorías y en una preferencia a consumir alimentos de origen animal como carne, huevos, productos lácteos y también más grasas y aceites (Schmidhuber, 2004), cuyo consumo excesivo puede causar problemas a la salud. En las personas vegetarianas, se observa un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y una disminución de la tasa de mortalidad. En las dietas vegetarianas se consume principalmente grandes cantidades de cereales, nueces, frutas y vegetales (Key et al, 2006). La proteína dietaria proporciona aminoácidos esenciales, de los cuales ocho son necesarios para el sostenimiento humano: metionina, triptófano, fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina, valina y treonina, y dos más pueden ser necesarios para el crecimiento: la arginina y la histidina. En general, las proteínas de los alimentos de origen animal contienen estos diez aminoácidos, por lo tanto al consumir este tipo de proteína usualmente se cumple con el requerimiento necesario. Al contrario las proteínas vegetales difieren ampliamente en la composición de aminoácidos. Algunas carecen completamente de uno o más aminoácidos esenciales (Scrimshaw y Young, 1993), lo que puede comprometer el crecimiento y desarrollo. Dentro de las proteínas vegetales, se encuentran las provenientes de las leguminosas. Una de las ventajas del consumo de leguminosas en enfermedades como la diabetes es la disminución de proteinuria e hiperfiltración. Las leguminosas son ampliamente recomendadas para personas con diabetes tipo 2 porque además de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y renales, son alimentos con un bajo índice glucémico lo que puede traer efectos benéficos en el metabolismo de lípidos y en la regulación de las concentraciones de glucosa sanguínea (Barnard et al, 2009). La mayoría de los estudios que han demostrado efectos benéficos del consumo de leguminosas, se han realizado utilizando proteína de soya. Sin embargo existen pocos estudios relativos al efecto

de otras proteínas de origen vegetal, como las provenientes de las oleaginosas. Las oleaginosas son semillas con alto contenido de grasas, lo cual las hace útiles para la extracción de aceites comestibles y como subproducto de esta industria se pueden obtener los aislados de proteínas; entre ellas están el cacahuate, la semilla de girasol y el ajonjolí.

El ajonjolí contiene 25% de proteína y 50% de grasa (Sen, 2009). Se cultiva en México principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Financiera Rural, 2010). Los estudios relacionados al efecto del ajonjolí se han hecho con la semilla entera, ya que este tiene un alto contenido de lignanas como el sesamin. Se ha observado que las lignanas suministradas en la dieta de ratas disminuyen colesterol en plasma y en el hígado, adicionalmente incrementan la excreción de esteroides neutros (Sugano et al, 1990). El efecto del sesamin en el metabolismo se ha evaluado en ratas (Hirose et al, 1991). En este estudio se añade 0.5% de sesamin a la dieta de ratas, después de un período de 4 semanas se observa que la concentración de colesterol en suero e hígado disminuye significativamente, independientemente de la presencia de colesterol en la dieta. La actividad de la HMG – CoA reductasa disminuye por el consumo de sesamin. En este trabajo se evaluó el efecto del aislado de la proteína de ajonjolí (84.54% de proteína), comparándolo con una leguminosa que es la soya y una proteína patrón que es la caseína. Los resultados del análisis de aminoácidos indican que la proteína de ajonjolí tiene un perfil que no cumple con el requerimiento de aminoácidos de acuerdo a la FAO , siendo deficiente en histidina, treonina, valina, isoleucina y lisina, lo que indica que las ratas alimentadas con esta proteína no van a tener un buen crecimiento y como se puede observar en la figura 5a efectivamente las ratas alimentadas con ajonjolí presentan un menor crecimiento en comparación con las ratas alimentadas con las dietas de soya y caseína, de igual manera la deficiencia de aminoácidos en la dieta de ajonjolí ocasiona que el consumo de alimento sea significativamente menor (12.42 g/día) en comparación a las ratas alimentadas con caseína (15.70 g/día) y soya (15.09 g/día). En la figura

5b se presenta la sección de la gráfica en la cual las ratas ya se adaptaron a la alimentación por horario y se observa que al día 11 las ratas alimentadas con ajonjolí presentan un buen crecimiento, esto se debe a que a este día las ratas ya han consumido el alimento necesario para cubrir sus requerimientos nutricionales y, por lo tanto, así se compensa la deficiencia de aminoácidos antes mencionada. Se he sugerido, aunque no comprobado, que el consumo de proteínas de origen vegetal inducen una mayor secreción de glucagon a diferencia de las proteínas de origen animal. Sin embargo, como se puede observar en la figura 9, las ratas alimentadas con caseína presentan la mayor concentración de glucagon a los 60 y 90 minutos después de haber consumido alimento, mientras que las ratas alimentadas con ajonjolí disminuyen la concentración de glucagon después del minuto 30 del consumo de alimento y mantiene esa tendencia hasta los 90 minutos, que es cuando eleva ligeramente la concentración. Nunca alcanza la concentración de las ratas alimentadas con caseína. Por otra parte, se ha propuesto que el consumo de proteínas de origen animal promueve mayor secreción de insulina, al contrario que las proteínas de origen vegetal. Esta hipótesis es válida para el grupo alimentado con la proteína de soya, que como se puede observar en la figura 7, son los que presentan la menor concentración de insulina durante el tiempo. Sin embargo, es importante resaltar que el grupo alimentado con ajonjolí no presenta este comportamiento: al contrario, alcanza su pico máximo de concentración a los 120 minutos después de haber consumido alimento, mientras que las ratas alimentadas con caseína presentan su pico máximo de insulina en suero a los 60 minutos de haber consumido alimento y posteriormente disminuye. De acuerdo a lo anterior se puede decir, que la concentración de glucagon e insulina en suero postprandio, no depende del origen proteico sino de otros factores como puede ser el perfil de aminoácidos. Otro parámetro bioquímico relacionado con la concentración de insulina en suero es la concentración de glucosa. El aumento de glucosa en sangre provoca la secreción de insulina y una disminución en la secreción de glucagon. En la figura 8 se observa que la concentración de glucosa en suero para ratas alimentadas con ajonjolí es elevada en comparación a la de ratas alimentadas con caseína y soya,

por lo tanto se esperaría que la concentración de insulina también fuera elevada y que la de glucagon se viera disminuida, situación que efectivamente sucede con las ratas alimentadas con ajonjolí, por lo cual no se puede asegurar que la proteína de ajonjolí no es eficiente para controlar los niveles de glucosa en sangre ya que tiende a elevarlos. Tomando en cuenta los parámetros hormonales de insulina y glucagon, se puede calcular la relación insulina/glucagon, dicha relación tiene injerencia sobre la expresión de genes lipogénicos. En la figura 10 se observa claramente que las ratas alimentadas con ajonjolí presentan una relación significativamente mayor a los 30 minutos después de haber consumido alimento y mantiene esa tendencia a los 60, 90 y 120 minutos, mientras que las ratas alimentadas con soya presentan la menor relación. Por esta razón la expresión del factor de transcripción SREBP-1c (figura 14a) y de su gen blanco FAS (figura 14b) esta elevada en los mismos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos) para las ratas alimentadas con ajonjolí, las ratas alimentadas con soya presentan la menor expresión de estos genes. Existe relación en la expresión de SREBP-1c y FAS con la concentración de triglicéridos en suero, en la figura 11 se observa que las ratas alimentadas con ajonjolí presentan un incremento en la concentración de triglicéridos a partir de los minutos 60, 90 y 120 después del consumo de la dieta. Por lo anterior los resultados de este estudio indican que cambios en las concentraciones de glucagon e insulina, por la proteína ingerida, afectan la expresión de genes lipogénicos y por lo tanto hay un incremento en la síntesis de triglicéridos; posiblemente si este experimento se hubiera prolongado por más tiempo y por la tendencia que presentan las ratas alimentadas con ajonjolí, estas probablemente hubieran presentado las complicaciones relacionadas con la acumulación de triglicéridos en hígado. La concentración de colesterol en suero no se puede relacionar con lo antes mencionado ya que la síntesis de este es regulada por otra ruta. Como se puede observar en la figura 11, el consumo de los diferentes tipos de proteínas produjo concentraciones muy similares de colesterol en suero y los valores se encontraban dentro de los valores normales, ya que en este proyecto se trabajó con animales sanos.

Se determinó la concentración de homocisteína en suero, porque esta es un indicativo de riesgo cardiovascular. La homocisteína se obtiene a partir del metabolismo de la metionina (ver fig 3). Como se observa en la figura 13 las ratas alimentadas con caseína presentan a los tiempos 90 y 120 una concentración de homocisteína en suero mayor a $15 \mu\text{mol/L}$, con esta concentración se considera que ya hay hiperhomocisteinemia, la cual se relaciona con la prevalencia de aterosclerosis. Mientras que las ratas alimentadas con soya y ajonjolí presentan una concentración baja de homocisteína en suero. Lo que indica que las proteínas de origen vegetal al tener un menor contenido de aminoácidos azufrados presentan menor riesgo aterogénico en comparación a las proteínas de origen animal.

En lo referente a los estudios histomorfológicos se observa que el tejido hepático no presenta depósitos de adipocitos en ninguno de los tres grupos experimentales, sin embargo al ser este un estudio de corto tiempo estos resultados no nos pueden indicar que la proteína de ajonjolí sea una proteína de buena calidad ya que de acuerdo a la concentración de triglicéridos en suero, se podría hipotetizar que si este experimento se hubiera prolongado por más tiempo posiblemente el hígado de estas ratas presentaría el desarrollo de hígado graso.

El análisis del tejido adiposo abdominal en ayuno indica que el grupo alimentado con ajonjolí presenta el mayor porcentaje de adipocitos pequeños ($500-1000 \mu\text{m}^2$) al tiempo cero (35.4 ± 0.66), seguidas por las ratas alimentadas con caseína (25.4 ± 0.82) y finalmente por el grupo de soya (24.5 ± 1.16). A los 60 minutos de haber consumido alimento el grupo alimentado con ajonjolí presenta el mayor porcentaje de tejido adiposo pequeño, seguido por el grupo de soya y posteriormente por el de caseína. Y de manera interesante a los 120 minutos se observa que los tres grupos presentan un porcentaje similar de adipocitos pequeños, lo que indica que los adipocitos se encuentran principalmente en

estado funcional. Estudios previos realizados en el Departamento de Fisiología de la Nutrición han demostrado que los adipocitos son más disfuncionales al tener mayor tamaño.

CONCLUSIONES

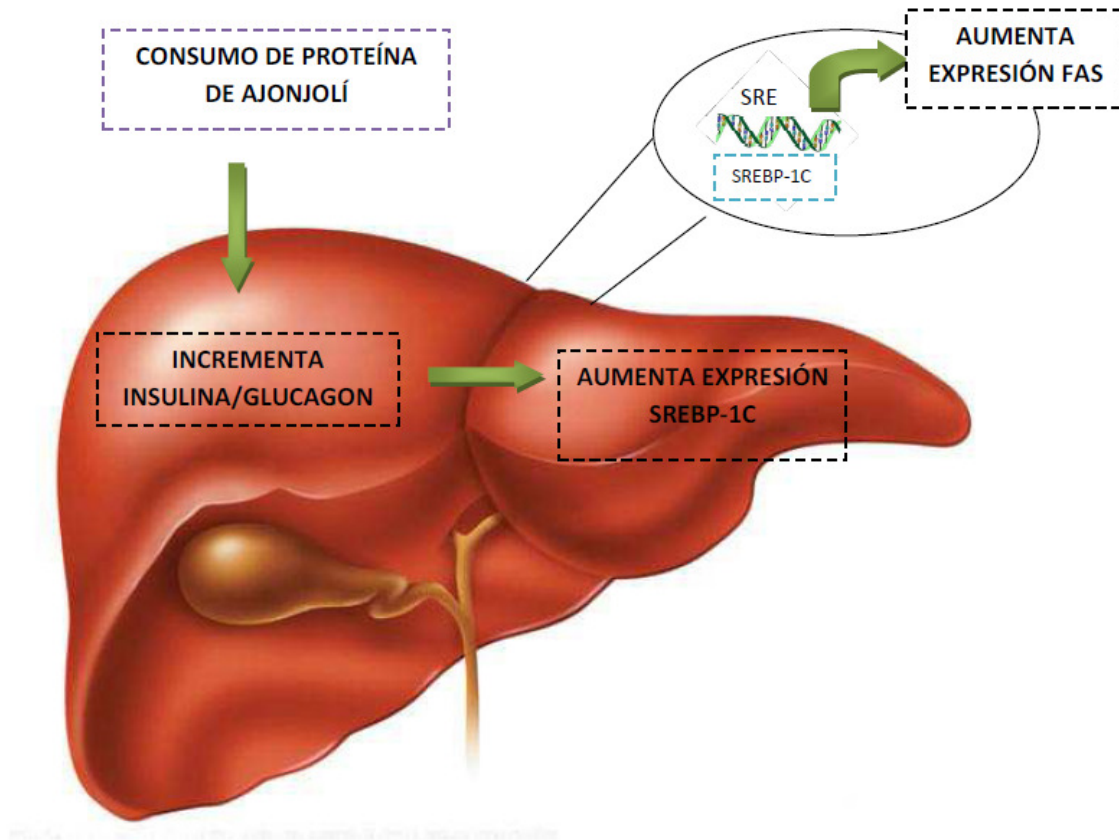


Figura 23. Efecto del consumo de proteína de ajonjolí en el hígado.

El consumo de la proteína de ajonjolí como única fuente de proteína:

- Compromete el crecimiento de animales de laboratorio debido a una baja calificación química de la proteína.
- Mantiene dentro de los intervalos normales los diferentes parámetros bioquímicos, excepto la de triglicéridos ya que la proteína de ajonjolí eleva la concentración de triglicéridos en comparación con las ratas alimentadas con caseína y soya.

- El consumo de proteína de ajonjolí incrementa la expresión de SREBP-1c y de su gen blanco FAS, lo que sugiere un aumento de la lipogénesis hepática (ver figura 23).
- Genera una hiperplasia del tejido adiposo entre 500 y 1000 micras² (hiperplasia).
- Posiblemente, si el consumo de ajonjolí se extendiera a un periodo de tiempo mayor de 21 días, podría presentarse obesidad en los animales y el desarrollo de hígado graso. Sin embargo se requiere mayor información.
- A pesar de la baja calidad de esta proteína, la combinación de esta con otra proteína de origen vegetal podría generar efectos benéficos, lo que permitiría su uso en la industria de alimentos

BIBLIOGRAFÍA

1. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez F, Hernández-Pando R, Tovar A. 2004. *Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP – 1 mRNA and reduces fatty liver in rats.* J Nutr **134**, 522–529.
2. Ball RO, Urschel KL, Penchartz PB. 2007. *Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism.* J Nutr **137**, 1626S-1641S.
3. Barnad ND, Katcher HI, Jenkins DJ, Cohen J, Turner-McGrievy G. 2009. *Vegetarian and vegan diets in type 2 diabetes management.* Nutr Rev **67**, 255-263.
4. Benyon R. 2003. *Lo esencial en metabolismo y nutrición.* Elsevier. Segunda edición.
5. Berdanier C, Moustaid N. 2004. *Genomics and proteomics in nutrition.* Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 121–122.
6. Blachier F, Lancha Jr AH, Boutry C, Tomé D. *Alimentary proteins, amino acids and cholesterolemia.* Amino acids **38**, 15 -22.
7. Canfield LM, Chytil F. 1978. *Effect of low lysine diet on rat protein metabolism.* J Nutr **108**, 1343-1347.
8. Chen PR, Cien KL, Su TC, Chang CJ, Lui TL, Cheng H, Tsai C. 2005. *Dietary sesame reduces cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia.* Nutr Res **25**, 559–567.
9. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
10. Eberlé D, Hagarthy B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. 2004. *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis.* Biochimie **86**, 839-848.

11. Felder TK, Klein K, Patsch W, Oberkofler H. 2005. *A novel SREBP-1 splice variant: Tissue abundance and transactivation potency.* Biochim Biophys Acta **1731**, 41-47.
12. Feramisco JD, Goldstein JL, Brown MS. 2003. *Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis.* J Biol Chem **279**, 8487–8496.
13. Financiera Rural. Mayo 2010. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial, Monografía del ajonjolí.
14. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW, Thacker SB. 2002. *Homocyst (e) ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies.* International Journal of epidemiology **31**, 59-70.
15. Foufelle F, Ferré P. 2002. *New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c.* Biochem J **366**, 377-391.
16. Hirose N, Inoue T, Nishihara K, Sugano M, Akimoto K, Shimizu S, Yamada, H. 1991. *Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin.* J Lipid Res **32**, 629-638.
17. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. 2002. *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.* J Clin Invest **109**, 1125–1131.
18. Jahan-mihan A, Smith CE, Anderson GH. 2011. *Soy protein – and casein – based weaning diets differ in effects on food intake and blood glucose regulation in male wistar rats.* Nut Res **31**, 237-245.
19. Karp A, Richter GM. 2011. *Meeting the challenge of food and energy security.* J Exp Bot **1**, 1-9.
20. Key TJ, Appleby PN, Rosell MS. 2006 *Health effects of vegetarian and vegan diets.* EPIC **65**, 35-41.
21. Kritchevsky D. 1976. *Diet and atherosclerosis.* Am J Pathol **84**, 615-632.

22. Kushiro M, Masaoka T, Hageshita S, Takahashi Y, Ide T, Sugano M. 2002. *Comparative effect of sesamin and episesamin on the activity and gene expression of enzymes in fatty acid oxidation and synthesis in rat liver.* J Nutr Biochem **13**, 289-295.
23. Liu H, Liu J, Wu X, Zhang J. 2010. *Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker.* Int J Biochem Mol Biol **1**, 69-89.
24. López G, Flores I, Gálvez A, Quirasco M, Farrés A. 2003. *Development of a liquid nutritional supplement using a Sesamum indicum L. protein isolate.* Lebensm-Wiss U Technol **36**, 67–74.
25. Meza C. 2002. Caracterización de la harina de ajonjolí para el desarrollo de productos alimenticios destinados al consumo humano. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. Facultad de Química UNAM.
26. Michelfelder AJ. 2009. *Soy: A complete source of protein.* Am Fam Physician **79**, 43-47.
27. Nelson D, Cox M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry.* Worth Publishers Inc New York.
28. Nicklas TA, Baranowski T, Cullen KW, Berenson G. 2001. *Eating patterns, dietary quality and obesity.* J Am Coll Nutr **20**, 599 – 608.
29. Noriega-López L, Tovar A, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillán-Doherty P, Torres N. 2007. *Pancreatic Insulin Secretion in Rats Fed a Soy Protein High Fat Diet Depends on the Interaction between the Amino Acid Pattern and Isoflavones.* J. Biol Chem **282**, 20657-20666.
30. Reeves P, Nielsen F, Fahey G. 1993. *AIN – 93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN – 76A Rodent Diet.* J Nutr **123**, 1939 – 1951.
31. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. 1999 *Lipids, lipoproteins and apolipoproteins.* In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of

- Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company. p. 809-61.
32. Saltiel AR, Kahn R. 2001. *Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature **414**, 779 – 806.
 33. Sánchez A, Hubbard RW.1991. *Plasma amino acids and the glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis*. Med Hypotheses. **36**, 27 – 32.
 34. Sánchez M, Jiménez S, Morgado J. 2009. *La homocisteína: un aminoácido neurotóxico*. REB **28**, 3-8.
 35. Sato T, Aye M, Katsuta M. 2004. *Nondestructive near-infrared reflectance spectroscopic analyses of the major constituents of sesame whole seeds with different coat color*. Plant Prod Sci **7**, 363-366.
 36. Schmidhuber J. 2004. *The growing global obesity problem: some policy options to address it*. eJADE **1**, 272 – 290.
 37. [Scrimshaw NS](#), [Young VR](#). 1993. *Amino acid fortification of protein foods*. [J Am Coll Nutr](#). **12**,481-483.
 38. Sen M, Bhattacharyya DK. 2001. *Nutritional quality of sesame seed protein fraction extracted with isopropanol*. J Agric Food Chem **49**, 2641-2648.
 39. Stoeckman AK, Towle HC. 2002. *The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression*. J Biol Chem **277**, 27029–27035.
 40. Sugano M, Inoue T, Koba K, Yoshida K, Hirose N, Shinmen Y, Akimoto K, Amachi T. 1990. *Influence of sesame lignans on various lipid parameters in rats*. Agric Biol Chem **54**, 2669-2673.
 41. The_Solae_Company. Cited; Available from <http://solae.com>.
 42. Thorell, J.I. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 31:187, 1973.
 43. Torre Villalvazo I. 2008. Efecto de la proteína de soya dietaria sobre las alteraciones metabólicas del hígado y tejido adiposo en ratas alimentadas con dieta alta en grasa. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Facultad de Medicina UNAM.

44. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar A. 2006. *Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders*. J Nutr Biochem **17**, 365-373.
45. Torres N, Tovar A. 2007. *The role of dietary protein on lipotoxicity*. Nutr Rev **65**, S64–S68.
46. Torre-Villalvazo I, Tovar A, Ramos-Barragán V, Cerbón-Cervantes M, Torres N. 2008 *Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet*. J Nutr **138**, 462- 468.
47. Vega-López S, Matthan N, Ausman L, Hardin S, Rideout T, Ai M, Otokozawa S, Freed A, Kuvin J, Jones P, Schaefer E, Lichtenstein A. 2010. *Altering dietary lysine: arginine ratio has little effect on cardiovascular risk factors and vascular reactivity in moderately hypercholesterolemic adults*. Atherosclerosis **210**, 555-562.
48. Velasquez MT, Bhathera SJ. 2007. *Role of dietary soy protein in obesity*. Int. J, Med. Sci **4**, 72-82.
49. Vernia Miralles S. 2007. Tesis Doctoral. Estudio del factor de transcripción srebp1 en estados de resistencia a insulina. Universitat de Valencia, Servei de Publicacions, España, Valencia. pp. 45–47.
50. Visavadiya NP, Narasimhacharya AV. 2008. *Sesame as a hypocholesteremic and antioxidant dietary component*. Food Chem Toxicol **46**, 1889-1895.
51. Voet D. Voet DJ, Pratt W. 1992. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley and Sons. New York.
52. Wang Y, Hones P, Ausman LM, Lichstesntein A. 2003. *Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects*. Atherosclerosis **173**, 269-275.
53. Welsch U, Storch V. 1976. *Comparative animal cytology & histology*. University of Washington.
54. Young RV, Pellet PL. 1994. *Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition*. Am J Clin Nutr **59**, 1230S-1212S.

55. Zhang EJ, Ng KM, Luo KQ. 2007. *Extraction and purification of isoflavones from soybeans from soybeans and characterization of their estrogenic activities*. J Agric Food Chem **55**, 6940-6050.

ANEXO I

MEDICIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO

Medición de insulina en suero por RIA Kit (Cat. # HI-14HK) MILLIPORE

La medición de insulina en suero tiene una duración de dos días. A continuación se presenta el procedimiento que se debe seguir para realizar la medición.

Assay Procedure Flow Chart

Day One					Day Two			
Set-up	Step 1	Steps 2 & 3	Step 4	Step 5	Step 6	Step 7	Step 8	Steps 9-11
Tube Number	Add Assay Buffer	Add Standard/ QC Sample	Add I-125 Human Insulin Tracer	Add Human Insulin Antibody	Vortex, Cover, and Incubate 20-24 hrs at RT	Add Precipitating Reagent	Vortex, and Incubate 20 min. at 4°C	Centrifuge at 4°C for 20 min., Decant, and Count
1,2	-	-	100 µl	-		-		
3,4	300 µl	-	100 µl	-		1.0 mL		
5,6	200 µl	-	100 µl	100 µl		1.0 mL		
7,8	100 µl	100 µl of 2 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
9,10	100 µl	100 µl of 5 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
11,12	100 µl	100 µl of 10 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
13,14	100 µl	100 µl of 20 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
15,16	100 µl	100 µl of 50 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
17,18	100 µl	100 µl of 100 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
19,20	100 µl	100 µl of 200 µU/mL	100 µl	100 µl		1.0 mL		
21,22	100 µl	100 µl of QC 1	100 µl	100 µl		1.0 mL		
23-24	100 µl	100 µl of QC 2	100 µl	100 µl		1.0 mL		
25,26	100 µl	100 µl of unknown	100 µl	100 µl	1.0 mL			
27-n	100 µl	100 µl of unknown	100 µl	100 µl	1.0 mL			

Figura 24. Diagrama de proceso para la determinación de insulina en suero.

Día 1

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Pipetear 300 μL de buffer de ensayo a los tubos de unión no específica (3 - 4) y 200 a los tubos de referencia (5 - 6) y 100 μL a los tubos 7 - al final del ensayo.
3. Añadir 100 μL del estándar y control de calidad a los tubos 7-20 (van por duplicado).
4. Añadir 100 μL de la muestra de suero a los tubos restantes por duplicado.
5. Añadir 100 μL de I-insulina a todos los tubos.
6. Añadir 100 μL de anticuerpo de insulina de rata a todos los tubos excepto del 1-4.
7. Dar vortex, cubrir e incubar de 20-24 hrs a 4°C.

Día 2

1. Añadir 1 mL de reactivo precipitante a 4°C a todos los tubos excepto 1-2.
2. Dar vortex e incubar 20 min a 4°C.
3. Centrifugar excepto tubos 1-2.
 - 4°C, 20 min, 2000-3000 xg.
4. Tomar el sobrenadante y drenar los tubos al menos de 15-60 seg 1 sola vez.
5. Contar por 1 minuto en un contador de gamma y calcular los ng/mL.

CÁLCULOS

1. Obtener el promedio de cada duplicado.
2. Restar el promedio de los tubos 3- 4 de cada uno de los demás promedios.
3. Calcular el % del marcador ligado (entre 35 y 50%).
 - porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2.
4. Calcular el % de adherencia de cada muestra (B) y el estándar (Bo).
 - $\%B/Bo = (\text{Muestra o estándar/tubos 5-6}) \times 100$
5. Graficar el %B/Bo de cada muestra en el eje de las "y" así como la concentración conocida en el de las "x".
6. Construir la curva de referencia.
7. Calcular los $\mu\text{g/mL}$ de cada muestra interpolando en la curva de referencia.
8. Los duplicados no deben exceder 10% CV entre ellos

Valores normales de insulina en ayuno: 0.5 – 2.0 ng/mL.

Medición de glucagon en suero por RIA kit (Cat. # GL-32K) MILLIPORE

La medición de glucagon en suero tiene una duración de tres días, a continuación se presenta el procedimiento para realizar la medición.

Assay Procedure Flow Chart

Day One					Day Two		Day Three	
Set-up	Step 1	Step 2&3	Step 4	Step 5	Step 6	Step 7	Step 8	Steps 9-11
Tube Number	Add Assay Buffer	Add Standard/QC Sample	Add Glucagon Antibody	Vortex, Cover, and Incubate 20-24 hrs at 4°C	Add 1:125 Glucagon Tracer	Vortex, Cover and Incubate 22-24 hrs at 4°C	Add Precipitating Reagent	Incubate 20 min. at 4°C, Centrifuge at 4°C for 20 min Decant and Count
1,2	-	-	-		100 µl		-	
3,4	300 µl	-	-		100 µl		1.0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl		100 µl		1.0 ml	
7,8	100 µl	100 µl of 20 pg/ml	100 µl		100 µl		1.0 ml	
9,10	100 µl	100 µl of 50 pg/ml	100 µl		100 µl		1.0 ml	
11,12	100 µl	100 µl of 100 pg/ml	100 µl		100 µl		1.0 ml	
13,14	100 µl	100 µl of 200 pg/ml	100 µl		100 µl		1.0 ml	
15,16	100 µl	100 µl of 400 pg/ml	100 µl		100 µl		1.0 ml	
17,18	100 µl	100 µl of QC 1	100 µl		100 µl		1.0 ml	
19,20	100 µl	100 µl of QC 2	100 µl		100 µl		1.0 ml	
21,22	100 µl	100 µl of unknown	100 µl		100 µl		1.0 ml	

Figura 25. Diagrama de proceso para la determinación de glucagon en suero.

Día 1

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Pipetear 300 µL del buffer de ensayo a los tubos 3 y 4, 200 µL a los tubos 5 y 6 y 100 µL del tubo 7 en adelante.
3. Pipetear 100 µL del estándar y controles de calidad por duplicado.
4. Pipetear 100 µL de cada muestra por duplicado.
5. Agregar 100 µL del anticuerpo de glucagon a todos los tubos excepto al 1, 2, 3 y 4.
6. Agitar en vortex, cubrir e incubar de 20-24 hrs a 4°C.

Día 2

1. Hidratar el marcador 125I-Glucagon con 27 mL del Label Hydrating Buffer, mezclar suavemente y agregar 100 µL a cada tubo.
2. Agitar en vortex, cubrir e incubar de 22-24 hrs a 4°C

Día 3

1. Agregar 1 mL de agente precipitante frío (4°C) a todos los tubos excepto al 1 y 2.
2. Agitar en vortex e incubar 20 min a 4°C.
3. Centrifugar 20 min a 4°C de 2,000-3,000 xg.
4. Drenar el sobrenadantes de todos los tubos excepto los tubos 1 y 2 y analizar con un contador gamma de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

CÁLCULOS

1. Obtener el promedio de cada duplicado.
2. Restar el promedio de los tubos 3- 4 de cada uno de los demás promedios
3. Calcular el % del marcador ligado (entre 35 y 50%)
 - porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2
4. Calcular el % de adherencia de cada muestra (B) y del estándar (Bo)
 - $\%B/Bo = (\text{Muestra o estándar}/\text{tubos 5-6}) \times 100$
5. Graficar él %B/Bo de cada estándar en el eje de las y y la concentración conocida en el de las x
6. Construir la curva de referencia
7. Calcular los µg/ml de cada muestra interpolando en la curva de referencia

Concentración normal de glucagon en ayuno: 50-150 pg/ml

Medición de glucosa en suero mediante YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Mezclar en vortex.
3. Acercar la muestra a la aguja del aparato YISA hasta que llegue a la mitad del tubo para que succione la muestra.
4. Calibrar el aparato cada 6 tomas con un estándar de glucosa.

Concentración normal de glucosa en ayuno: 80 – 150 mg/dL

Medición de triglicéridos en suero con el kit Triglicéridos FS de Diagnostic System International

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Pipetear en tubos eppendorf de 1.5 mL lo siguiente:

Tabla 9. Esquema de pipeteo para medición de triglicéridos

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/Estándar	-	10 µL
Agua destilada	10 µL	-
Reactivo	1000 µL	1000 µL

3. Incubar 10 min a 37°C.
4. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm contra el blanco, dentro de los 60 min posteriores a la mezcla de los reactivos.
5. Calcular la concentración de cada muestra con base en la absorbancia y concentración del estándar de triglicéridos.

CÁLCULOS

$$\text{Triglicéridos [mg / dL]} = \frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Estd}}} * \text{Conc. Estd [mg / dL]}$$

Concentración Estándar = 200mg / dL

Concentración normal en ayuno de triglicéridos < 150mg/dL.

Medición de colesterol en suero con el kit Colesterol FS de Diagnostic System International

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Pipetear en tubos eppendorf de 1.5 mL lo siguiente:

Tabla 10. Esquema de pipeteo para medición de colesterol.

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/Estándar	-	10 µL
Agua destilada	10 µL	-
Reactivo	1000 µL	1000 µL

3. Incubar 10 min a 37°C.
4. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm dentro de 60 min contra el blanco.
5. Calcular la concentración de cada muestra con base en la absorbancia y concentración del estándar de colesterol.

CÁLCULOS

$$\text{Colesterol}[\text{mg} / \text{dL}] = \frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Estd}}} * \text{Conc. Estd}[\text{mg} / \text{dL}]$$

Concentración Estándar = 200mg / dL

Concentración normal en ayuno de colesterol < 200mg/dL

Medición de homocisteína en suero mediante el kit Homocysteine para el equipo AxSYM System de Abbott.

1. Las muestras de suero se descongelan en hielo.
2. Se abre el paquete de reactivos para el kit (Homocysteine Reagent Pack, 100 test 5F51-20) que contiene:
 - a. Una botella (15.0 mL) de S-adenosil-L-cisteína
 - b. Una botella (12.4 mL) de hidrolasa S-adenosil-L homocisteína.
 - c. Una botella (15.6 mL) de anti-S-adenosil-L homocisteína.
 - d. Una botella (15.3 mL) de solución de pre-tratamiento que contiene DTT y adenosina.
3. El kit también incluye los reactivos para calibrar el equipo y los controles, de igual manera incluye las copas para las muestras de suero y los recipientes de reacción.
4. Se colocan las botellas de los reactivos en el equipo, ya que éste pipeteará la cantidad necesaria para la medición.
5. Se llenan las copas de las muestras con 150 µL de suero y se colocan en los carriles para cuantificación.
6. El equipo lleva a cabo la mezcla de reacción y la intensidad de la luz polarizada fluorescente de esta es medida por el lector óptico de FPIA del equipo.

Los valores normales de homocisteína en ayuno: 5 – 12 µmol/L

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA total con tiocianato de guanidina y cloruro de cesio por este método tiene una duración de tres días.

DIA 1

1. Limpiar el área de trabajo con etanol y DEPC.
2. Encender y ajustar las centrifugas.
 - Centrifuga (Beckman J2-MC, USA): rotor JA-20: 15 min, 18°C, 14000 rpm.
 - Ultracentrifuga (Beckman XL-90, USA): rotor SW-40TI no. de serie 10814: 18 hrs, 18°C, 29000 rpm.
3. Colocar 6 camisas para tubos Corex de 30 mL en el rotor de la centrifuga.
4. Colocar 40 tubos falcon en una gradilla y agregar 4.5 mL de agua DEPC a cada uno.
5. Colocar tubos Corex de 30 mL en una gradilla y agregar 8 mL de tiocianato de guanidina con una pipeta estéril desechable.
6. Agregar 56 μ L de β mercaptoetanol a cada tubo (en la campana).
7. Tapar los tubos con papel aluminio y dejar en la campana.
8. Sacar tejidos del ultracongelador y ponerlos en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen.
9. Cortar aproximadamente 500 mg de tejido y se depositan en los tubos corex.
10. Limpiar la punta del rotor del politron (Polytron, MOD PT 2000, USA) con el agua DEPC que se encuentra en los tubos falcon.
11. Homogeneizar con politron los tejidos en el tubo corex a máxima velocidad volver a limpiar la punta del rotor del politron con el agua DEPC que se encuentra en los tubos falcon.
12. Después de homogenizar todos los tubos.
13. Agregar 400 μ L de sarcosil 10% por la pared del tubo corex.

14. Mezclar por inversión 1 vez (tapar con parafilm).
15. Centrifugar 15 min, 18 °C, 14000 rpm.
16. En tubos de polialómero, agregar 4 mL de cloruro de cesio (no olvidar numerarlos).
17. Sacar los tubos de la centrífuga y tomar 8 mL de sobrenadante y verter suavemente por las paredes del tubo de polialómero para no romper el gradiente.
18. Colocar las muestras en las camisas de la ultracentrifuga y atornillar la tapa.
19. Enganchar las camisas al rotor y revisar que estén bien fijadas para evitar accidentes.
20. Encender el vacío de la ultracentrifuga y centrifugar 18 hr, 18 °C a 29000 rpm.

DIA 2

1. Apagar el vacío y retirar las muestras de la ultracentrífuga.
2. Destapar las camisas y extraer los tubos con la ayuda de una aguja.
3. Vertir el sobrenadante en un vaso y dejar invertidos en una gradilla en la que se ha puesto una toalla de papel en la base.
4. Cortar los tubos de polialómero a 2 cm de la base con una navaja.
5. Disolver la pastilla con 300 µL de agua-DEPC pipeteando suavemente.
6. Colocar el volumen final de la disolución a un tubo eppendorf y agregar otros 300 µL de agua-DEPC.
7. Agitar vortex hasta disolver la pastilla por completo.
8. Agregar 30 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 750 µL de etanol 100% frío.
9. Dar vortex por 30 segundos y almacenar a -70 °C un mínimo 24 horas.

DIA 3

1. Encender la microcentrífuga (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA) y ajustar 30 min, 4 °C, 14000 rpm.
2. Sacar muestras del ultracongelador y descongelar en hielo.
3. Centrifugar 30 min, 4 °C, 14000 rpm.
4. Desechar el etanol cuidando de no desprender la pastilla y dejar escurrir por inversión.
5. Añadir 1 mL de etanol 70 % frío y dar vortex hasta desprender la pastilla.
6. Centrifugar 15 min, 4 °C, 14000 rpm.

7. Tirar el etanol y secar el borde del tubo.
8. Suspender la pastilla con 500 μL el DEPC y dar vortex hasta disolver completamente.
9. Almacenar a -70°C

CUANTIFICACION DE RNA

Es necesario cuantificar las muestras de RNA, para posteriormente comprobar su integridad y llevar a cabo la reacción de RT-PCR.

1. El RNA total de hígado se cuantifico en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)
2. Descongelar las muestras en hielo.
3. Limpiar el pedestal del Nanodrop con 2 μL de agua libre de RNAasas. Después de limpiar el pedestal absorber el agua de este con papel libre de pelusa.
4. Leer el blanco (2 μL de agua libre de RNAasas).
5. Limpiar el pedestal del Nanodrop con papel libre de pelusa entre cada lectura.
6. Agitar por 30 segundos en vortex las muestras.
7. Depositar 2 μL de muestra en el pedestal del Nanodrop y cuantificarla.
8. Después de leer todas las muestras limpiar de nuevo el pedestal del Nanodrop con 2 μL de agua libre de RNAasas.

ELECTROFORESIS DE RNA

Se hace la electroforesis de RNA para comprobar que el RNA total se encuentra integro, para esto se tiene que preparar un gel de agarosa 1%.

Para preparar 100 mL de agarosa al 1% se necesita:

Tabla 11. Reactivos para preparar gel de agarosa 1%.

Reactivos	Cantidad
Agarosa	1 g
Agua DEPC	72 mL
MOPS 10X	10 mL
Formaldehido	18 mL

1. Lavar la cámara de electroforesis, el peine y la caja con agua DEPC y colocarlos en la campana y equilibrar, esto es con la finalidad de que el gel derecho.
2. Pesar 1 g de agarosa libre de RNAasas con papel aluminio, no emplear espátula, y agregar a un matraz de 100 mL.
3. Adicionar 72 mL de agua DEPC al matraz.
4. Disolver la agarosa en el agua DEPC calentando en el microondas por un minuto.
5. Dejar enfriar a 50°C y agregar 10 mL de MOPS 10x y 18 mL de formaldehido.
6. Vaciar en la caja y dejar solidificar por una hora.
7. Cuando el gel empiece a solidificar agregar un poco de MOPS 1x frío sobre la superficie del gel para evitar que se seque.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS DE RNA

1. Descongelar las muestras de RNA en hielo.
2. Suspender el RNA en agua estéril a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y mantener en hielo.
3. En tubos eppendorf nuevos realizar la siguiente mezcla de reacción

Tabla 12. Mezcla de reacción para preparar muestras de RNA para electroforesis.

Reactivo	1x
MOPS 10x	1.7 μL
Formaldehido	2.3 μL
Loading Buffer	2 μL
Bromuro de etidio	1 μL
Formamida	Ajustar con RNA a 13 μL
RNA	15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Volumen final	20 μL

4. Incubar 65°C por cinco minutos.
5. Llenar la cámara de electroforesis con MOPS 1X frío hasta 1 mm por encima del gel.
6. Cargar los pozos del gel con el volumen total de los tubos de reacción y correr 2.5 horas a 95 volts

FOTOGRAFÍA DEL GEL

Después de las 2.5 horas se toma una fotografía del gel (Kodak, Digital Imaging). En donde se deben observar don bandas, en donde la banda 28S debe

ser dos veces más brillante que la 18S, esto no indica que el RNA total no se encuentra degradado.

SINTESIS DEL RT POR MMuLV

Es necesario sintetizar el RT a partir de RNA total para poder llevar a cabo la reacción de RT-PCR. Para sintetizar el RT se emplea el termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9600 USA) y se programan los siguientes ciclos 1 hora 42°C, 5 minutos 94°C y 30 minutos a 4°C. El RT que se va a sintetizar va a tener una concentración final de 300 ng/μL.

1. Se descongelan las muestras en hielo.
2. Con los valores obtenidos de la cuantificación de RNA total se tiene que calcular el factor de dilución (FD) para que al momento de sintetizar el RT se obtenga una concentración de 3000 ng/μL y posteriormente hacer una dilución 1:10 para obtener una dilución 300ng/μL.
3. Ejemplo del cálculo:

Tabla 13. Ejemplo de cálculo para RT.

Muestra	Conc ng/μl	Promedio	PARA RT		
			FD	μL de RNA	μL de H ₂ O
Caseína t0	3621.2	3613	3.82	20	76.35
Caseína t0	3604.8				

$$FD = \left(\frac{Conc \text{ ng / } \mu L}{750} \right) - 1$$

$$FD = \left(\frac{3613}{750} \right) - 1 = 3.82$$

Para que pipetear las muestras sea más fácil se van a tomar 20 μL de RNA total, así que tomando en cuenta el FD antes calculado sabemos que por 1 μL de RNA vamos a poner 3.82 μL de agua DEPC. Por lo tanto si voy a tomar 20 μL de RNA de agua DEPC para hacer la dilución y tener el RNA total a una concentración de 3000 ng/ μL necesitamos: (20 μL de RNA * FD) 76.35 μL de agua DEPC.

Se va a realizar este cálculo para todas las muestras a las que se les va a sintetizar el RT. La dilución del RNA total se hace en tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL.

4. En tubos nuevos eppendorf de 0.5 mL con tapa plana se va a preparar la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 14. Mezcla de reacción para síntesis de RT.

Reactivo	1x
Buffer 5x	4 μL
Oligonucleótido dT 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 μL
dNTP 2Mm	4 μL
DTT 0.1M	2 μL
Transcriptasa reversa M-MULV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)	0.5 μL
Agua	4.5 μL
RNA	4 μL
Total	22 μL

5. Agitar cada tubo en vortex por 15 segundos y se da un mini spin por 15 segundos.
6. Colocar los tubos en la placa del termociclador y programar los ciclos antes mencionados.
7. Al terminar el proceso se diluye en RT (que tiene una concentración de 3000 ng/ μL) para obtener una concentración final de 300 ng/ μL .

REACCION DE RT-PCR

1. Descongelar en hielo los tubos con el RT.
2. Colocar en hielo los reactivos para llevar el RT-PCR.
3. Realizar la siguiente mezcla de reacción más uno por triplicado (que va a servir como blanco) en un tubo eppendorf de 1.5 mL, por ejemplo si tengo tres muestras sumo uno por el blanco= 4 muestras en total; por triplicado son 12. Así que múltiplo la cantidad de todos los reactivos por 12, excepto el RT ya que este se va adicionar al último.

Tabla 15. Mezcla de reacción para RT-PC

Reactivo	1x
Master Mix	6 µL
H ₂ O libre de RNAasas	4 µL
Ensayos fluorogénicos Taqman de Applied Biosystem inventariados*	0.6 µL
RT	1.4 µL

*Se van a emplear los Ensayos fluorogénicos Taqman de Applied Biosystem inventariados para SREBP-1c, FAS y actina.

4. Una vez ya preparada la mezcla de reacción se divide en tubos de 0.5 mL, uno por cada muestra. Y se añade 4.2 µL de RT.
5. Agitar en vortex y se mantienen los tubos en hielo.
6. Se toma una placa de 96 pozos de Applied Biosystem.
7. Pipetear 10 µL por triplicado en los pozos de la placa.
8. Cubrir la placa con una cubierta plástica adhesiva de Applied Biosystem.
9. Leer en equipo ABI prism 7000 de Applied Biosystem.

ESTUDIOS HISTOMORFOLOGICOS

Para procesar el tejido fijado en formalina 10% se hacen los siguientes lavados

Tabla 16. Procesamiento del tejido fijado en formalina 10%

Reactivo	Tiempo
Alcohol 95%	25 minutos
Alcohol 95%	25 minutos
Alcohol absoluto	20 minutos
Alcohol absoluto	20 minutos
Alcohol/ Xilol	30 minutos
Xilol	25 minutos
Xilol	25 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	30 minutos

1. Después del último baño en parafina, los cassetes se dejan 24 horas, para que la parafina se solidifique.
2. Después de embeber los cassetes en parafina. Se incluyen (Leica EG 1160, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany) con la finalidad de obtener bloques sólidos de parafina en donde el tejido se encuentre en una cara de este para su posterior corte, la inclusión se llevó a cabo de la siguiente forma, los cassetes se colocan en una cámara del incluidor que se encuentra a 65 °C por 20 minutos para que se desparafinen, posteriormente se abren los cassetes y se toma el tejido con pinzas metálicas y se colocan sobre una placa de metal de 2 x 2 cm sobre estas se vierte parafina líquida, se cubren con el cassette y se colocan sobre la placa fría del incluidor para formar bloques sólidos de parafina en los cuales el tejido va a quedar en una cara de estos para su posterior corte.
3. Para los cortes es necesario preparar un baño de agua a 65 °C a la que le va a añadir 0.1 g de grenetina para histologías.

4. Los cortes van a ser de 4 μm para hígado y de 10 μm para tejido adiposo.
5. Los cortes se van a depositar en el baño de agua y se van a recoger de este en portaobjetos previamente lavados con etanol.
6. Una vez el tejido en el portaobjetos se va a fijar a este colocando en la estufa a 65 °C por 20 minutos.
7. Después de que se fija el tejido al portaobjetos se va hacer la tinción con el método hematoxilina-eosina.
8. En la tinción se tiene que revertir el proceso de inclusión, para eliminar la parafina del tejido y permitir que los tintes penetren la sección. Por lo tanto antes de teñir se tiene que desparafinar la muestra a 61 °C por 30 minutos. En la Tabla 23 se presentan los pasos de la tinción en hematoxilina-eosina.

Tabla 17. Tinción con hematoxilina-eosina

Reactivo	Procedimiento
Xilol absoluto	10 minutos
Xilol absoluto	10 inmersiones
Xilol: etanol (50:50)	10 inmersiones
Etanol absoluto	10 inmersiones
Etanol 96%	10 inmersiones
Agua	Lavar hasta que los tejidos en las láminas estén de color blanco.
Hematoxilina	6-7 minutos
Alcohol ácido	1 inmersión
Agua	Lavar y tirar agua
Carbonato de litio	1 inmersión
Agua	Lavar
Etanol 80%	10 inmersiones
Eosina	5 inmersiones
Etanol 95%	10 inmersiones
Xilol-etanol (50:50)	10 inmersiones
Xilol absoluto	10 inmersiones

- Después de la tinción a las láminas se le añadieron 3 gotas de resina y se cubrieron con un cubreobjetos para proteger los tejidos y para su posterior revisión al microscopio.