



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El SNAT2, mTORC1, GCN2 e insulina como posibles sensores del tipo de proteína dietaria

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Claudia Cecilia Márquez Mota

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Nimbe Torres y Torres.

[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Pedraza Chaverri

[Facultad de Química](#)

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

[Facultad de Química](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre, 2016



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.

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la preparación y las herramientas para lograr esta meta.

A mi tutora la Dra. Nimbe Torres y Torres, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Armando Tovar Palacio, por sus enseñanzas y consejos durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Rachid Mazroui, por ser una parte integral de este proyecto y por sus valiosos consejos.

A los miembros del comité tutor al Dr. José Pedraza Chaverri y la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta, por sus aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado Dra. Amelia Farrés, Dra. María del Carmen Wachter, Dra. María Elena Ibarra, Dra. Marcia Hiriart y Dra. Amanda Gálvez por sus comentarios críticos y observaciones para mejorar este trabajo.

Al CONACYT por la beca de estudios de doctorado.

A la Q.A. Cinthya Itzél Rodríguez Gaytán, al Dr. Omar Granados y al Dr. Iván Torres, por el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por compartir buenos momentos y hacer del laboratorio un buen lugar de trabajo.

Dedicatorias

A mis padres, Cecilia Mota y Rafael Márquez, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A José F. Mateo, por su amor y comprensión.

Índice de contenido

Índice de Figuras	III
Índice de Tablas	VI
Resumen	1
Introducción	4
Proteína dietaria	4
Posibles mecanismos de acción de la proteína dietaria	6
Regulación de la síntesis de proteínas	7
Transportadores de aminoácidos	9
Blanco mecanístico de rapamicina (mTOR)	10
Ruta de señalización de mTORC1	13
Regulación de mTORC1	14
Papel de mTOR en la lipogénesis	17
Control general no desreprimible (GCN2)	18
Proteínas vegetales	20
Frijol negro.....	21
Maíz.....	21
Chícharo	22
Ajonjolí.....	23
Espirulina	23
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivo general	26
Objetivos particulares	26
Metodología	27
Fuentes de proteínas dietarias	27
Caracterización de las proteínas vegetales	27

Diseño experimental	28
Estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas	28
Estudio 2. Efecto de diferentes tipos de proteína después de un periodo de alimentación restringida en proteína.	32
Índice de conversión de alimento	35
Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero	36
Obtención de mRNA	37
PCR en tiempo real cuantitativo (RT-PCR)	38
Análisis de proteínas por Western blot	39
Análisis de perfiles polisomales	41
Determinación de aminoácidos en suero	43
Análisis estadístico	43
Resultados	44
Caracterización de las proteínas vegetales	44
Estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas	48
Ganancia de peso y consumo de alimento	48
Índice de conversión de alimento en ratas sanas	52
Parámetros bioquímicos en suero	53
Abundancia de mRNA y proteína	57
Estudio 2. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína	68
Ganancia de peso y consumo de alimento	68
Índice de conversión de alimento	72
Parámetros bioquímicos en suero	74
Determinación de aminoácidos en suero.....	76
Abundancia de mRNA y proteína	78
Determinación de perfiles polisomales en hígado	91
Discusión	94

Conclusiones	103
Perspectivas	104
Glosario	105
Bibliografía	108
Anexo 1	119
Anexo 2	134

Índice de Figuras

Figura 1. Perfil polisomal	9
Figura 2. Mecanismo de transporte de aminoácidos a través de la membrana	10
Figura 3. Representación esquemática de los componentes de mTORC1	11
Figura 4. Regulación de PRAS40 y deptor por mTORC1	12
Figura 5. Representación esquemática de los componentes de mTORC2.....	13
Figura 6. Blancos de mTORC1	14
Figura 7. Regulación de mTORC1	16
Figura 8. Ruta de señalización de GCN2	19
Figura 9. Diseño del estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas	28
Figura 10. Diseño del estudio 2. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína.....	32
Figura 11. Consumo de alimento de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	49

Figura 12. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	51
Figura 13. Índice de conversión de alimento.....	52
Figura 14. Concentración de homocisteína en suero ($\mu\text{mol/L}$) de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	57
Figura 15. Western blot representativo de SNAT2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	58
Figura 16. Expresión de SNAT2 en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	59
Figura 17. Expresión de GCN2 en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	61
Figura 18. Western blot representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1 y eIF4G de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	63
Figura 19. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en hígado	64
Figura 20. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión SREBP1C y FASN en hígado de ratas sanas	67
Figura 21. Ganancia de peso de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína.....	70
Figura 22. Ganancia de peso después de consumir las dietas con aporte adecuado de proteína durante: (A) un día, (B) siete días y (C) 14 días.....	71
Figura 23. Consumo de alimento de estudio restringido en proteína	72
Figura 24. Índice de conversión de alimento de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína	73

Figura 25. Western representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1, eIF4G de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína 79

Figura 26. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína 80

Figura 27. Western representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1, eIF4G de músculo de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína 82

Figura 28. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en músculo después de un periodo de alimentación restringida en proteína 83

Figura 29. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de SREBP1c y FASN en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína 86

Figura 30. Western blot representativo de SNAT2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína 87

Figura 31. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de SNAT2 en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína 88

Figura 32. Western blot representativo de GCN2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína 89

Figura 33. Western blot representativo de eIF2 α de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína 89

Figura 34. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de GCN2 y eIF2 α después de un periodo de alimentación restringida en proteína	90
Figura 35. Perfiles polisomales de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas dietarias después de un periodo de alimentación restringida en proteína.....	93
Figura 36. Efecto de diferentes tipos de proteínas sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1, eIF4G y expresión de SREBP1c y FASN en hígado de ratas sanas	98
Figura 37. Efecto de diferentes tipos de proteínas sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1, eIF4G, formación de polisomas hepáticos y expresión de SREBP1c y FASN después de un periodo de alimentación restringida en proteína.....	102
Figura 38. Diagrama de proceso para la determinación de insulina en suero.....	119
Figura 39. Diagrama de proceso para la determinación de glucagon en suero ..	120

Índice de Tablas

Tabla 1. Formulación de dietas experimentales para el estudio 1.....	30
Tabla 2. Formulación de dietas experimentales para el estudio 2.....	34
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados en los estudios	39
Tabla 4. Anticuerpos empleados en los estudios	41
Tabla 5. Análisis químico proximal de los diferentes tipos de proteínas	44
Tabla 6. Aminogramas de los diferentes tipos de proteínas.....	45

Tabla 7. Comparativo del perfil de aminoácidos de proteína concentrada de frijol vs frijol crudo entero	47
Tabla 8. Valores normales de diferentes parámetros bioquímicos en ratas.....	53
Tabla 9. Parámetros bioquímicos de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas.....	54
Tabla 10. Parámetros bioquímicos de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína	75
Tabla 11. Concentración de aminoácidos en plasma ($\mu\text{mol/mL}$) de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína	77
Tabla 12. Esquema de pipeteo para medición de triglicéridos	121
Tabla 13. Esquema de pipeteo para medición de colesterol.....	122
Tabla 14. Reactivos para preparar gel de agarosa 1%	124
Tabla 15. Mezcla de reacción para preparar muestras de RNA para electroforesis	125
Tabla 16. Ejemplo de cálculo para RT	126
Tabla 17. Mezcla de reacción para síntesis de RT.....	126
Tabla 18. Mezcla de reacción para RT-PCR.....	127
Tabla 19. Formulación para preparar buffer de lisis RIPA.....	128
Tabla 20. Activación de buffer de lisis RIPA.....	128
Tabla 21. Geles de poliacrilamida para western blot.....	130

Resumen

El SNAT2, mTORC1, GCN2 e insulina como posibles sensores del tipo de proteína dietaria

Introducción: La desnutrición es un problema de salud asociado a diferentes factores como la pobreza, la vejez y hospitalización prolongada, que afecta aproximadamente al 11% de la población mundial (FAO et al., 2015). Una estrategia para combatir la desnutrición es el uso de suplementos hechos con mezclas de proteínas vegetales como soya, maíz y sorgo, entre otras (Bressani et al., 1959). Los estudios realizados por Bressani y Scrimshaw en la década de los 50's demostraron la importancia de la combinación de proteínas dietarias en la recuperación nutricional tanto en niños como en personas de la tercera edad, sin embargo en estos estudios, debido a las limitantes tecnológicas de la época, no fue posible demostrar la existencia de posibles sensores del tipo y calidad de la proteína dietaria. Actualmente se conocen los sensores para hidratos de carbono, ácidos grasos y colesterol. Sin embargo no existe una evidencia clara de cuál sería el posible sensor de tipo de la proteína dietaria. Por lo anterior, en el presente estudio se proponen cuatro posibles sensores: mTORC1 (blanco mecanístico de rapamicina), GCN2 (control general no desreprimible), el transceptor de aminoácidos SNAT2 (transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 2) y cambios en la secreción de insulina. **Objetivo:** estudiar el efecto de proteínas dietarias de diferente tipo y calidad sobre la ganancia de peso y la expresión de los posibles sensores de proteínas en ratas sanas y después de un periodo de alimentación restringida en proteína. **Metodología:** *Estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas.* Ratas Sprague Dawley de la compañía Harlan-UNAM, macho, con peso entre 200 y 250g, fueron alimentadas durante 21 días en horario restringido con una de las siguientes dietas con un contenido de proteína del 20%: caseína (**C**), proteína aislada de soya (**S**), proteína concentrada de frijol negro (**F**), proteína aislada de chícharo (**Ch**), espirulina (**E**), proteína aislada de ajonjolí (**A**), proteína de maíz (**M**)

y la mezcla de 10% proteína concentrada de frijol negro + 10% proteína de maíz **(FM)**. Se cuantificó el consumo de alimento, se determinó ganancia de peso, en suero se analizaron parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos y homocisteína) y concentración de hormonas (insulina y glucagon) y se midió la abundancia de mRNA y de proteína de SNAT2, GCN2 y la ruta de mTORC1 en hígado. *Experimento 2. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína.* Ratas Sprague Dawley de la compañía Harlan-UNAM, macho, con peso entre 100 y 120g se alimentaron con una dieta baja en proteína (BP; 0.5% de caseína) en horario restringido durante 21 días, en el día 22 se dividieron en siete grupos experimentales de los cuales uno continuó consumiendo BP y los demás fueron asignados a dietas de recuperación con un aporte adecuado de proteína (20%): C, S, F, M FM y 10% proteína aislada de soya + 10% proteína de maíz **(SM)**. Se cuantificó el consumo de alimento, se determinó ganancia de peso, en suero se analizaron parámetros bioquímicos (glucosa, albúmina, colesterol y triglicéridos) y concentración de hormonas (insulina y glucagon) y se midió la abundancia de mRNA y de proteína de SNAT2, GCN2 y la ruta de mTORC1 en hígado y músculo y los perfiles polisomales en hígado. **Resultados Estudio 1:** Ratas alimentadas con C, FM y Ch presentaron la mayor ganancia de peso, todos los grupos experimentales presentaron parámetros bioquímicos en suero dentro de los valores normales. Las ratas alimentadas con M y A presentaron un incremento en la expresión de SREBP1c (proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides) y FASN (sintasa de ácidos grasos), lo que indica un aumento en la lipogénesis, mientras que las ratas alimentadas con FM y Ch presentaron la menor expresión de estas proteínas. Las ratas alimentadas con FM presentaron la mayor fosforilación de S6K1 (cinasa ribosomal 1 S6), lo que favorece la biogénesis ribosomal e indica un posible aumento en la síntesis de proteínas. La abundancia de eIF4G (factor de inicio de la traducción eucariótico 4G) incrementó en las ratas alimentadas con FM y Ch, mientras que las ratas alimentadas con M y A presentaron una menor expresión de eIF4G y S6K1 fosforilado, esto indica que el consumo de dietas deficientes en aminoácidos como la lisina ocasiona una

disminución en el proceso de síntesis de proteínas. **Resultados Estudio 2:** Después del periodo de la alimentación restringida en proteína las ratas alimentadas con C, S, FM y SM presentaron la mayor ganancia de peso. Los parámetros bioquímicos en suero se mantuvieron dentro de los valores normales a excepción de la insulina ya que las ratas alimentadas con C presentaron hiperinsulinemia después de siete días de consumir la dieta con el aporte adecuado de proteína (20%). Este incremento en la concentración de insulina no es un efecto deseable ya que la hiperinsulinemia se ha relacionado con el desarrollo de dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Kelly et al., 2014). Las ratas alimentadas con SM presentaron la mayor expresión de eIF4G y formación de polisomas en hígado seguidas de las ratas alimentadas con FM, lo que indica un probable aumento en la síntesis de proteínas. De igual forma las ratas alimentadas con FM y SM presentaron la mayor abundancia de S6K1 fosforilado en hígado después de un día de consumir las dietas, lo anterior indica que el consumo de FM y SM favorece el proceso de síntesis de proteínas en hígado, lo que indica una buena recuperación nutricional. La activación de la ruta de señalización de mTORC1, medida a través de la fosforilación de S6K1 y abundancia de eIF4G, en músculo es mas lenta que en hígado y la expresión de eIF4G y S6K1 fosforilado incrementó en las ratas alimentadas con FM y SM después de siete días de consumir las dietas con el 20% de proteína. Lo anterior indica que la tasa de recambio proteico es más lenta en músculo que en hígado. **Conclusiones:** Se demostró que la combinación FM y SM o S (proteínas de buena calidad) favorecen la activación de mTORC1 medida a través de un aumento en la fosforilación de su proteína blanco S6K1 y por un aumento en la abundancia de eIF4G. En ratas sanas y animales sometidos a un periodo de alimentación restringida en proteína. Lo anterior indicaría que mTORC1 es un posible sensor de la calidad de la proteína dietaria.

Introducción

Proteína dietaria

Las fuentes de proteína en la dieta de los mamíferos, incluyendo al humano son de origen animal o vegetal. La principal diferencia entre estas es que las proteínas de origen animal se conocen como proteínas completas por que proveen los ocho aminoácidos esenciales en cantidad suficientes, mientras que las proteínas de origen vegetal son proteínas incompletas ya que tienen deficiencias de uno o mas aminoácidos esenciales (Otten et al., 2006).

Las proteínas derivadas de algunas leguminosas, como la de la soya, son de buena calidad. Ésta depende de su habilidad de proveer aminoácidos y nitrógeno en cantidades necesarias para cubrir los requerimientos del cuerpo para asegurar el crecimiento y mantenimiento (Otten et al., 2006). En tanto que algunas otras, como las proteínas de cereales, presentan deficiencia de varios aminoácidos, lo que las hace proteínas de baja calificación química (CQ). La CQ se define como la deficiencia relativa del primer aminoácido limitante de una fuente de proteína en relación a una proteína patrón (Schaafsma, 2000).

Se ha demostrado en animales de experimentación que los cambios metabólicos que genera el consumo de proteínas de origen animal son diferentes a los observados cuando se administran ciertas proteínas de origen vegetal (Kritchevsky, 1976, Kritchevsky, 1979). En la actualidad el consumo de proteínas de origen animal ha incrementado significativamente a nivel mundial y de acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud) para el año 2030 se proyecta un consumo mundial de 45.3 kg de carne *per cápita* anual y 89.5 kg de leche *per cápita anual* (WHO, 2015). Es importante resaltar que en estudios recientes se ha demostrado la relación entre el consumo de proteínas de origen animal con el desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes tipo 2 (Feskens et al., 2013), enfermedades cardiovasculares y en algunos casos incluso cáncer (Sinha et al., 2009).

Adicionalmente a los efectos adversos a la salud relacionados con el consumo de proteínas de origen animal, cabe considerar el alto impacto ambiental que implica la obtención de leche, carne y huevo, ya que se deben considerar los insumos que se requieren como son: agua, tierra y forraje (Steinfeld et al., 2006). Para la producción de un kilogramo de carne se requieren aproximadamente 15 000 litros de agua y para la alimentación del ganado se destina el 70% de la tierra agrícola (Hoekstra, 2014).

De forma directa e indirecta, a través de la producción de forraje, la industria ganadera ocupa un 30% de la superficie libre de hielo del planeta y en la mayoría de los casos la industria ganadera es responsable de contaminación de suelos, residuos de patógenos y drogas en ríos, lagos y mares, lo que en conjunto con los residuos de los animales contribuye al cambio climático (Steinfeld et al., 2006).

Debido a lo anterior se debe considerar el cambio al consumo de proteínas de origen vegetal que representan un menor impacto ambiental en relación a las proteínas de origen animal, con posibles efectos benéficos para la salud, ya que se ha reportado que el consumo de este tipo de proteínas disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Richter et al., 2015). Por otra parte, la industria farmacéutica ha incrementado el interés en el estudio de ciertas proteínas o de combinaciones de proteínas para su posible utilización en la recuperación nutricional tanto en niños como en personas de la tercera edad debido a su posible papel en un aumento en la síntesis de proteínas. Es importante señalar que se han reportado los sensores para hidratos de carbono, para ácidos grasos y colesterol, sin embargo no existe una evidencia clara de cuáles serían los posibles sensores del tipo de proteína dietaria.

Como un posible sensor del tipo de proteína dietaria se ha propuesto a mTORC1 (blanco mecanístico de rapamicina) el cual regula varios procesos anabólicos en la célula como la síntesis de proteínas y lípidos. La concentración de aminoácidos intracelulares como la leucina, glutamina y arginina activan a mTORC1 (Dodd y Tee, 2012, Efeyan et al., 2015). También se ha propuesto que el sistema de transporte SNAT2 (transportador de aminoácidos neutros acoplado a sodio 2)

podiera ser el sensor (Pinilla et al., 2011), o que el patrón de aminoácidos de cada proteína pudiera regular las concentraciones de insulina y glucagon (Noriega-Lopez et al., 2007) y estos cambios hormonales a su vez regular a mTORC1.

Actualmente se conoce que la célula tiene la capacidad de detectar la deficiencia de aminoácidos a través de la proteína GCN2 (control general no desreprimible). Esta proteína tiene alta afinidad a los tRNAs sin cargar. Cuando hay una disminución en los niveles de aminoácidos intracelulares GCN2 y los tRNAs sin cargar se unen ocasionando un cambio conformacional que favorece la fosforilación de un intermediario clave en el inicio de la traducción: eIF2 α (factor de inicio de la traducción 2 alfa en eucariontes) lo que inhibe el inicio de la traducción (Averous et al., 2011, Efeyan et al., 2015).

Posibles mecanismos de acción de la proteína dietaria

Los nutrientes como señales y sus posibles sensores

Los nutrientes sirven como señales que al ingresar a la célula pueden ser detectados de manera directa por receptores de membrana o transportadores o a través de mecanismo indirectos que dependen de la detección de otra molécula que refleja la abundancia del nutriente (Hyde et al., 2003, Efeyan et al., 2015). Como se mencionó anteriormente no existe evidencia de un posible sensor del tipo de proteína dietaria y esto se debe en parte a la diversidad estructural y metabólica de las proteínas (Kim, 2009).

Los aminoácidos son los bloques estructurales a partir de los cuales se sintetizan las proteínas del organismo. Desde el punto de vista nutricional sólo nueve aminoácidos son esenciales: histidina, metionina, triptófano, fenilalanina, lisina, leucina, isoleucina, valina y treonina. Por lo tanto los requerimientos de éstos se deben cubrir en la dieta ya que su deficiencia puede ocasionar alteraciones a la salud (Fafournoux et al., 2000).

Se ha demostrado que una disponibilidad elevada de aminoácidos generalmente favorece el anabolismo e inhibe el catabolismo (van Sluijters et al., 2000). De igual

manera una mayor disponibilidad de aminoácidos incrementa la abundancia de mRNA. Cuando los aminoácidos se encuentran en bajas concentraciones como sería en el caso de una desnutrición proteínica, sucede el efecto contrario, es decir, la síntesis de proteínas se ve disminuida (Hyde et al., 2003).

Se ha establecido que los aminoácidos actúan a través de la coordinación de diversas vías de señalización que modulan la síntesis de proteínas, la proteólisis, la liberación y secreción de hormonas así como el metabolismo y el transporte de aminoácidos. Las dos rutas de señalización más estudiadas son la rutas de GCN2 y mTORC1. Estas dos rutas son reguladas por mecanismos que involucran la detección de aminoácidos intracelulares (Taylor, 2009).

El mecanismo de detección de aminoácidos que se encuentra regulado por GCN2 y mTORC1 se ha comenzado a elucidar (Avruch et al., 2009) y los transportadores de aminoácidos se consideran como el punto inicial de contacto entre la célula y el ambiente y se cree que tienen un papel importante en la detección y señalización de los aminoácidos, es decir, los transportadores de aminoácidos exhiben una función dual de transportadores y receptores por lo cual se les denomina transreceptores (Hundal y Taylor, 2009).

Regulación de la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas es regulada por mTORC1 a través de sus blancos, S6K (cinasa ribosomal 1 S6) y 4EBP1 (proteína de unión a eIF4E). La proteína S6K al ser activada por mTORC1 fosforila varios sustratos relacionados con la síntesis de proteínas como: la proteína ribosomal S6, eEF2K (factor de elongación 2 en eucariontes) y eIF4A (factor de inicio de la traducción 4A en eucariontes), por lo que la fosforilación de S6K incrementa la biogénesis de mRNA y favorece el inicio de la traducción y la elongación. La fosforilación de la proteína 4EBP1 previene su unión a eIF4E, lo cual permite que se lleve a cabo la traducción dependiente de cap (Iadevaia et al., 2012, Laplante y Sabatini, 2012). mTORC1 también controla la biogénesis ribosomal y lo puede hacer mediante dos rutas:

- Promoviendo la traducción de los mRNA que codifican todas las proteínas ribosomales y otros componentes de la maquinaria traduccional como son los factores de elongación.
- Promoviendo la transcripción de rRNAs (Iadevaia et al., 2012).

La traducción se puede resumir en tres etapas: inicio (es el paso limitante de la síntesis de proteínas), elongación y terminación (Aitken y Lorsch, 2012). Los mecanismos de control traduccional se enfocan principalmente a la fase de inicio, en este paso la subunidad pequeña (40S) se asocia con varios factores de inicio de la traducción (eIFs) como: eIF2 α (factor de inicio de la traducción 2 alpha en eucariontes) en complejo con GTP y Met-tRNA^{iMet}, eIF3 (factor de inicio de la traducción 3 en eucariontes) que interacciona con el mRNA a través de cap en el extremo 5', el cual previamente se había unido a un complejo de tres eIFs llamado eIF4F (factor de inicio de la traducción 4F en eucariontes). La unión de estos factores de inicio de la traducción con la subunidad 40S forma el complejo de pre-iniciación 48S el cual sufre cambios conformacionales que permiten que la maquinaria encuentre el codón de inicio de la traducción (AUG). Después de reconocer el codón de inicio se lleva a cabo una reacción de hidrólisis de GTP y la mayoría de los eIFs se liberan y la subunidad grande (60S) se une a la subunidad pequeña (40S-mRNA-Met-tRNA^{iMet}) para formar el ribosoma competente para la traducción 80S, también conocido como monosoma.

Más de un monosoma 80S se puede unir a un mRNA al mismo tiempo y esto se conoce como polisomas. El número de polisomas en un mRNA refleja la tasa de inicio, elongación y terminación de un transcrito bajo ciertas condiciones (Masek et al., 2011). Una forma de estudiar la tasa de la síntesis de proteínas es mediante el análisis del perfil de polisomas, lo cual se puede medir mediante un gradiente de sacarosa (Figura 1) (Coudert et al., 2014).

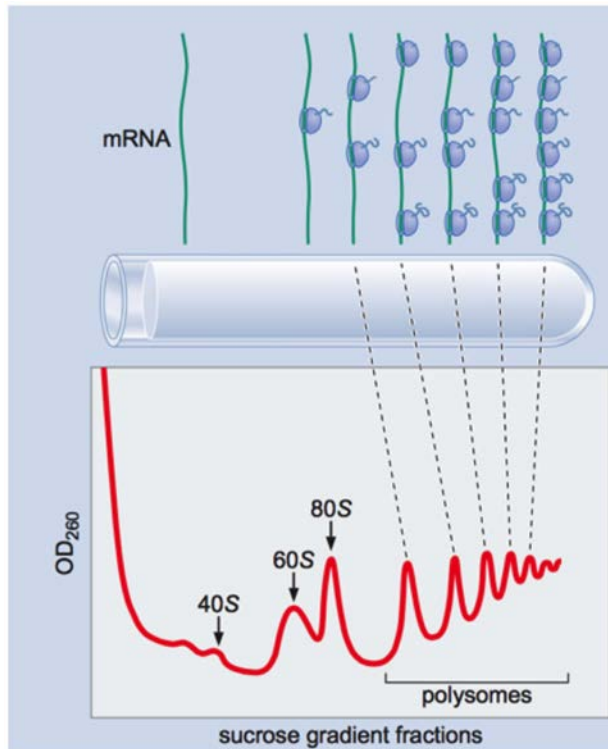


Figura 1. Perfil polisomal
Tomada de: Watson et al., 2014.

Transportadores de aminoácidos

Actualmente, se acepta cada vez más el concepto de que la unión de ciertos aminoácidos a su respectiva proteína transportadora puede servir como un medio efectivo para sensar la biodisponibilidad de los aminoácidos en la superficie celular. Varios transportadores de aminoácidos funcionan como transportadores secundarios (Hundal y Taylor, 2009).

Los transportadores de aminoácidos de la familia SLC38 (familia de transportadores dependientes de sodio) facilitan la captura de aminoácidos neutros de cadena corta y aminoácidos indispensables como metionina y treonina (Taylor, 2012). Esta familia de transportadores también es conocida como el sistema A el cual es dependiente de sodio (Na^+). El sistema A comprende las isoformas SNAT1/2/4 de las cuales la isoforma SNAT2 se expresa en una gran

variedad de tejidos. Los sustratos del transportador SNAT2 son alanina, asparagina, cisteína, glutamina, histidina, metionina, prolina y serina (Broer, 2014).

SNAT2 es un transportado secundario que favorece la acumulación intracelular de aminoácidos, lo que facilita el intercambio de sustratos a través de transportadores como el sistema L, el cual, es un intercambiador 1:1 de aminoácidos que puede acoplar la captura de leucina con la salida de glutamina citoplasmática (Hyde et al., 2003) (Figura 2).

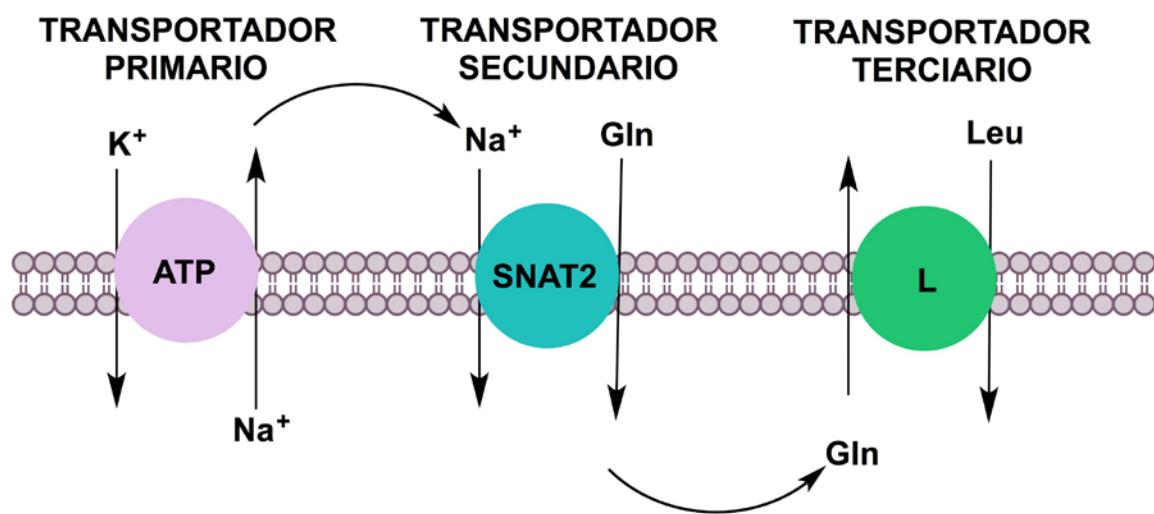


Figura 2. Mecanismo de transporte de aminoácidos a través de la membrana
Modificada de: Hundal y Taylor, 2009.

Blanco mecanístico de rapamicina (mTOR)

El blanco mecanístico de rapamicina (mTOR) es una proteína cinasa de 289kDa que pertenece a la familia de cinasas relacionadas a fosfoinositol 3 – cinasa (PIKK). Forma dos complejos, mTORC1 y mTORC2, con diferentes funciones y componentes.

El complejo mTORC1 tiene cinco componentes:

- mTOR que es la subunidad catalítica del complejo,

- Raptor proteína regulatoria asociada a mTOR y se encarga de unir mTOR a sus sustratos,
- mLST8 proteína 8 mamífera letal con Sec13 contribuye a la estabilidad del complejo,
- PRAS40 sustrato de AKT rico en prolina de 40kDa, la cual se ha identificado como un regulador negativo de mTORC1, y
- deptor proteína que interacciona con mTOR que contiene un dominio Dep e inhibe la actividad cinasa de mTORC1 y mTORC2 (Laplante y Sabatini, 2009, Kim y Guan, 2011) (Figura 3).

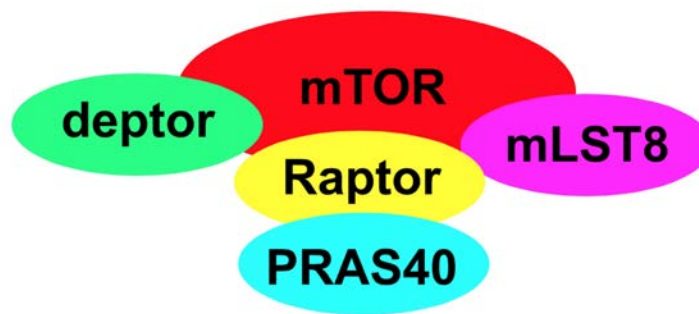


Figura 3. Representación esquemática de los componentes de mTORC1
Modificada de: Bai y Jiang, 2010.

La ruta de señalización de mTORC1 es regulada por varias señales intracelulares y extracelulares como factores de crecimiento, estrés, estatus energético, oxígeno y aminoácidos (Laplante y Sabatini, 2012). Cuando hay una disminución en la concentración de factores de crecimiento, aminoácidos o disminuye el estatus energético (aumento de AMP) la actividad de mTORC1 se encuentra disminuida PRAS40 y deptor se unen al complejo, donde promueven la inhibición del complejo. Se ha propuesto que PRAS40 regula la actividad cinasa de mTORC1 actuando como un inhibidor directo de la unión de sustratos. Cuando incrementa la actividad de mTORC1, éste fosforila directamente a PRAS40 y a deptor lo que

ocasiona una disminución de la interacción de estas dos proteínas con el complejo y por lo tanto aumenta su señalización (Figura 4) (Wang et al., 2006).

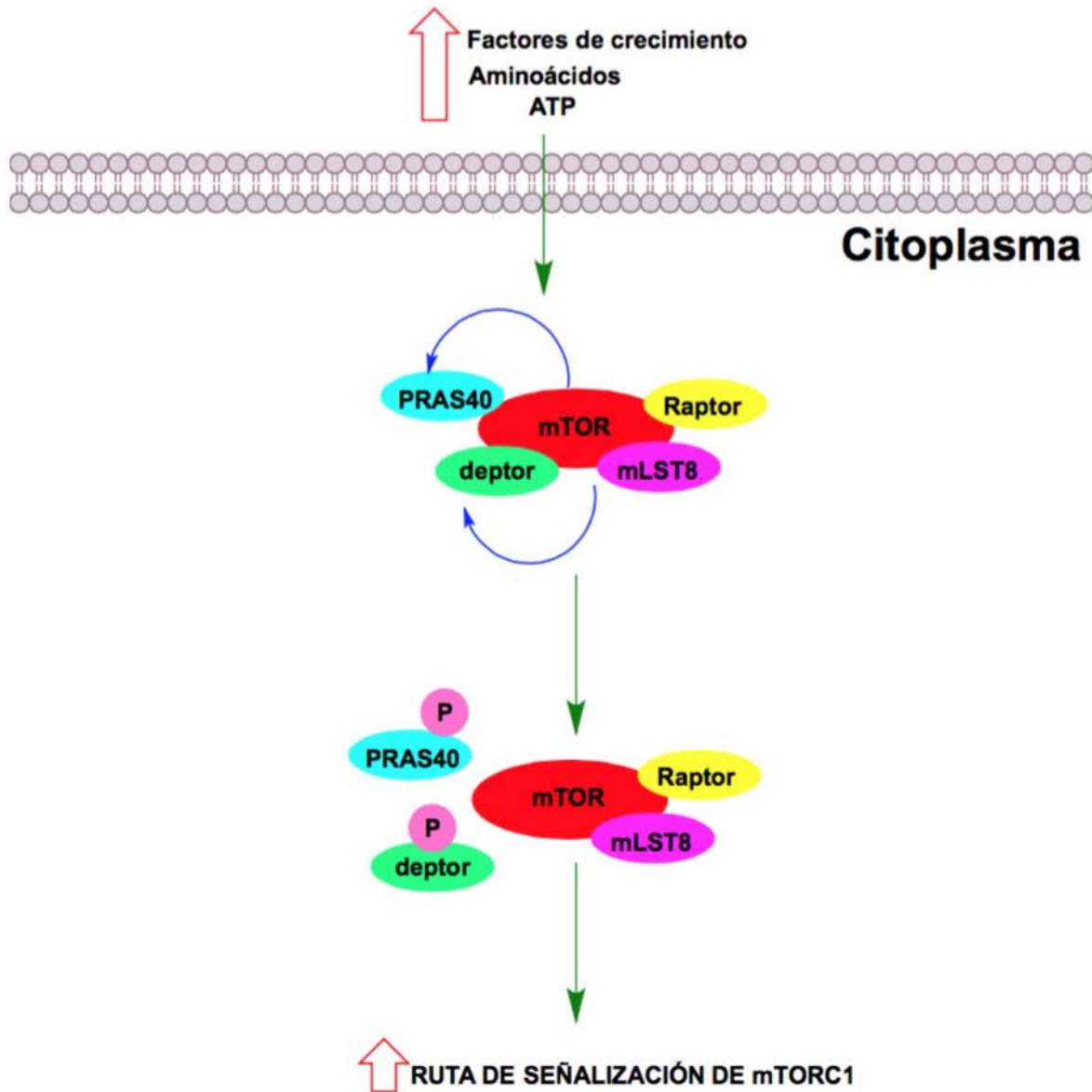


Figura 4. Regulación de PRAS40 y deptor por mTORC1
Fuente: Wang et al., 2006.

El complejo mTORC2 está formado por seis proteínas de las cuales la mayoría son iguales a las del complejo 1, siendo sus proteínas específicas:

- Rictor compañero insensible a rapamicina de mTORC y es necesaria para la estabilidad y actividad del complejo.
- mSin1, es la proteína cinasa de mamíferos activada por estrés y es necesaria para la estabilidad y actividad del complejo.
- Protor, es la proteína asociada con Rictor (Laplante y Sabatini, 2009, Kim y Guan, 2011) (Figura 5).

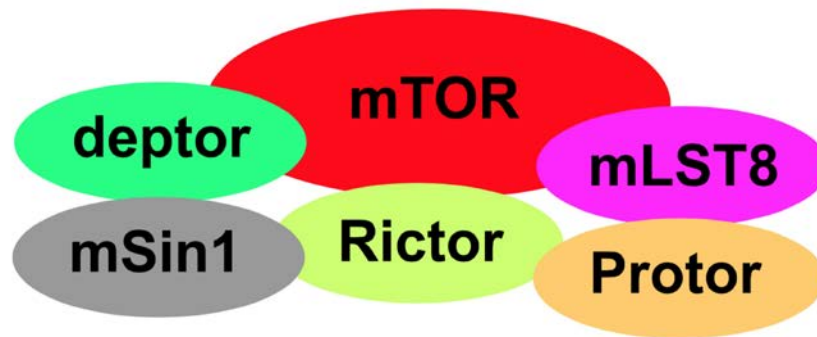


Figura 5. Representación esquemática de los componentes de mTORC2
Modificada de: Bai y Jiang, 2010.

Ruta de señalización de mTORC1

El complejo 1 estimula el crecimiento, la proliferación celular, la síntesis de macromoléculas e inhibe la autofagia. Los blancos más conocidos de mTORC1 son S6K1 (cinasa ribosomal S6) y 4EBP1 (proteína de unión a eIF4E [factor de inicio de la traducción 4E en eucariontes]). Raptor es un componente esencial en la ruta de señalización de mTORC1 ya que favorece la fosforilación de sus blancos (Suzuki y Inoki, 2011, Lieberthal y Levine, 2012).

La fosforilación de 4EBP1 por mTORC1 induce la disociación de 4EBP1 de eIF4E (factor de iniciación eucariótico), permitiendo la unión del eIF4E con los factores eIF4G y eIF4A para formar un complejo conocido como eIF4F y así iniciar la traducción dependiente de cap (Proud, 2002, Foster y Fingar, 2010). Por otro lado la fosforilación de S6K1 por mTORC1 ocasiona su activación, que a su vez favorece la biogénesis ribosomal (Proud, 2004) (Figura 6).

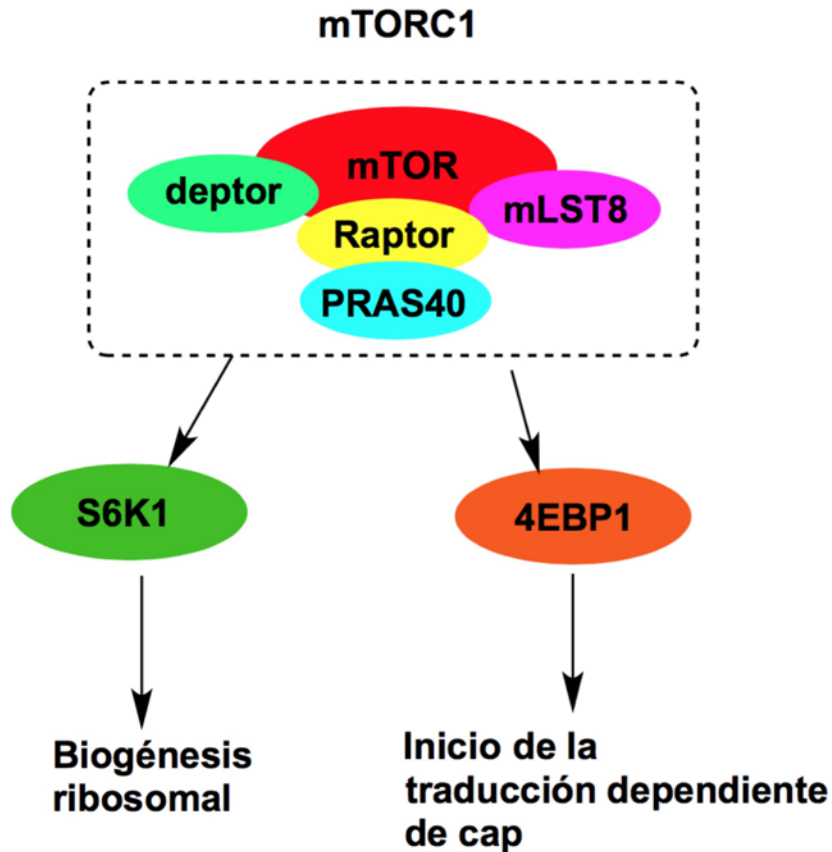


Figura 6. Blancos de mTORC1
Modificada de: Laplante y Sabatini, 2012.

Regulación de mTORC1

La ruta de mTORC1 es regulada por diferentes señales como factores de crecimiento, estrés, nivel energético, oxígeno y la disponibilidad de aminoácidos (Laplante y Sabatini, 2012). La insulina, regulan la ruta de señalización de mTORC1 a través de la ruta de PI3K/Akt. Akt activa a mTORC1 a través de la fosforilación de TSC2 (tuberina), que componente de un complejo de tres proteínas llamado complejo de esclerosis tuberosa (TSC) formado por TSC1 (hamartina), TSC2 (tuberina) y TBC1D7 (miembro 7 con dominio Tre2-Bub2-Cdc16-1) (Bhaskar y Hay, 2007, Dibble y Manning, 2013). TSC2 actúa como una proteína activadora de GTPasas (GAP) sobre el homólogo de Ras enriquecido en el cerebro (Rheb) (Jewell y Guan, 2013).

Rheb es una GTPasa pequeña que se activa cuando está unida a GTP. La fosforilación del complejo TSC1/TSC2/ TBC1D7 por Akt resulta en una inhibición de su actividad de GTPasa, ocasionando un incremento de GTP-Rheb y por lo tanto mayor actividad de mTORC1. Adicionalmente a la fosforilación de TSC1/TSC2/ TBC1D7 por Akt, éste también ocasiona la fosforilación de PRAS40 lo que provoca su disociación de mTORC1 favoreciendo la actividad de mTORC1 (Dennis et al., 2011).

La insulina al unirse a su receptor de membrana IRS (sustrato receptor de insulina) ocasiona la autofosforilación de IRS en sus residuos de tirosina, lo que recluta y activa a PI3K(fosfatidilinositol 3-cinasa). Cuando se activa PI3K convierte a PIP₂ (lípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) en PIP₃ (lípidos de membrana fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). PIP₃ favorece la fosforilación y activación de Akt por PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinosítidos -1). En estudios recientes se ha demostrado que por acción de la insulina a través de la vía PI3K/Akt, Raptor se fosforila directamente por Akt favoreciendo la actividad de mTORC1 (Huang y Fingar, 2014) (Figura 7).

Por su parte la disponibilidad de aminoácidos activa la ruta de mTORC1 a través de un mecanismo independiente de la ruta de PI3K/Akt. Los aminoácidos regulan la ruta de mTORC1 a través de las Rag GTPasas, que son miembros de las proteínas Ras relacionadas a GTP (Sancak et al., 2010). Las Rag GTPasas consisten de cuatro GTPasas pequeñas (A-D), que existen como heterodímeros entre Rag A o B con Rag C o D y se localizan en la membrana lisosomal. Los aminoácidos promueven la unión de Rag A/B con GTP ocasionando que interaccione con mTORC1 a través de Raptor favoreciendo la translocación de mTORC1 a la membrana lisosomal (Huang y Fingar, 2014). Las Rags GTPasas se encuentran ancladas a la membrana lisosomal por un complejo llamado Ragulator y es el encargado de cargar Rag A/B con GTP debido a su función GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). A su vez la función de Ragulator es controlada por la v-ATPase lisosomal que sufre cambios conformacionales cuando

los aminoácidos se acumulan en la membrana interna lisosomal (Zoncu et al., 2011, Groenewoud y Zwartkruis, 2013, Yang et al., 2013) (ver Figura 7).

Por todo lo anterior, cuando hay una disminución en la disponibilidad de aminoácidos el proceso de síntesis de proteínas activado por mTORC1 se inhibe, esta disminución es sensada por la proteína GCN2.

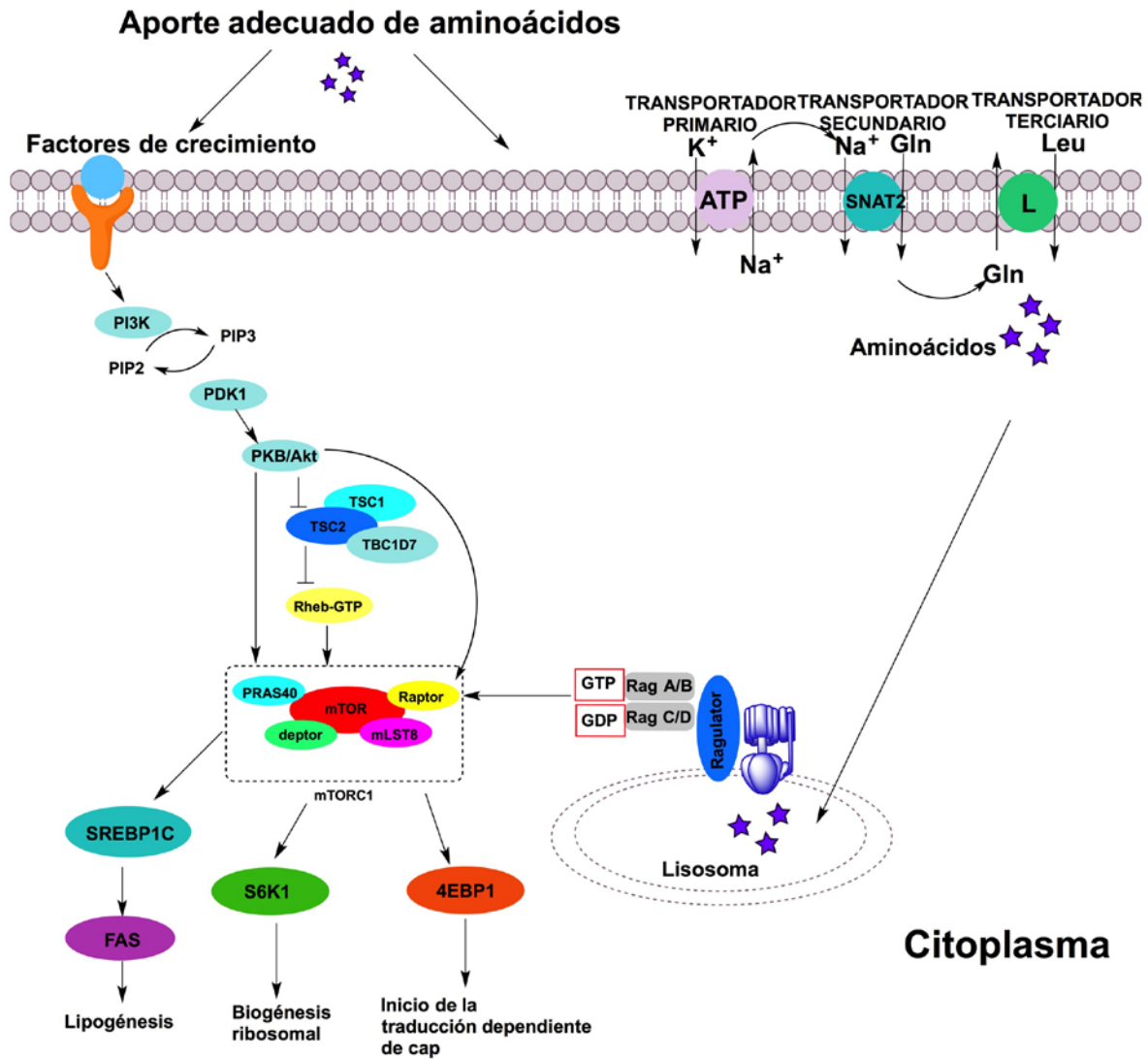


Figura 7. Regulación de mTORC1
Figura Original.

Papel de mTOR en la lipogénesis

El complejo mTORC1, adicionalmente a la regulación que ejerce sobre la síntesis de proteínas también controla la síntesis de lípidos. Se ha demostrado que mTORC1 regula positivamente al factor de transcripción SREBP1c (proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides) (Laplante y Sabatini, 2009). La inhibición de mTORC1 reduce la expresión de SREBP-1c y por lo tanto disminuye la expresión de genes lipogénicos.

Los SREBPs son factores de transcripción que pertenecen a la familia 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* (Eberle et al., 2004). Los SREBPs se sintetizan como formas precursoras inactivas que se encuentran ancladas a la membrana del retículo endoplasmático en una disposición de horquilla (Bernadier y Moustaid-Moussam, 2004).

El factor de transcripción SREBP1c está regulado por los cambios de insulina en sangre, la actividad de SREBP1c aumenta cuando las concentraciones de insulina son elevadas y activa los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Bernadier y Moustaid-Moussam, 2004). Las primeras evidencias de que el tipo de proteína dietaria era capaz de regular transcripcionalmente a SREBP1c por cambios en la concentración de insulina surgieron a partir de experimentos con roedores, en donde se demuestra que el consumo de proteína de soya es capaz de inducir en menor grado la secreción de insulina durante el postprandio, lo que ocasionaba una menor expresión de SREBP1c y su proteína blanco FASN (sintasa de los ácidos grasos) en comparación con roedores que consumieron caseína (Tovar et al., 2002).

Se ha demostrado que mTORC1 es necesario para la inducción de SREBP1c estimulada por insulina. Cuando se inhibe la ruta de señalización de PI3K/Akt se bloquea el efecto de la insulina sobre la expresión de SREBP1c y la inhibición de

mTORC1 por rapamicina de igual manera disminuye la expresión de SREBP-1c in vivo e in vitro (Li et al., 2010).

Uno de los blancos de SREBP1c es FASN. Esta enzima cataliza el último paso de la síntesis de ácidos grasos (Liu et al., 2010). Cuando hay una expresión elevada y prolongada de FASN, se corre el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la acumulación de lípidos como la esteatosis hepática.

Control general no desrepreible (GCN2)

GCN2 y mTORC1 son miembros importantes de la regulación de la maquinaria traduccional. La síntesis de proteínas es un proceso de alta demanda energética para la célula que es regulado en diferentes puntos. El primer punto de regulación de la síntesis de proteínas es el inicio de la traducción.

La proteína GCN2 fue descubierta originalmente en levaduras como un regulador importante del inicio de la traducción dependiente de aminoácidos (Hinnebusch, 2005). Durante periodos de inanición o cuando hay niveles bajos de aminoácidos existe un aumento en la cantidad de tRNA sin cargar, los cuales son sensados por GCN2, la función de esta proteína es fosforilar a eIF2 α (factor de inicio de la traducción 2 alfa en eucariontes) en la serina 51 (Deval et al., 2009).

El eIF2 α se puede unir tanto a GDP como a GTP, y la capacidad de intercambiar GDP a GTP es esencial para que pueda unir el Met-tRNA^{iMet} a la subunidad 40s del ribosoma, iniciando con ello el proceso de traducción. La fosforilación del eIF2 α ocasiona una disminución en la traducción de la mayoría de los mRNAs (Deval et al., 2009), sin embargo permite la traducción de mRNAs involucrados en la respuesta al estrés debido a la falta de aminoácidos como ATF4 (factor de transcripción activador 4), ATF5 (factor de transcripción activador 5) y la proteína GADD34 (proteína de disminución de crecimiento y daño inducible de DNA 34) (Taylor, 2009).

La proteína ATF4 induce el aumento en la transcripción al unirse a los elementos de respuesta CARE (CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP)-activating

transcription factor (ATF)), los cuales son llamados así porque están compuestos por una mitad del sitio de unión para la familia de los factores de transcripción C/EBP y la otra mitad del sitio de unión para la familia de los factores de transcripción ATF. Los productos de los genes que contienen los CARE modulan un amplio espectro de eventos celulares diseñados para adaptar a las células y al organismo al estrés dietario. Si la adaptación no es suficiente, ATF4 también puede inducir la apoptosis celular (Guo y Cavener, 2007, Deval et al., 2009, Kilberg et al., 2009) (Figura 8).

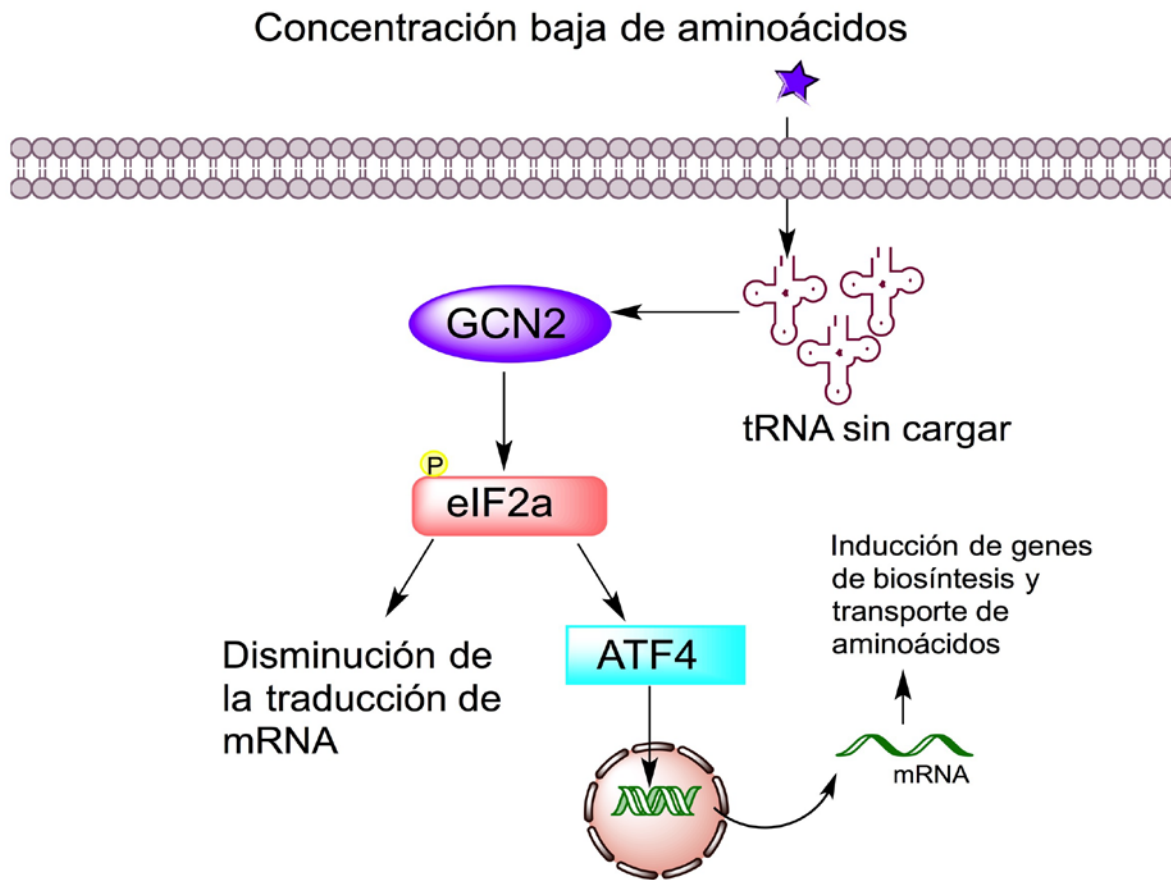


Figura 8. Ruta de señalización de GCN2
Figura original.

Proteínas vegetales

Como se mencionó anteriormente, la obtención de leche, carne y huevo genera un gran impacto ambiental (Steinfeld et al., 2006). Debido a lo anterior desde un punto de vista de sustentabilidad ecológica global las proteínas de origen vegetal representan una ventaja sobre las proteínas de origen animal, ya que las primeras requieren menos insumos de agua, tierra y energía (van Vliet et al., 2015).

Las proteínas de origen vegetal son muy heterogéneas en su perfil de aminoácidos y son deficientes en aminoácidos esenciales como lisina y metionina. La proteína de origen vegetal que más se ha estudiado es la proteína de soya, que es una leguminosa que tiene una calificación química de 1 (valor igual que la leche), es decir, cubre los requerimientos de aminoácidos esenciales para asegurar las necesidades de niños y adultos (Torres et al., 2006).

En la actualidad hay una gran cantidad de información sobre los efectos benéficos de el consumo de la proteína de soya sobre la salud tanto en ensayos clínicos como a nivel molecular (Torres et al., 2006, Velasquez y Bhathena, 2007) (Velasquez y Bhathena, 2007, Michelfelder, 2009). Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de otras fuentes de proteínas vegetales, por lo que es de interés estudiar diferentes fuentes de proteínas vegetales con el objeto de poder hacer recomendaciones adecuadas basadas en evidencias científicas ya que algunas de estas proteínas dietarias proporcionan todos los aminoácidos indispensables en cantidad suficiente para llenar el requerimiento de aminoácidos en el organismo (Young y Peller, 1994) mientras que otras no.

Para el presente estudio se utilizaron además de la caseína y proteína aislada de soya como proteínas controles, proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025, proteína de maíz, proteína aislada de chícharo, proteína aislada de ajonjolí, espirulina y la mezcla de proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz y proteína aislada de soya + proteína de maíz.

Fríjol negro

Una de las principales razones por las que se escogió al frijol negro es debido a que es la principal leguminosa que se consume en México y no se conocen los mecanismos de acción de esta leguminosa. El frijol es una planta originaria de Mesoamérica, la cual se cultiva desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles. Se considera que en total existen alrededor de 150 especies, aunque en México estas ascienden a 50, destacando las cuatro especies que el hombre ha domesticado, como son el *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari). En nuestro país, las especies más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción son las dos primeras (SIAP, 2015). Para el presente estudio se empleó proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 con un contenido de proteína de 60.92%, el proceso de obtención fue desarrollado por la Dra. Amanda Gálvez y la Dra. Amelia Farrés en la Facultad de Química de la UNAM y el proceso para obtener las cantidades suficientes para el estudio se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Quiñones Peña, 2010, Salinas Ramírez, 2014).

Maíz

El maíz (*Zea mays*) es el alimento base de nuestro país. Pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta (FAO, 1993). La importancia de los cereales en la nutrición de millones de personas de todo el mundo es ampliamente reconocida. Debido a su ingesta relativamente elevada en los países en desarrollo, no se les puede considerar sólo una fuente de energía, sino que además suministran cantidades notables de proteínas (FAO, 1993). Los granos de cereal tienen una baja concentración de proteína y la calidad de ésta es limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales, sobre todo lisina (SIAP, 2012, SIAP, 2015). En el presente estudio se

empleó “proteína de maíz libre de gluten”, que es el subproducto de la molienda húmeda del maíz en la producción del almidón, con un contenido de proteína de 59.06% (Glutimex 60%, catalogo 13890015AO, lote 4WB122, Ingredion, México).

El nombre comercial que también se utiliza para denominar a esta proteína de maíz es “gluten de maíz”, esto se debe a la similitud en el proceso al producto de trigo; pero por se de origen de maíz, no contiene la contiene la secuencia de aminoácidos del trigo y por lo tanto no causa enfermedad celiaca.

Adicionalmente a estudiar a la proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 y la proteína de maíz de manera independiente se optó por realizar una mezcla de estas dos proteínas con la finalidad de emular el consumo de estas proteínas en la dieta tradicional. El maíz junto con el frijol son la base de la dieta en México, su consumo se remonta desde la cultura prehispánica (Vargas, 2002) y se ha reportado que la combinación de estas complementa la deficiencia de aminoácidos de cada una (el frijol es deficiente en metionina y es una fuente de lisina, mientras que el maíz es deficiente en lisina y tiene un alto contenido de metionina), lo que ocasiona que su consumo aporte los aminoácidos esenciales necesarios para cubrir los requerimientos de niños y adultos (Bressani et al., 1959).

Chícharo

El chícharo (*Pisum sativum*) es otra semilla rica en proteínas que como la soya y el frijol, pertenece a la familia de las leguminosas. Al ser una leguminosa también tiene un contenido bajo de metionina y un alto contenido de arginina (Spielmann et al., 2008). De acuerdo a lo anterior y con la posible similitud con la proteína aislada soya y la proteína concentrada de frijol se optó trabajar con un aislado comercial de proteína de chícharo con un contenido de proteína de 71.58%, NUTRALYS® S85F de la empresa Roquette.

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 producido a nivel industrial en la empresa DIPASA de México quien registró el aislado con la marca Sesaprot® (López et al., 2003). 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 (Tesuo et al., 2004). La semilla blanca de ajonjolí es la que se siembra principalmente en México. Las principales zonas productoras de ajonjolí en México son Sinaloa, Sonora, Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Chiapas (SIAP, 2015).

Espirulina

La espirulina es una microalga verdeazulada multicelular con forma helicoidal y filamentos septados. Es un organismo primitivo que surgió hace 3.5 mil millones de años como una especie fotosintética, autótrofa y simbiótica con algunas bacterias en sus requerimientos de nitrógeno, tiene una pared celular con heteropolímeros sensibles a lisozima y otros sistemas enzimáticos simples (Abo-Shady et al., 1992). Este microorganismo comprende dos géneros *Spirulina* y *Arthrospira* del cual *Arthrospira maxima* y *Arthrospira platensis* son las más representativas. Aunque el género *Arthrospira* es válido hoy en día se utiliza la denominación *Spirulina* indistintamente (Tomaselli et al., 1996)

La espirulina que se empleó en el presente estudio proviene de AEH-Solarium Biotechnology, Chile y tiene un contenido de proteína de 46.67%

Justificación

A nivel mundial el crecimiento de la población, así como los cambios en los hábitos alimenticios ha incrementado la demanda de productos de origen animal, como carne, huevo y leche. Para cubrir las necesidades de los consumidores las industrias ganaderas y avícolas deben aumentar la producción de animales. Sin embargo dicho aumento tiene un alto impacto en el ambiente, ya que una enorme cantidad de recursos como: agua, suelo, energía y producción de granos se destinan a estas industrias.

En el caso del uso de suelo, la industria ganadera ocupa el 30% de la superficie libre de hielo del planeta y el 70% del suelo dedicado a la agricultura. (Steinfeld et al., 2006). En general para obtener un kilogramo de carne de res, ésta debe consumir en promedio 6.5 kg de granos y 36 kg de forraje (Hoekstra, 2008)

La producción de alimentos de origen animal requiere grandes cantidades de agua en comparación a la producción de alimentos de origen vegetal, por ejemplo la producción de un kilogramo de carne requiere 15 000 litros de agua, mientras que la producción de un kilogramo de arroz necesita 3 400 litros de agua (Hoekstra, 2008).

Debido a lo anterior desde un punto de vista de sustentabilidad ecológica global las proteínas de origen vegetal representan una ventaja sobre las proteínas de origen animal, ya que las primeras requieren menos insumos de agua, tierra y energía (van Vliet et al., 2015).

A pesar del marcado aumento en el consumo de productos de origen animal. Actualmente el 11% de la población mundial sufre de desnutrición, debido a varios factores, entre los que se pueden mencionar: bajo poder adquisitivo, enfermedades, así como la falta de orientación para conocer que alimentos pueden proporcionar los nutrimentos necesarios para evitar ésta condición.

Una estrategia para tratar la desnutrición ha sido el uso de suplementos alimenticios elaborados con mezclas de proteínas de origen vegetal (Bressani et al., 1959). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción a nivel molecular de cómo actúan éstas o si existe un sensor del tipo de proteína dietaria, por lo que en el presente estudio se proponen cuatro posibles sensores: la concentración de insulina, mTORC1, GCN2 y el transceptor SNAT2.

Lo anterior permitirá generar evidencia científica sobre el efecto benéfico del consumo de proteínas de origen vegetal, para impulsar su consumo.

Hipótesis

Si se consumen proteínas dietarias con un aporte adecuado de aminoácidos esenciales o la combinación de proteína aislada de soya + proteína de maíz y proteína concentrada de frijol + proteína de maíz entonces se favorecerá la ganancia de peso, se regulará la secreción de insulina y se activará la expresión de los posibles sensores de proteínas (SNAT2, mTORC1 y GCN2) en ratas sanas y después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

Objetivo general

Estudiar el efecto de proteínas dietarias de diferente tipo y calidad sobre la ganancia de peso y la expresión de los posibles sensores de proteínas en ratas sanas y después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

Objetivos particulares

- ◆ Evaluación del efecto de consumo de diferentes fuentes de proteínas de origen vegetal dietarias en ratas sanas sobre:
 - La ganancia de peso, consumo de alimento e índice de conversión de alimento.
 - Parámetros bioquímicos y hormonales en suero (glucosa, triglicéridos, colesterol, homocisteína, insulina y glucagon).
 - La abundancia de mRNA y de proteína de SNAT2.
 - La abundancia de proteína de GCN2.
 - La abundancia de proteína de mTORC1, S6K1 y eIF4G.
 - La abundancia de mRNA y de proteína de SREBP-1c y FASN.

- ◆ Evaluación del efecto de consumo de diferentes fuentes de proteínas de origen vegetal después de un periodo de alimentación restringida en proteína sobre:
 - La ganancia de peso, consumo de alimento e índice de conversión de alimento.
 - Parámetros bioquímicos y hormonales en suero (glucosa, triglicéridos, colesterol, albúmina, insulina y glucagon).
 - Concentración de aminoácidos en suero.
 - La abundancia de mRNA y de proteína de SNAT2.
 - La abundancia de proteína de GCN2.
 - La abundancia de proteína de mTORC1, S6K1 y eIF4G.
 - La formación de perfiles polisomales en hígado.
 - La abundancia de mRNA y de proteína de SREBP-1c y FASN.

Metodología

Fuentes de proteínas dietarias

Para el presente estudio se emplearon las siguientes fuentes de proteína dietaria:

- Caseína libre de vitaminas **(C)** marca Harlan Teklad (#cat. 160040, Madison, USA),
- Proteína aislada de soya **(S)** Supro 710 DUPON (St. Louis, MO, USA)
- Proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 **(F)** se obtuvo en la planta piloto de el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Salinas Ramírez, 2014),
- Proteína de maíz **(M)** (Glutimex 60%, catalogo 13890015AO, lote 4WB122, Ingredion, México),
- Proteína aislada de chícharo **(Ch)** (NUTRALYS® S85F, Francia).
- Espirulina **(E)** marca AEH-Solarium Biotechnology, Chile y
- Aislado de proteína de ajonjolí **(A)** marca Sesaprot® de DIPASA, México.

Caracterización de las proteínas vegetales

Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de las proteínas vegetales del estudio se realizó en el laboratorio de análisis químicos para alimentos en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Aminogramas

Para este trabajo los aminogramas se mandaron a hacer al laboratorio Silliker Ibérica.

Diseño experimental

Estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas

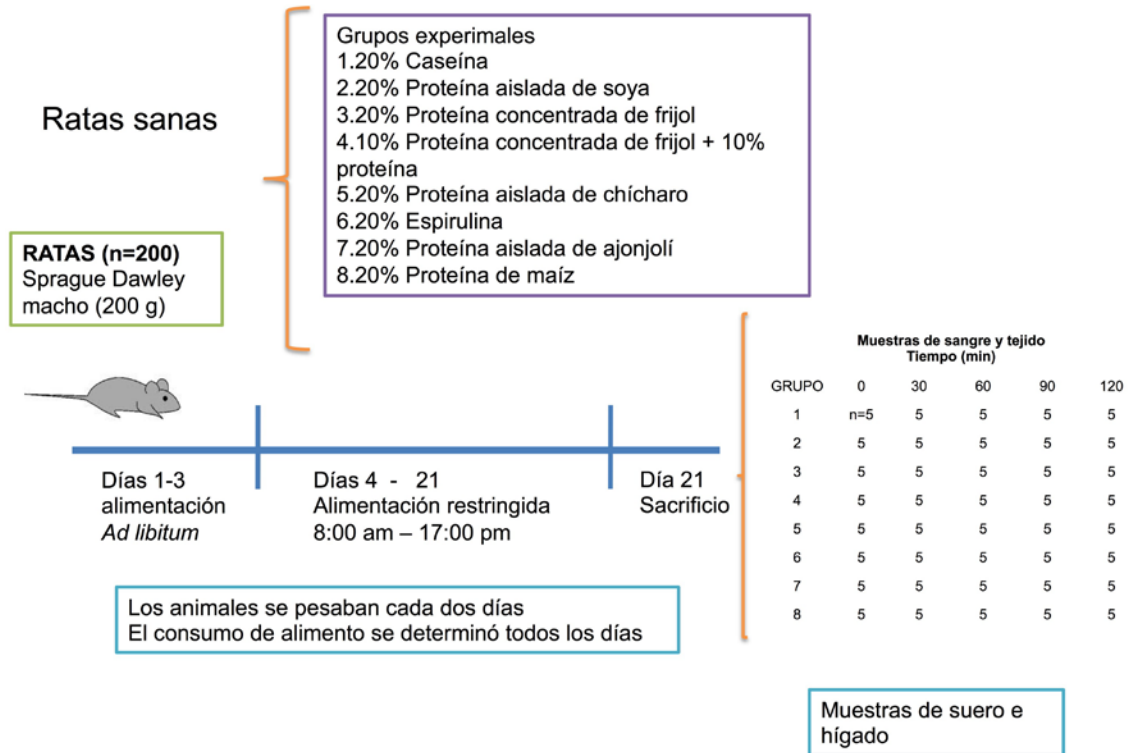


Figura 9. Diseño del estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas

El estudio tuvo una duración de 21 días. Se emplearon 25 ratas macho, con peso entre 200 – 250g, de la cepa Sprague Dawley por grupo para evaluar el efecto del tipo y calidad de la proteína dietaria en la etapa de crecimiento. Estas ratas fueron obtenidas de la compañía Harlan-UNAM. Las ratas se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en jaulas individuales con piso de malla en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. La formulación de la dieta se realizó siguiendo los lineamientos del American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993), en donde indica que el aporte adecuado de proteína para asegurar el crecimiento es de 20%. La composición de las dietas experimentales para el estudio 1 está referida en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación de dietas experimentales para el estudio 1

Ingrediente	C	S	F	FM	Ch	E	A	M	
	g/100gdieta								
Proteína	22	22	28.7	14.4	16.7	27.5	42.3	23.2	33.6
Almidón	39	39	39	36.2	37.3	33.2	38.7	35.3	
Maltodextrinas	12.6	12.7	11	10	11.1	7	12.6	8.9	
Sacarosa	9.4	9.5	7.9	6.8	8	3.8	9.5	5.7	
Aceite de soya	6.9	6.8	5.6	6.1	6.2	4	6.3	6.6	
Fibra	5	5	4.6	4.8	4.9	4.8	4.8	4.9	
Mezcla de Minerales	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1	1	1	1	1	
L-cistina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
Citrato de Colina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
TBHQ	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	
Energía, (kcal/g)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	

C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Las dietas tuvieron el mismo contenido energético y proteínico; por lo que 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 8:00 hrs y retirándola a las 17:00 hrs con la finalidad de homogenizar el horario de alimentación y los resultados de los parámetros bioquímicos y hormonales a medir en las muestras. 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. El sacrificio 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, colesterol y homocisteína). A los animales se les realizó necropsia para obtener el hígado para la extracción de RNA total y proteína. El tejido se colocó en tubos de microcentrifuga 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).

Estudio 2. Efecto de diferentes tipos de proteína después de un periodo de alimentación restringida en proteína

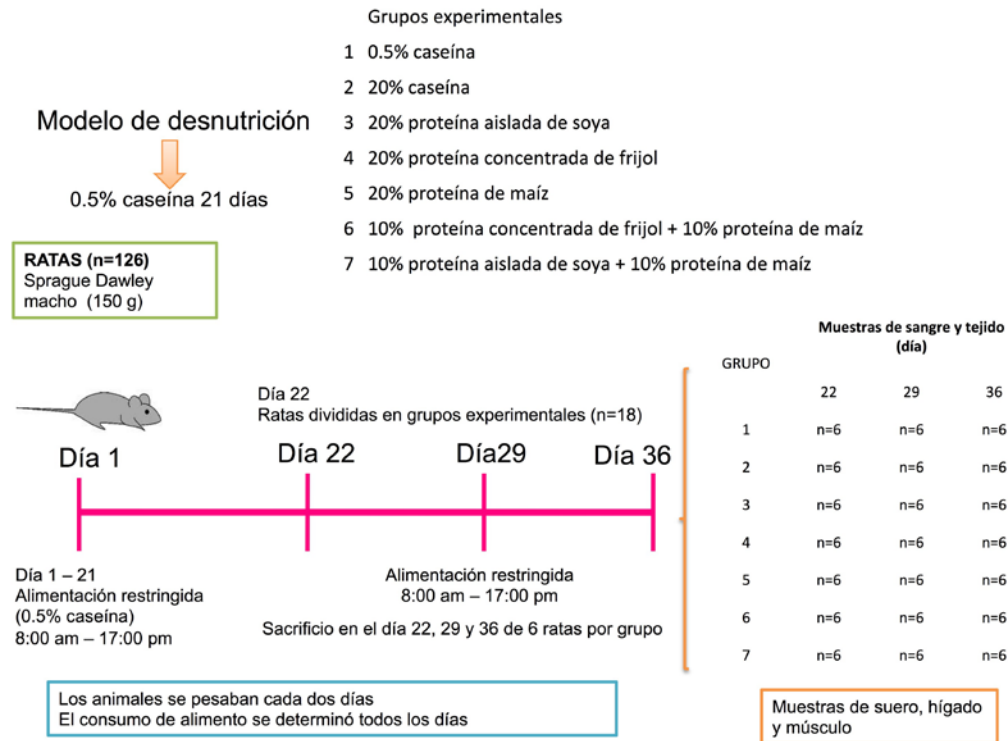


Figura 10. Diseño del estudio 2. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio 1 se realizó el diseño del estudio 2. El estudio tuvo una duración de 36 días. Se emplearon 18 ratas de la cepa Sprague Dawley por grupo, con peso entre 100 – 120g, para evaluar el efecto del tipo y calidad de la proteína dietaria después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

Las ratas se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en jaulas individuales con piso de malla en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Para la alimentación restringida en proteína se formuló una dieta con un bajo contenido de proteína (0.5% de caseína) de acuerdo a lo reportado previamente por Phillbrick en 1974 y con el mismo contenido energético que las dietas recomendadas por el American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993) para animales en crecimiento. Lo anterior para asegurar que la malnutrición de las ratas solo fuera causada por la disminución en el contenido de proteína. La composición de las dietas experimentales empleadas en el estudio 2 está referida en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulación de dietas experimentales para el estudio 2

Ingrediente	BP	C	S	F	FM		SM	M	
	g/100gdieta								
Proteína	0.55	22	22	28.7	14.4	16.7	11	16.8	33.6
Almidón	52.04	39	39	39	36.2		37.1	35.3	
Maltodextrinas	17.27	12.6	12.7	11	10		10.8	8.9	
Sacarosa	13.08	9.4	9.5	7.9	6.8		7.6	5.7	
Aceite de soya	7	6.9	6.8	5.6	6.1		6.7	6.6	
Fibra	5	5	5	4.6	4.8		4.9	4.9	
Mezcla de Minerales	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5		3.5	3.5	
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1	1		1	1	
L-cistina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		0.3	0.3	
Citrato de Colina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		0.25	0.25	
TBHQ	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014		0.014	0.014	
Energía, (kcal/g)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1		4.1	4.1	

BP: baja en proteína; C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M : proteína de maíz.

Inicialmente los animales fueron alimentados con una dieta con aporte proteico de 0.5% de caseína (**BP**) durante 21 días. El horario también fue restringido introduciendo la comida a las 8:00 hrs y retirándola a las 17:00 hrs. En el día 22 los animales se dividieron en siete grupos experimentales de los cuales, uno siguió consumiendo la dieta BP y los demás consumieron dietas con el aporte adecuado de proteína para asegurar el crecimiento, que tenían el mismo contenido energético y proteico; por lo que se ajustó la cantidad de proteína a añadir conforme a la pureza del aislado o la fuente de proteína a utilizar.

Durante el estudio se registró diariamente el consumo de alimento y la ganancia de peso se registró cada dos días. En los días 22, 29 y 36 (día 1, 7 y 14 después de consumir la dieta de recuperación) se sacrificaron seis animales por grupo una hora después de haber consumido la dieta correspondiente.

El sacrificio 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, triglicéridos, colesterol y albúmina), así como la concentración de aminoácidos en suero. A los animales se les realizó necropsia para obtener el hígado y el músculo para la extracción de RNA total y proteína. El tejido se colocó en tubos de microcentrifuga 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).

Índice de conversión de alimento

El índice de conversión de alimento, indica la eficiencia de la dieta experimental para favorecer la ganancia de peso y se determina con la siguiente fórmula (Hargrove y Alford, 1977):

$$\text{Índice de conversión de alimento} = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{consumo de alimento (g)}}$$

Determinación de parámetros bioquímicos y hormonales en suero

Las determinaciones de 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 (Unger, 1973, Kagan, 1975). Esta prueba se basa en la competencia entre un antígeno no marcado (Ag) y una cantidad conocida del antígeno marcado (Ag*) para formar complejos con una cantidad constante de anticuerpo (Ac). Con una cantidad constante de antígeno marcado (Ag*) y una cantidad constante de un anticuerpo para ese antígeno (Ac), se produce la reacción antígeno (Ag*) anticuerpo (Ac), se separa la fracción de antígeno que se ha unido de la que permanece libre, se determina la radioactividad a través de un contador de gamas (Quantum D5002, Packard, Lumant, USA) (Anexo 1).

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 glucosa se oxidó por acción de la glucosa oxidasa y se produjo D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno, el cual pasa a través de una membrana de celulosa a un electrodo de platino. La concentración de colesterol se determinó con la prueba enzimática fotométrica CHOD-PAD (Cholesterol FS, Diagnostic System International, #cat: 11300, 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. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol y se midió espectrofotométricamente a 500nm (Rifai et al., 2000) (Anexo 1).

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, #cat:15710, 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. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos y se midió espectrofotométricamente a 500nm (Rifai et al., 2000) (Anexo 1).

La homocisteína se cuantificó por el AxSyM Homocysteine Assay del laboratorio Abbott (#cat: 5F51-20, 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 (SAH). Se cuantifica la luz polarizada fluorescente producida de la unión de SAH con su anticuerpo específico en el equipo Abbott AxSYM System (Anexo 1).

Obtención de mRNA

La obtención del RNA total de hígado y músculo se realizó a través de una modificación del método de cloroformo-fenol-tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) utilizando TRIzol (#cat: 15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El TRIzol es una solución monofásica de fenol-isotiocianato de guanidina que permite aislar RNA total de alta calidad en menos de una hora. Las muestras se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). *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% (Masek et al., 2005). Posteriormente se visualizó el gel en un transiluminador y se tomó la fotografía del gel (Kodak Digital Imaging) en donde se observaron dos bandas que corresponden al RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S rRNA. La banda de 28S rRNA es aproximadamente el doble de tamaño de la banda 18S rRNA, esta relación 2:1 indica que el RNA está integro (Anexo 1).

PCR en tiempo real cuantitativo (RT-PCR)

Para el análisis del contenido de mRNA es necesario sinterizar el transcrito reverso (RT) a partir RNA total de hígado (Baltimore, 1970, Temin y Mizutani, 1970). Se realizó por PCR en tiempo real (Nolan et al., 2006) usando ensayos fluorogénicos Taqman de Applied BioSystems cuyos números de identificación aparecen en la Tabla 3 y el equipo ABI Prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, User Bulletin no 2). Para el estudio de desnutrición se emplearon sondas SYBR Green I® cuyas secuencias aparecen en la Tabla 3 y el equipo Light Cycler® 48011 de Roche. Las muestras se corrieron por triplicado, cada una con 10ng del producto de la transcripción reversa en placas ópticas de 96 pozos.

El protocolo de PCR empleando fue : 50°C por dos minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y por último 60°C por un minuto (Diaz-Villasenor et al., 2013). Se detectó la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el software de análisis representó dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. Se empleó el gen de la β -actina como el gen control, debido a que estudios previos demostraron su eficiencia como gen estructural (Moran-Ramos et al., 2012).

En la curva de amplificación se determinó el ciclo al corte (Ct) y se determinó la cantidad relativa de mRNA usando el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001), la cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de mRNA iniciales (Anexo 1).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos empleados en los estudios

Ensayos flourogénicos Taqman	Número de identificación
SREBP1C	<i>Rn01495769_m1</i>
FASN	<i>Rn00569117_m1</i>
ACTIN	<i>Rn00667869_m1</i>
Primers SYBR® Premix	Secuencia
mTOR_F	GAGATGAGGAAGTGGGTGGA
mTOR_R	GCAGCACTTCAAGCAGAGTG
Rps6ka2_F	ATACCCCGAGGAGATTCTG
Rps6ka2_R	AGATGGACGTCCTGTCTGCT
EIF4g1_F	CTGTGGGTGACCTTCTCGAT
EIF4g2_R	AGTCCCAGGTTTCCTCTGCT
rActinaB_F	CCTCTTTGCATGTCTCACTC
rActinaB_R	AATGTCACGCACGATTTCC

Análisis de proteínas por Western blot

Se extrajo la proteína de hígado y músculo con buffer de lisis RIPA con inhibidor de proteasas Complete (#cat: 11836153001, Roche Applied Science, Indiana, USA). Aproximadamente 500mg de tejido se homogeneizó con buffer de lisis RIPA activado (Anexo 1) durante un minuto a 4°C con un homogeneizador manual (Pellet Pestle - Cordless motor, #cat Z359971, Sigma Aldrich). El homogeneizado se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante (Peach et al., 2015).

Posteriormente se determinó la concentración de proteína de cada muestra por el método de Lowry con el ensayo de proteína DC (DC Protein Assay, #cat 5000116, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), se utilizó albúmina sérica bovina como estándar de concentración para la curva de referencia, se determinó la concentración de proteína a 750 nm mediante un espectrofotómetro (Beckman DU modelo 640) (Olson, 2016).

Para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular se utilizaron geles de acrilamida. Se cargaron 10 μ L de la muestra y 10 μ L de Buffer de cargado+ β -mercaptoetanol a cada pozo y se corrió el gel 30 min a 75V y 2:30 hrs a 100V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF Hybond-P, #cat: RPN2020F, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) por electrotransferencia (100V por 60 minutos) y se bloquearon mediante la incubación con leche descremada al 5%. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y una hora más a temperatura ambiente, en la Tabla 4 se indican los anticuerpos empleados. Finalmente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 1hr y las bandas se visualizaron con un reactivo quimio luminiscente (ECL Inmobilon Wester, #cat: WBKLS0100, Millipore, Billerica, MA, USA), la imagen se adquirió a través del equipo ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Kurien y Scofield, 2015).

La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ (ImageJ, 1.48v, NIH, Bethesda, MD, USA), la expresión de cada proteína analizada se normalizó con γ -Tubulina ó β -actina (Anexo 1).

Tabla 4. Anticuerpos empleados en los estudios

Proteína	Dilución empleada	Marca	Número de catálogo
SREBP-1c	1:250	Santa cruz, (CA, USA)	Sc-20140
FAS	1:1000	Santa cruz, (CA, USA)	Sc-366
mTOR	1:1000	Cell signaling, (MA, USA)	2972
p-mTOR (S 2481)	1:1000	Cell signaling, (MA, USA)	2974
SNAT2	1:800	Santa cruz, (CA, USA)	Sc-67081
S6K1	1:3000	Santa cruz, (CA, USA)	Sc-230
p-S6K1(T 389)	1:1000	Santa cruz, (CA, USA)	Sc-11759
GCN2	1:1000	Cell signaling, (MA, USA)	3302
eIF2 α	1:6000	Cell signaling, (MA, USA)	9722
p-eIF2 α (S 51)	1:500	Cell signaling, (MA, USA)	3597
eIF4G	1:1000	Cell signaling, (MA, USA)	2498
β -actina	1:1000	Santa Cruz, (CA, USA)	Sc-1615
γ -Tubulina	1:1000	Santa Cruz, (CA, USA)	Sc-7396

Se eligió medir la fosforilación de mTOR en la serina 2481, ya que esta se da por la autofosforilación de mTOR, lo que se relaciona con la actividad catalítica de mTOR (Vazquez-Martin et al., 2012). En el caso de S6K1 esta cinasa su actividad se controla por varias fosforilaciones, se decidió medir la fosforilación en la treonina 389 por que se correlaciona con su actividad *in vivo* (Weng et al., 1998). Por último en el caso de eIF2 α su fosforilación en la serina 51 se relaciona con la disminución en el inicio de la traducción en condiciones de estrés (Deval et al., 2009).

Análisis de perfiles polisomales

Para determinar los perfiles polisomales se hicieron modificaciones a técnica reportada por Coudert en el 2014, fragmentos de hígado (400 - 500mg) se homogeneizaron en 2 mL de buffer de lisis [20mM Tris HCl pH7.4, 150 mM NaCl,

5mM MgCl₂, 20U/mL RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #cat 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals)] con homogeneizador Dounce (Dounce tissue grinder, #cat D8938, Sigma) en hielo.

El homogeneizado se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante se resuspendió hasta un volumen de 8 mL con buffer de lisis adicionado con 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio y se cargó sobre un colchón de 50% de sacarosa [20mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5 U/mL RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #cat. 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals)] y se centrifugó durante dos horas a 35 000 rpm empleando el rotor TH-641 para ultracentrífuga Sorvall a 4°C, este paso se realiza con la finalidad de concentrar los polisomas.

La pastilla resultante se re suspende en 1 mL de buffer de lisis adicionado con 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio y se deja incubar en hielo 30 minutos antes de cargar en los gradientes de sacarosa. Se hicieron gradientes de sacarosa del 15% al 55% en tubos de polialómero de 13 mL (20mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5 U/mL RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA #cat. 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals)).

Para el hacer el gradiente de sacarosa se empleó el generador de gradientes Teledyne Isco Modelo 160, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se conservaron los gradientes a 4°C hasta su uso. Se cuantificó la concentración de RNA presente en el extracto usando un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer), se cargaron 10 unidades OD₂₆₀ del extracto en el gradiente de sacarosa y se centrifugó a 37 000 rpm durante dos horas y media empleando el rotor TH-641 para ultracentrífuga Sorvall a 4°C.

Los gradientes se fraccionaron con el sistema automatizado de fraccionamiento por densidad acoplado a un espectrofotómetro a 254 nm, con una solución de sacarosa al 60% [20mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5 U/mL RNaseOUT™ (Invitrogen #cat 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas

(Mini Complete, Roche Biochemicals] adicionada con glicerol al 10% para aumentar su densidad. En paralelo al fraccionamiento del gradiente el perfil de polisomas se imprimió en papel gráfico. Se determinó el área bajo la curva de los perfiles con el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Coudert et al., 2014).

Determinación de aminoácidos en suero

Se determinó la concentración de aminoácidos en el plasma por triplicado mediante HPLC (Henderson et al., 2000). Un total de 150 μ l de plasma se mezcló con 38 μ l de ácido tricloroacético, se incubaron durante 30 min a 4 ° C y se centrifugó a 4 ° C a 13500 rpm durante 12 min. El sobrenadante se utilizó para la derivatización de aminoácidos con OPA (o- ftalaldehído) y FMOC (9 - fluorenilmetilcloroformato) una muestra se inyectó a una columna analítica Agilent ZORBAX Eclipse AAA 4,6 x 150 mm, 5 micras acoplado a un detector de fluorescencia a 340 nm de excitación y 450 nm de emisión (Agilent G1321B). Para el análisis, se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity acoplado a una bomba binaria (Agilent G1312B) y un muestreador automático robótico (Agilent G1367B) .

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

Caracterización de las proteínas vegetales

Análisis químico proximal

En la Tabla 5, se presenta el análisis químico proximal de las fuentes de proteínas empleadas en el presente estudio.

Tabla 5. Análisis químico proximal de los diferentes tipos de proteínas

COMPONENTE (%)	PROTEÍNA						
	C	S	F	Ch	E	A	M
Humedad	6.3	5.5	8.52	6.4	6.58	4.24	10.66
Proteína	90.5	90	60.92	71.58	46.67	84.54	59.06
Grasa	0.1	0.5	0.12	2.58	6.89	2.61	1
Cenizas	1.9	4.5	6.04	5.35	3.08	8.25	2.13
Fibra cruda	0	0	0.45	0.13	4.12	0.35	0.25
Hidratos de carbono	1.1	0	23.95	13.95	32.66	0.01	26.9

C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Aminogramas

Es importante conocer el perfil de aminoácidos de las fuentes proteínicas ya que su contenido puede indicar su posible efecto sobre la expresión de genes de transportadores de aminoácidos, de factores de transcripción y de proteínas involucradas en la transducción de señales. En la Tabla 6 se presenta el contenido de aminoácidos de cada proteína, en donde se comparan con los valores estándar de la FAO para la proteína ideal para la alimentación de preescolares.

Tabla 6. Aminogramas de los diferentes tipos de proteínas

AMINOÁCIDOS	PROTEÍNAS									
	FAO	C	S	F	FM	SM	Ch	E	A	M
	mg/ g proteína									
Ácido Aspártico		74.0	115.7	151.8	108.4	100.2	139.6	62	92.0	76.5
Ácido Glutámico		224.7	187.8	164.5	187.7	214.1	202.7	91.8	224.5	254.3
Serina		58.9	55.6	86.3	69.7	60.9	65.9	32.9	55.4	69.1
Histidina	19	26.6	24.8	29.9	24.3	24.1	28.5	10.8	26.7	23.0
Glicina		19.3	41.0	47.6	37.8	38.6	48.1	31.1	54.8	35.0
Treonina	34	44.7	38.1	59.1	45.2	39.2	42.1	31.8	39.0	40.8
Arginina		37.3	76.3	70.3	51.0	62.8	104.4	43.2	149.4	42.2
Alanina		32.0	43.2	53.8	68.3	68.1	51.3	49	52.4	106.0
Valina	35	56.8	39.0	57.5	47.8	42.1	49.3	31.7	40.8	46.7
Metionina + cistina	25	29.4	23.2	20.7	28.7	33.0	18.3	19.9	53.0	47.9
Fenilalanina + tirosina	63	114.1	91.1	129.2	116.7	117.1	106.6	58.4	97.6	143.1
Metionina		26.2	12.7	14.0	18.8	20.4	9.4	13.8	34.1	28.1
Isoleucina	28	45.5	38.4	50.6	43.0	39.3	44.3	28.1	33.4	40.6
Leucina	66	95.6	77.0	104.4	130.4	122.6	94.9	54.3	72.5	192.0
Lisina	58	77.7	61.1	78.1	47.2	44.7	81.3	27.4	24.5	19.8
Prolina		116.4	54.1	49.9	73.8	78.4	52.1	24.4	41.3	115.3
Triptófano	11	12.4	12.0	15.6	10.3	10.3	10.2	6.9	16.4	7.6
Lys /Arg		2.08	0.80	1.11	0.92	0.71	0.78	0.63	0.16	0.47
Calificación química [§]		100	93	82	81	77	73	47	42	34

FAO: requerimiento de aminoácidos para preescolares. C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz. En negritas se indican los aminoácidos esenciales. [§] La calificación química de las proteínas dietarias se calculó empleando la siguiente formula:

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido en 1 g de proteína}}{\text{mg de aminoácido en 1 g de referencia}} \times 100$$

Como se puede observar en la Tabla 6, A, M y E son altamente deficientes en lisina (24.5 mg/g proteína, 19.8 mg/g proteína y 27.4 mg/ g proteína respectivamente), esta deficiencia se puede reflejar en un menor crecimiento.

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, Ball et al., 2007). S, F y Ch son ligeramente deficientes en aminoácidos azufrados (23.2mg/g proteína, 18.3 mg/g proteína, 20.7 mg/g proteína respectivamente) y adicionalmente Ch es deficiente el triptófano (10.2 mg/g proteína).

En el presente estudio se van a emplear dos mezclas de proteínas, FM y SM. Se eligieron estas combinaciones debido a los antecedentes históricos de su consumo. En particular en México la combinación de maíz y frijol data desde la época prehispánica (Vargas, 2002). Adicionalmente estudios realizados en la década de los 50's demostraron que la combinación de leguminosas y cereales complementa la deficiencia de aminoácidos esenciales de cada fuente se cubre favoreciendo la ganancia de peso y crecimiento (Bressani et al., 1958, Scrimshaw et al., 1958).

Por lo tanto, al combinar la proteína de aislada soya o la proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 con la proteína de maíz (SM y FM), estas proteínas se complementan entre sí lo que favorecerá el crecimiento de los animales de experimentación.

En la Tabla 7 se presenta el comparativo del perfil de aminoácidos de frijol negro crudo y la proteína concentrada de dicha variedad: INIFAP-8025. La finalidad de la obtención de la proteína concentrada fue obtener un módulo proteico de mayor concentración que permitiera realizar los estudios que requieran una concentración de proteína de 20% como el presente estudio. De otra forma es imposible lograrlo, por que el frijol crudo tiene un contenido de proteína de 17% aproximadamente.

Tabla 7. Comparativo del perfil de aminoácidos de proteína concentrada de frijol vs frijol crudo entero

AMINOÁCIDOS	FAO	PROTEÍNA	FRIJOL
		CONCENTRADA DE FRIJOL	CRUDO ENTERO*
		mg/ g proteína	
Ácido Aspártico		151.8	121.0
Ácido Glutámico		164.5	152.5
Serina		86.3	54.4
Histidina	19	29.9	27.8
Glicina		47.6	39.0
Treonina	34	59.1	42.1
Arginina		70.3	61.9
Alanina		53.8	41.9
Valina	35	57.5	52.3
Metionina + cistina	25	20.7	25.9
Fenilalanina + tirosina	63	129.2	82.2
Isoleucina	28	50.6	44.2
Leucina	66	104.4	79.9
Lisina	58	78.1	68.7
Prolina		49.9	42.4
Triptófano	11	15.6	11.9
Calificación química		82.0	67.0

*Fuente : Salinas, 2014

En negritas se indican los aminoácidos esenciales. FAO: requerimiento de aminoácidos para preescolares.

Como se puede observar en la Tabla 7, la comparación del perfil de aminoácidos el concentrado de proteína de frijol negro tiene un incremento en el contenido de la mayoría de los aminoácidos esenciales con excepción de los aminoácidos azufrados que presentan una ligera disminución, sin embargo es importante resaltar que el concentrado de proteína de frijol tiene una calificación química mayor a la del frijol crudo. El buen perfil de aminoácidos esenciales presentes en el concentrado de proteína de frijol se atribuye al proceso de concentración.

Estudio 1. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas en ratas sanas

Ganancia de peso y consumo de alimento

En la Figura 11A y B se presenta el consumo de las dietas experimentales en donde se observa que las ratas que presentaron el menor consumo de alimento fueron las alimentadas con A (14.2 ± 0.4 g/día), mientras que las que consumieron la mayor cantidad de alimento fueron las alimentadas con C, S, F y E (19.0 ± 0.9 g/día, 16.8 ± 0.8 g/día, 17.4 ± 0.4 g/día y 16.0 ± 0.7 g/día respectivamente). Las diferencias en el consumo de alimento se deben a la deficiencia de aminoácidos esenciales, se ha reportado que los omnívoros consumen una menor cantidad de alimento cuando hay deficiencia aminoácidos (Harper et al., 1970, Canfield y Chytil, 1978, Ball et al., 2007).

La falta de aminoácidos esenciales en la dieta se identifica en el cerebro, después que se ingiere un alimento la información del estómago se transmite al cerebro a través de las fibras aferentes vagales (Tsurugizawa et al., 2014). Se ha propuesto que el núcleo arqueado del hipotálamo es el posible sitio en donde se detecta la deficiencia de nutrimentos y que la proteína GCN2 a través de su blanco eIF2 α está involucrado en el rechazo de las dietas cuando hay deficiencia de aminoácidos esenciales (Maurin et al., 2014).

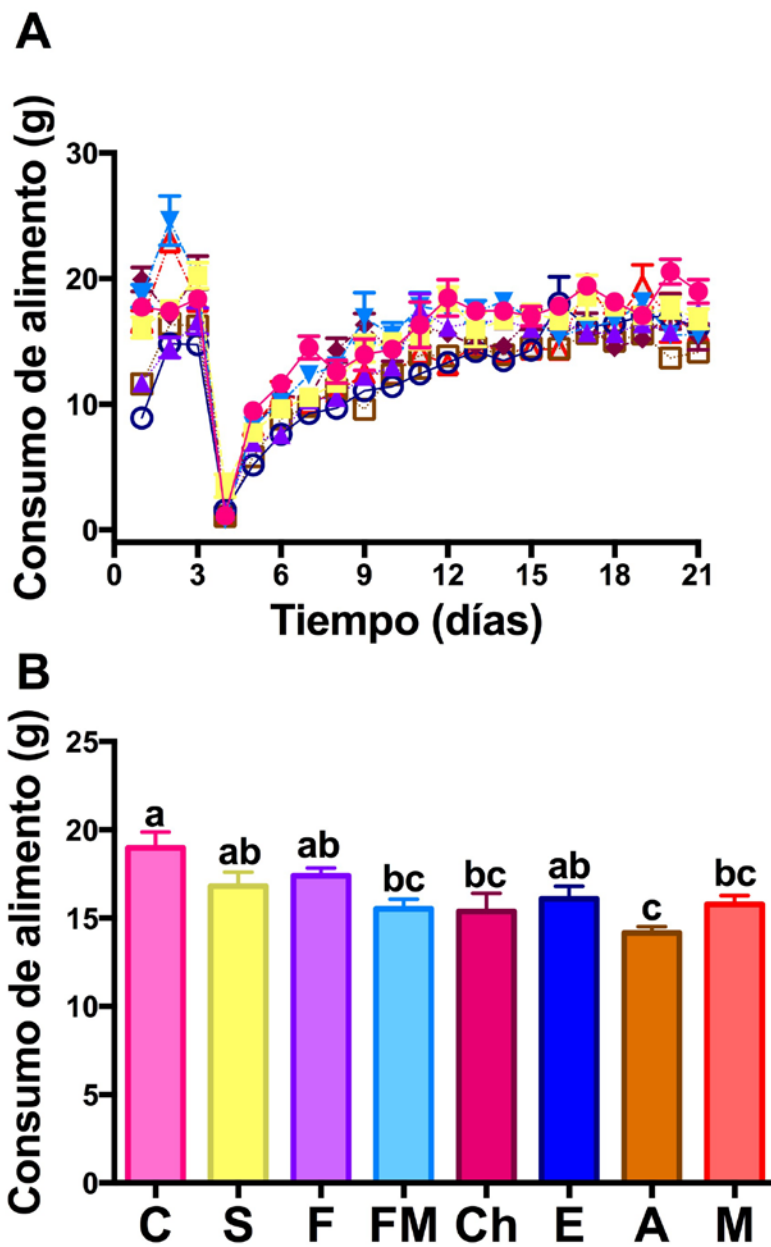


Figura 11. Consumo de alimento de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas

(A) consumo de alimento, (B) consumo de alimento promedio. Los valores son las medias \pm el ESM $n=25$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c>d$), $P<0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí; M: proteína de maíz.

En la Figura 12A se presenta la curva de ganancia de peso en donde se observa que durante el tiempo de alimentación *ad libitum* los animales aumentaron de peso el cual pierden al iniciar la alimentación en horario restringido (día 4).

Como se puede observar en la Figura 12A y B, después de adaptarse al periodo de alimentación impuesto los animales comienzan a ganar peso, efecto que para las ratas alimentadas con A, M y E sucedió en un tiempo mayor a cinco días, mientras que las ratas alimentadas con C, S, FM , F y Ch ocurrió en un tiempo menor a tres días.

En la Figura 12C se presenta la ganancia de peso en el día 21 de cada grupo experimental, las ratas alimentadas con E, A y M presentan la menor ganancia de peso de todos los grupos experimentales (3.2 g/día, 2.9 g/día y 2.2 g/día respectivamente), mientras que los grupos alimentados con C, Ch y FM (3.8 g/día, 4.0 g/día y 3.4 g/día respectivamente).

Lo anterior indica que la calidad de la proteína dietaria tiene efectos importantes en el desarrollo de animales en la etapa de crecimiento, y que al combinar una proteína de mala calidad como es el caso de la proteína de maíz con una de buena calidad como la proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025, se complementan entre si ocasionando que los animales alimentados con esta mezcla de proteínas presenten un crecimiento similar al de animales alimentados con caseína.

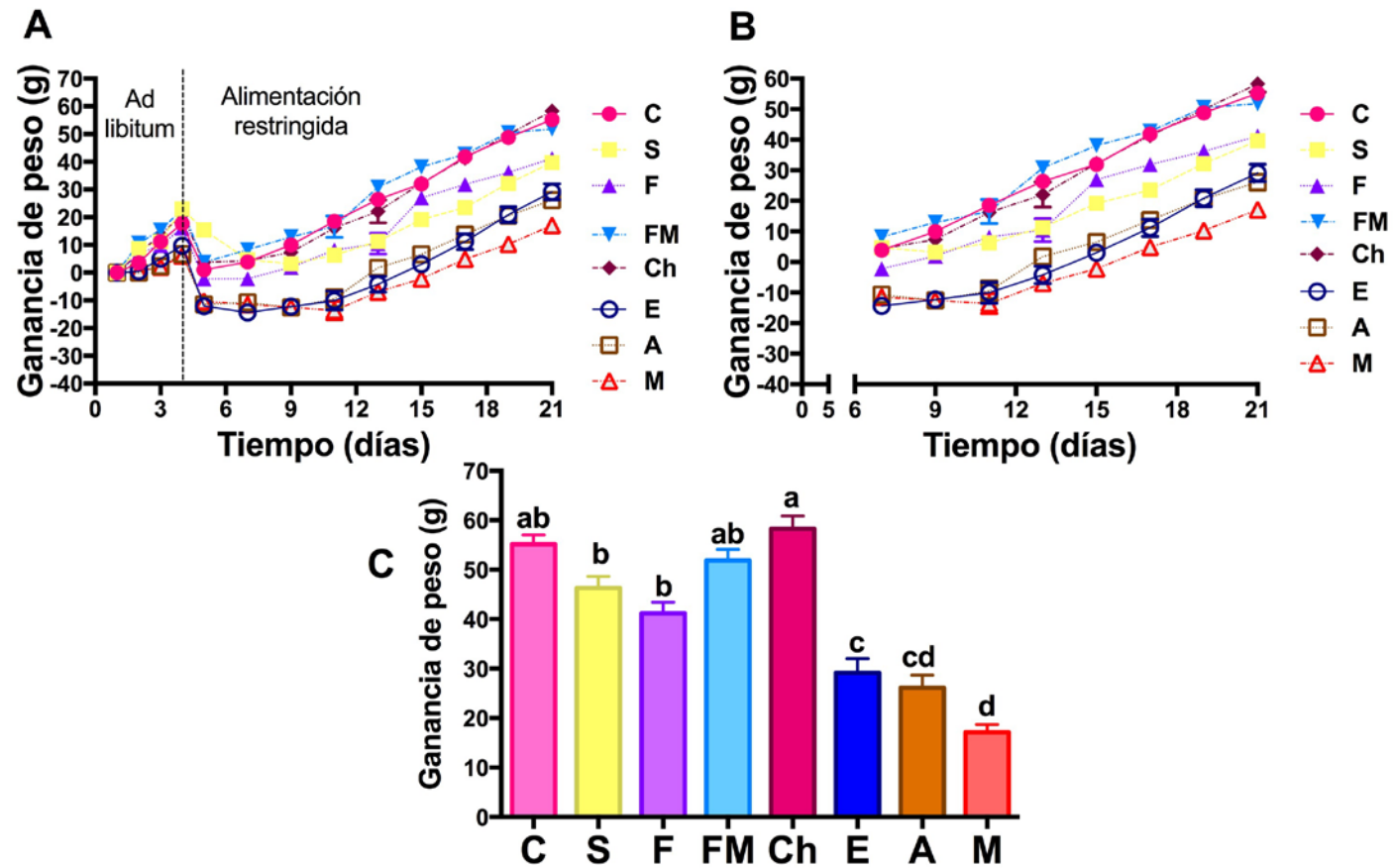


Figura 12. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas (A) curva de ganancia de peso, (B) sección lineal de la curva de ganancia de peso, (C) ganancia de peso al día 21. Los valores son las medias \pm el ESM $n=25$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c>d$), $P<0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Índice de conversión de alimento en ratas sanas

Se determinó el índice de conversión de alimento y como se puede observar en la Figura 13, las ratas alimentadas con Ch y FM presentan el mayor índice ($P < 0.05$), mientras que las ratas alimentadas con E, A ó M presentan el menor índice de conversión. El índice de conversión de alimento indica la eficiencia de la dieta experimental para favorecer la ganancia de peso de los animales, por lo tanto los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en la ganancia de peso, es decir, las ratas alimentadas con fuentes de proteínas que aportan aminoácidos esenciales en cantidad suficiente favorecen la ganancia de peso a través de un mayor índice de conversión de alimento.

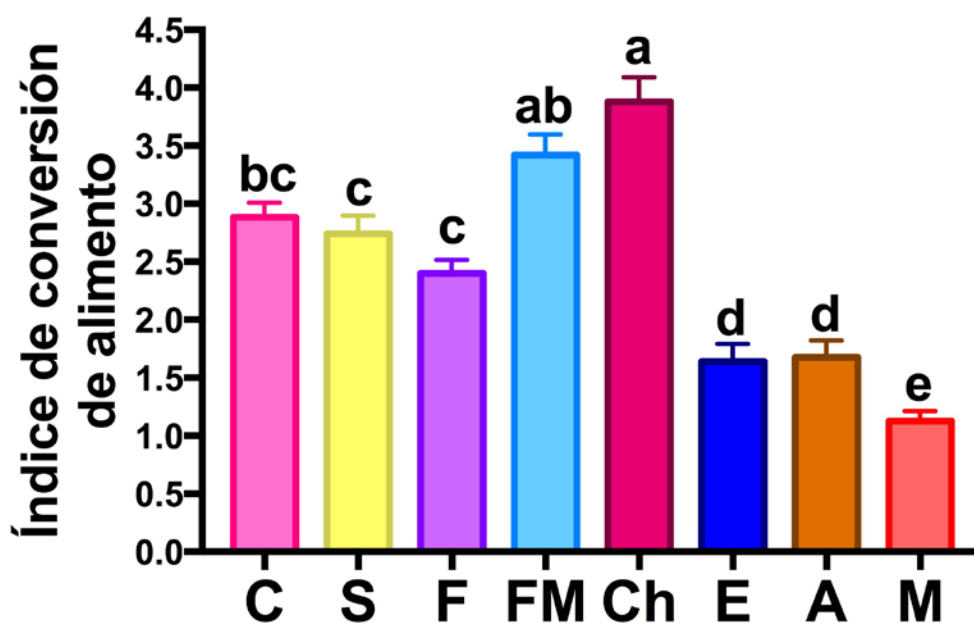


Figura 13. Índice de conversión de alimento

Los valores son las medias \pm el ESM $n=25$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a > b > c > d$), $P < 0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Parámetros bioquímicos 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 (Tabla 8).

Tabla 8. Valores normales de diferentes parámetros bioquímicos en ratas

Parámetro bioquímico	Intervalo
Glucosa	80 – 150 mg/dL
Insulina ¹	87.5 – 350 pmol/L
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 y Lanner, 1973). 2 (Rifai, 1999) . 3 (Sánchez et al., 2009).

Colesterol, triglicéridos, glucosa, insulina y glucagon en suero

En la Tabla 9 se presentan los parámetros bioquímicos de ratas sanas alimentadas durante una hora con los diferentes tipos de proteínas dietarias y como se puede observar todos los parámetros bioquímicos se encuentran dentro del rango normal.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos de ratas sanas alimentadas con diferentes tipos de proteínas

Parámetro bioquímico	C	S	F	FM	Ch	E	A	M
Glucosa, (mmol/L)	7.2 ± 0.3 ^{ab}	6.8 ± 0.2 ^b	6.2 ± 0.2 ^b	7.0 ± 0.1 ^{ab}	7.9 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.4 ^b	7.4 ± 0.2 ^a	7.5 ± 0.2 ^a
Triglicéridos, (mmol/L)	0.28 ± 0.1 ^b	0.51 ± 0.1 ^{a^b}	0.5 ± 0.1 ^{a^b}	0.61 ± 0.1 ^{ab}	0.58 ± 0.1 ^{ab}	0.71 ± 0.1 ^a	0.40 ± 0.1 ^{a^b}	0.63 ± 0.1 ^{ab}
Colesterol, (mmol/L)	1.64 ± 0.50 ^b	1.60 ± 0.06 ^b	1.54 ± 0.05 ^b	1.77 ± 0.12 ^b	1.58 ± 0.07 ^b	1.79 ± 0.07 ^a	2.11 ± 0.10 ^a	2.14 ± 0.06 ^a
Insulina, (pmol/L)	269.9 ± 5 ^a	158.7 ± 4 ^{cd}	55.8 ± 6 ^e	160.5 ± 6 ^c	167.0 ± 6 ^c	168.4 ± 6 ^c	204.7 ± 7 ^b	134.0 ± 4 ^d
Glucagon, (ng/L)	75.3 ± 2 ^{bc}	70.1 ± 1 ^{bc}	103.3 ± 2.4 ^a	70.3 ± 4 ^{bc}	74.6 ± 3 ^{bc}	65.2 ± 5 ^c	44.9 ± 3 ^d	86.4 ± 6 ^b
Insulina/ Glucagon	3.8 ± 0.3 ^a	2.3 ± 0.1 ^{bc}	0.6 ± 0.1 ^d	2.2 ± 0.1 ^{bc}	2.3 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.3 ^a	1.5 ± 0.1 ^{cd}

C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz. Los valores son la media ± SEM, n=5 por grupo experimental. Medias en una fila sin letra común difieren entre sí , $P < 0.05$. Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se uso prueba Tukey como post-hoc

Los parámetros bioquímicos se encuentran dentro de valores normales, sin embargo es importante resaltar que las ratas alimentadas con Ch, considerada una fuente de proteína de buena calidad, A y M presentan la mayor concentración de glucosa en suero ($P < 0.05$) después de 60 minutos de consumir las dietas experimentales, lo anterior probablemente se deba al contenido de alanina y ácido glutámico (aminoácidos glucogénicos) de las dietas, ya que estos aminoácidos están involucrados en el Ciclo de Cahill o ciclo alanina-glucosa (Horton et al., 2008).

Debido a lo anterior, no se optó por continuar trabajando con las proteínas aisladas de chícharo y ajonjolí en el estudio de recuperación proteica después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

La proteína de soya regula la secreción pancreática de insulina, evitando la hiperinsulinemia, mientras que las proteínas de origen animal favorecen la secreción de insulina (Noriega-Lopez et al., 2007), sin embargo la proteína aislada de ajonjolí incrementa la secreción de insulina significativamente en relación a las demás proteínas de origen vegetal, lo que indicaría que probablemente la secreción de insulina se debe al patrón de aminoácidos y no al tipo de proteína dietaria.

Se determinó la relación insulina/glucagon, debido a evidencia previa que demuestra que una relación elevada insulina/glucagon favorece la expresión de genes lipogénicos (Torres et al., 2006). Las ratas que consumieron F presentan la menor relación insulina/glucagon ($P < 0.05$), mientras que las ratas alimentadas con C y A presentan la mayor relación insulina/glucagon ($P < 0.05$) lo que indicaría que probablemente estas últimas presenten una mayor expresión de genes lipogénicos.

Homocisteína en suero

Estudios previos realizados en el grupo de trabajo de la Dra. Nimbe Torres y el Dr. Armando Tovar han demostrado que el consumo de proteína de soya reduce la concentración de homocisteína en suero, debido a que el aminoácido limitante en la soya es la metionina (Tovar et al., 2002).

La homocisteína se obtiene a partir del metabolismo de la metionina. La homocisteína es metabolizada a través de dos posibles vías: la remetilación y la transulfuración. La vía de la remetilación permite la recuperación de metionina, mientras que la transulfuración permite la síntesis de cisteína (Menéndez y Fernández-Britto, 1999, Ford et al., 2002). Concentraciones mayores a 12 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína en suero, se consideran como factor aterogénico en diversas patologías (Sánchez et al., 2009).

En la Figura 14 se presenta la concentración de homocisteína en suero en donde se observa que las ratas alimentadas con caseína presentaron la mayor concentración de homocisteína a los diferentes tiempos presentando una concentración mayor a 15 $\mu\text{mol/L}$ en los tiempos 90 y 120, lo que se considera como hiperhomocisteinemia, la cual se relaciona con la prevalencia de aterosclerosis. Mientras que el resto de las ratas alimentadas con las proteínas de origen vegetal, independientemente de su calidad, presentaron una concentración baja de homocisteína en suero. Esto indica que las proteínas de origen vegetal evaluadas, al tener un menor contenido de aminoácidos azufrados presentan menor riesgo aterogénico en comparación a la caseína.

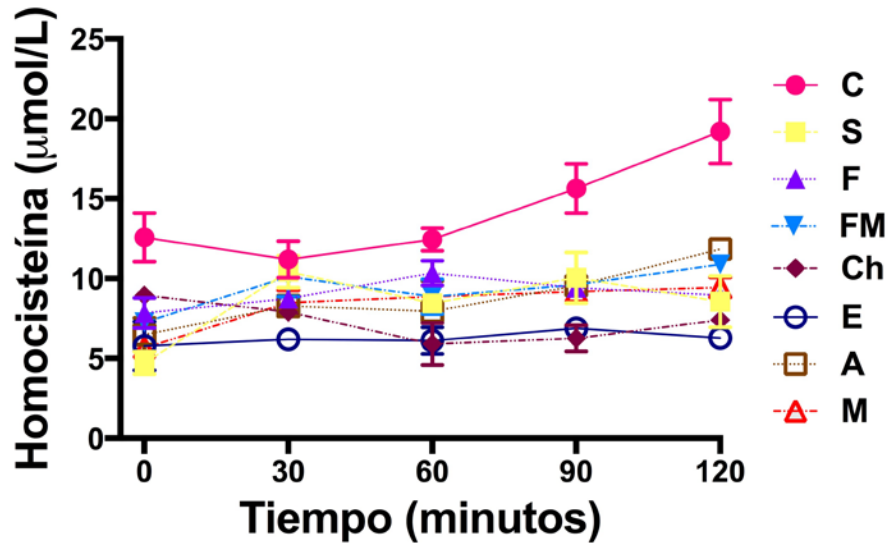


Figura 14. Concentración de homocisteína en suero ($\mu\text{mol/L}$) de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas

Los valores son las medias \pm ESM $n=5$ por tiempo experimental. C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Abundancia de mRNA y proteína

Actualmente se conoce cuáles son los sensores de hidratos de carbono, ácidos grasos y otros nutrimentos en la célula. Sin embargo aún no se sabe con exactitud cuál es el posible sensor de proteínas, por lo que en el presente estudio se propuso el estudio de cuatro posibles candidatos: cambios en la concentración de parámetros hormonales, cambios en la expresión de el transceptor de aminoácidos SNAT2, la ruta de señalización de mTORC1 y la expresión de GCN2.

Expresión de SNAT2

Se determinó la expresión del transceptor de aminoácidos SNAT2 en el hígado de las ratas alimentadas con los diferentes tipos de proteínas dietarias. La expresión de SNAT2 aumenta cuando hay deficiencia de aminoácidos (Broer, 2014).

En la Figura 15 se presenta el Western blot representativo de SNAT2. En la Figura 16A y B se observa que la abundancia de mRNA y la abundancia de proteína de

SNAT2 no se modifica por el tipo de tratamiento experimental, sin embargo al realizar un promedio de la abundancia de mRNA y proteína de todos los tratamientos dietarios se nota que la expresión de SNAT2 tiende a incrementar en el ayuno y a disminuir en postprandio (Figura 16B y D).

Lo anterior indica que el transceptor de aminoácidos SNAT2 tiene una regulación adaptativa al estado nutricional (Tanaka et al., 2005), es decir, su expresión incrementa en ayuno y disminuye en postprandio sin importar el tipo de proteína dietaria que se consuma.

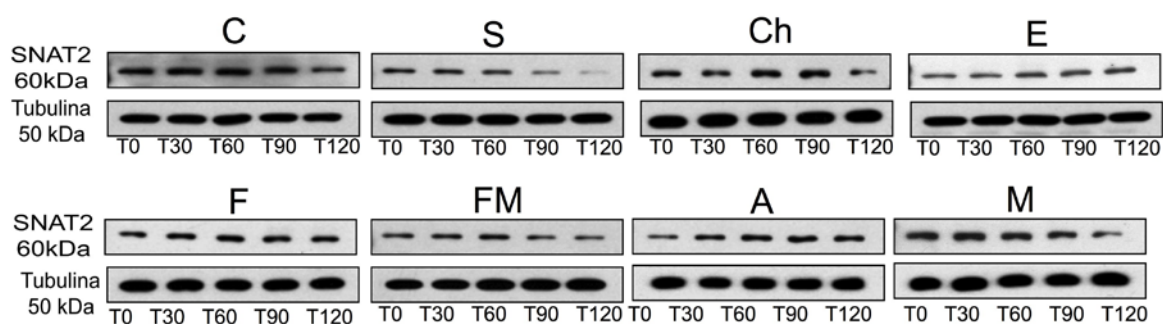


Figura 15. Western blot representativo de SNAT2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas

C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

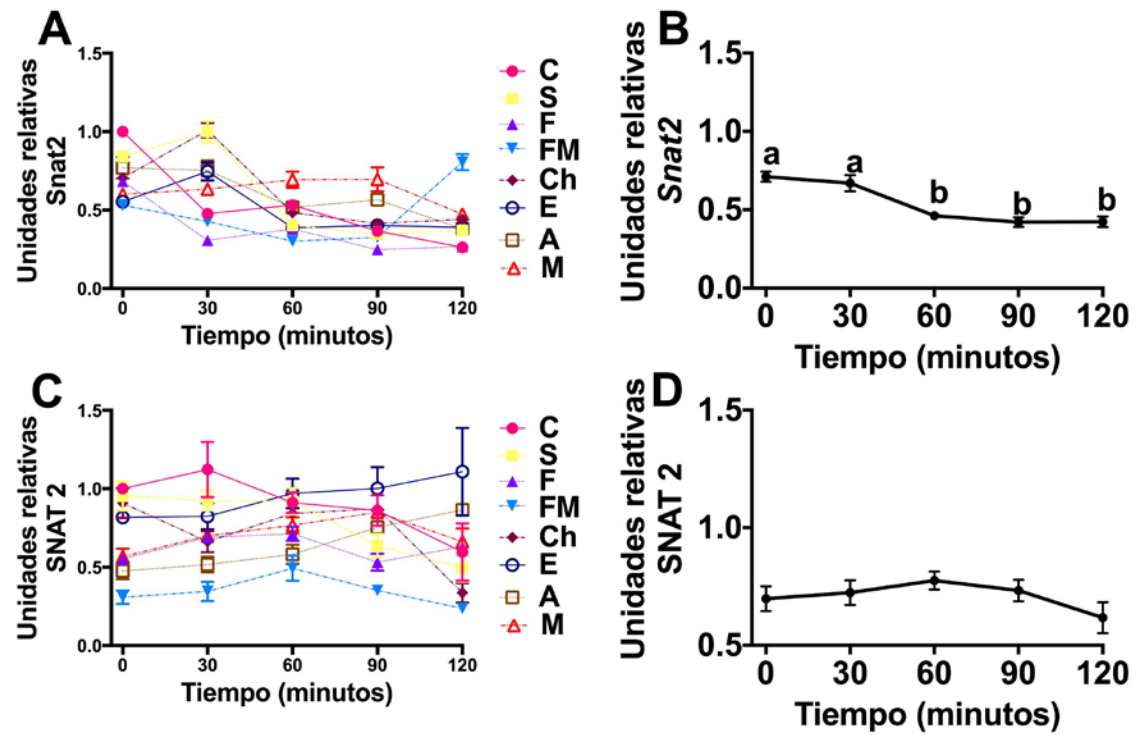


Figura 16. Expresión de SNAT2 en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas (A) abundancia de mRNA de *Snat2*, (B) abundancia de mRNA promedio de *Snat2*, (C) abundancia de proteína SNAT2 (D) abundancia promedio de SNAT2. Los valores son las medias \pm el ESM $n=3$ por tiempo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c>d$), $P<0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

Expresión de GCN2

No se observaron cambios en la abundancia de GCN2 por el tipo de proteína dietaria (Figura 17A), se observa que la calidad de la proteína dietaria regula ligeramente la expresión GCN2, es decir, las proteínas de buena calidad tienden a aumentar su abundancia si embargo este aumento no es significativo en comparación a las proteínas de mala calidad (Figura 17B).

Probablemente no se observaron cambios en la expresión de esta cinasa por que se ha reportado que GCN2 se encuentra activa cuando hay eliminación completa de aminoácidos (Gallinetti et al., 2013) y los modelos experimentales empleados no generan esta condición.

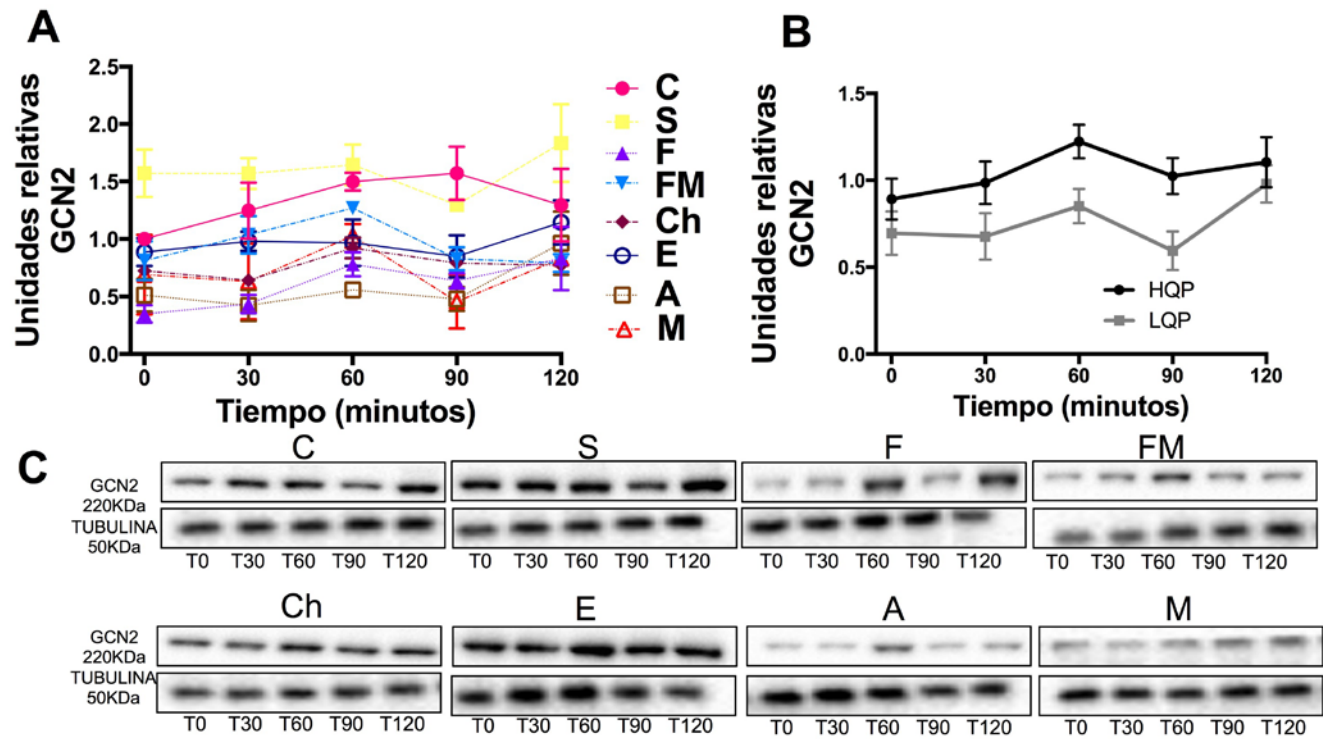


Figura 17. Expresión de GCN2 en ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas

(A) abundancia de proteína de GCN2, (B) abundancia de proteína de GCN2 de acuerdo a la calidad de proteína, (C) western blot representativo de GCN2. Los valores son las medias \pm el ESM $n=3$ por tiempo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c>d$), $P<0.05$.

C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí; M: proteína de maíz.

Expresión de mTORC1, S6K1 y eIF4G

Se determinó el efecto del tipo de proteína dietaria sobre la ruta de mTORC1, la ruta de señalización de mTORC1 es altamente regulada por factores de crecimiento, como la insulina y por aminoácidos, en particular leucina y arginina (Laplante y Sabatini, 2012, Bar-Peled y Sabatini, 2014).

Los principales cambios en la ruta de señalización de mTORC1 se observan después de 60 minutos de consumir las dietas experimentales (Figura 18). Se observa que las ratas alimentadas S, F y FM presentan un aumento significativo ($P<0.05$) de mTOR fosforilado (Figura 19A).

Como ya se mencionó la leucina es un aminoácido que tiene un papel importante en la regulación de mTORC1 (Laplante y Sabatini, 2012, Bar-Peled y Sabatini, 2014), sin embargo en las ratas alimentadas con M (que contiene la mayor concentración de leucina 192.0 mg/g proteína entre las proteínas estudiadas) presentan la menor expresión de mTORC1. Esto indica que además de la leucina es necesario tener otros factores, como cantidades suficientes de aminoácidos esenciales, para favorecer la actividad de mTORC1.

En el caso de la fosforilación de S6K1, blanco de mTORC1, se observa que las ratas alimentadas con FM presentan la mayor abundancia de S6K1 fosforilado ($P<0.05$) (Figura 19B), mientras que las ratas alimentadas con M y A presentan la menor fosforilación. Cuando S6K1 es fosforilado por mTORC1, se favorece su actividad, involucrada en la regulación de factores de inicio de la traducción, de elongación de la traducción y así como en la biogénesis ribosomal (Iadevaia et al., 2012).

Se determinó la expresión de eIF4G, factor de inicio de la traducción involucrado en el inicio de la traducción de cap (Anand y Gruppuso, 2005), y se observó en los grupos alimentados con F, FM y Ch la mayor expresión ($P<0.05$) de esta proteína en comparación a los otros grupos experimentales (Figura 19C).

Lo anterior es un indicativo de que la calidad de proteína dietaria está involucrada en la regulación de la actividad de mTORC1 y en la regulación de la síntesis de proteínas dependiente de cap.

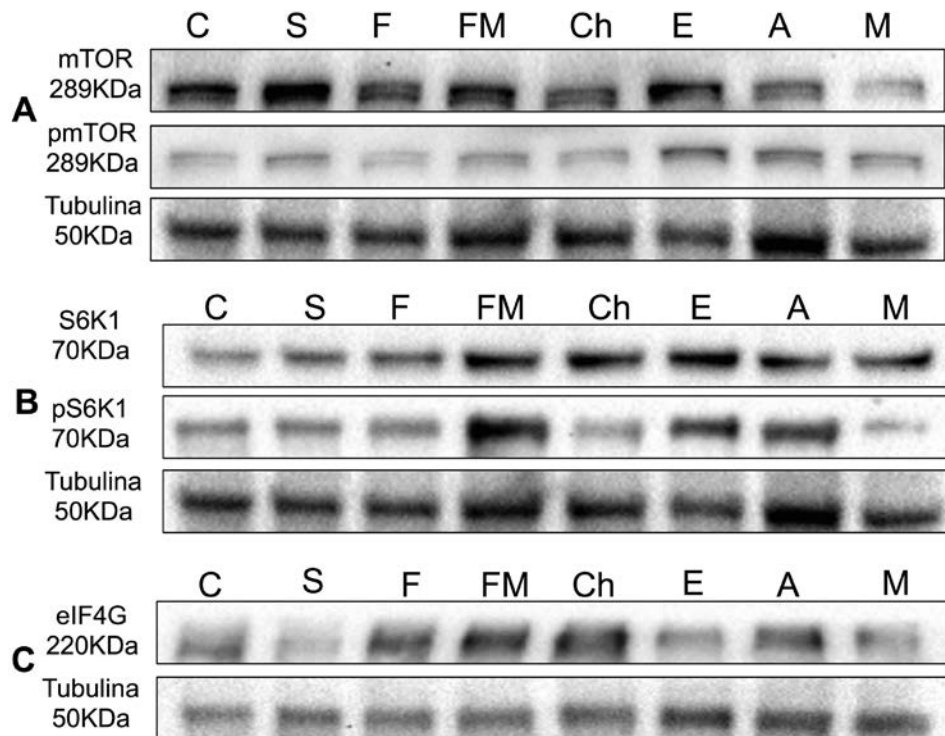


Figura 18. Western blot representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1 y eIF4G de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas
 C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí ; M: proteína de maíz.

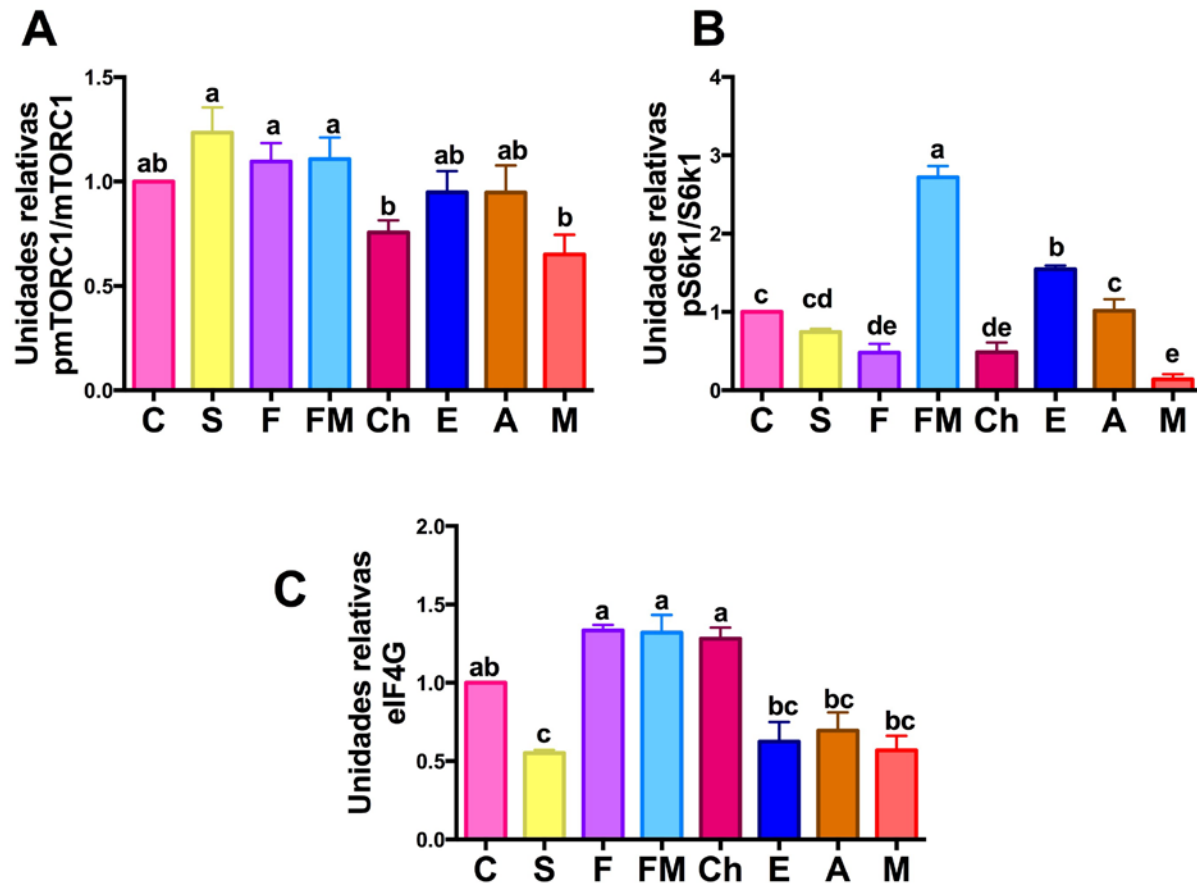


Figura 19. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en hígado

Abundancia de proteína de: (A) p-mTORC1/mTORC1, (B) p-S6K1/S6K1 y (C) eIF4G. Los valores son las medias \pm ESM $n = 3$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a > b > c$), $P < 0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí; M: proteína de maíz

Expresión de SREBP1c y FASN

El complejo mTORC1, adicionalmente a la regulación que ejerce sobre la síntesis de proteínas también controla la síntesis de lípidos. Se ha demostrado que mTORC1 regula positivamente al factor de transcripción SREBP1c (factor de transcripción que se une al elemento de respuesta a esteroides) (Laplante y Sabatini, 2009). Por eso en el presente estudio se determinó el efecto de los diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de genes lipogénicos.

Adicionalmente a la regulación ejercida por mTORC1, el factor de transcripción SREBP1c está regulado por los cambios de insulina en sangre, la actividad de SREBP1c aumenta cuando las concentraciones de insulina son elevadas y activa los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Bernadier y Moustaid-Moussam, 2004).

En estudios realizados por el grupo de trabajo de la Dra. Nimbe Torres y el Dr. Armando Tovar se demostró que el tipo de proteína dietaria era capaz de regular la expresión SREBP1c y que dicha regulación estaba dada por cambios en la concentración de insulina, es decir, cuando animales de experimentación consumían proteína soya la concentración de insulina en suero disminuía junto con la expresión de SREBP1c y su proteína blanco FASN (Tovar et al., 2002).

En el presente estudio se observó que los principales cambios en la expresión de SREBP1c ocurren después de 60 minutos de consumir las dietas experimentales, en particular las ratas alimentadas con M *Srebp1c* 7.14 y 12.5 veces mayor que las ratas alimentadas con FM y Ch respectivamente, que son las que presentan la menor expresión de *Srebp1c* en ese tiempo experimental (Figura 20A) y se observa que los grupos alimentados con FM, F, S y C presentan la menor abundancia de proteína de SREBP1c en comparación a los otros grupos experimentales (Figura 20C).

Se determinó la expresión de FASN (sintasa de ácidos grasos), la cual al igual que el factor de transcripción SREBP1c, presenta los principales cambios en la

expresión después de 60 minutos de consumir las dietas experimentales. Se observó que las ratas alimentadas con M y presentan la mayor expresión génica de *Fasn* 6.9 y 11.6 veces mayor en comparación el grupo alimentado con S, el que presentó la menor la expresión de *Fasn* (Figura 20B) en el postprandio. De igual forma los grupos alimentados con A y M presentan la mayor abundancia de proteína de FASN (Figura 20D).

De acuerdo a lo anterior, el aumento de la expresión de SREBP1C y FASN no se puede atribuir a la ruta de señalización de mTORC1, debido a que las ratas alimentadas con A y M presentan la menor inducción de la ruta de mTORC1, por lo que probablemente el aumento en la expresión de los genes lipogénicos pueda ser causado por la relación insulina/glucagon.

Como se mencionó anteriormente, la relación insulina/glucagon, tiene injerencia sobre la expresión de genes lipogénicos. Y en particular las ratas alimentadas con A presentan una relación insulina/glucagon elevada lo que probablemente se relacione con la expresión elevada de los genes lipogénicos, sin embargo esta teoría no se puede aplicar a las ratas alimentadas con M ya que estas presentan una relación insulina/glucagon baja (1.5 ± 0.1).

Otro factor que puede considerar, de acuerdo a los resultados observados en este estudio, es el posible efecto que puede tener la calidad de la proteína dietaria sobre la expresión de SREBP-1c y FASN, ya que las proteínas dietarias con menor calificación química (M y A) estimularon la expresión de SREBP1c y FASN en mayor proporción en comparación a las proteínas con buena calificación química, lo que indicaría que probablemente la calidad de la proteína dietaria tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes lipogénicos.

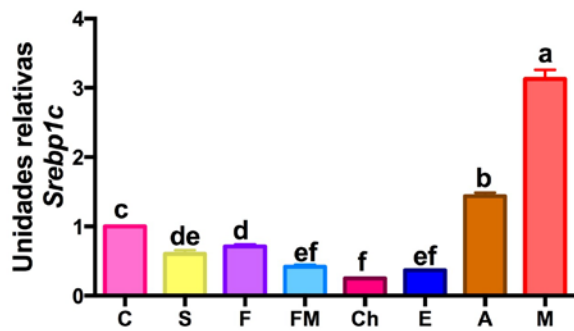
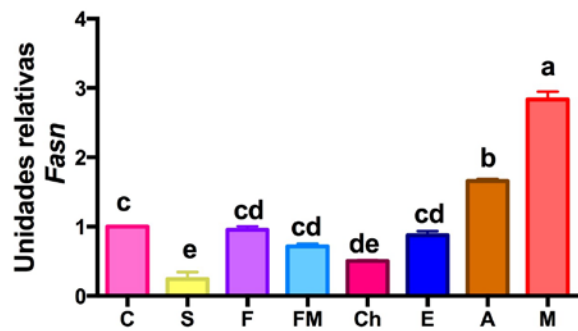
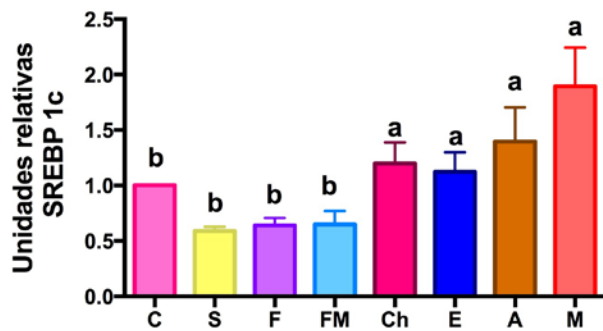
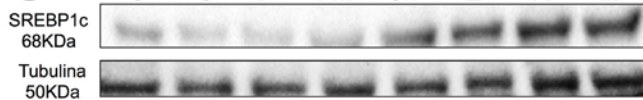
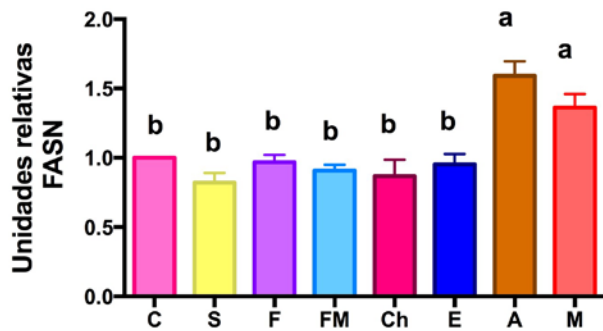
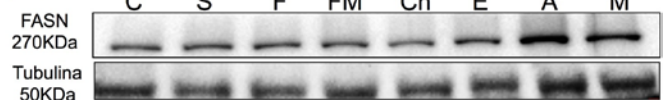
A**B****C****D**

Figura 20. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión SREBP1C y FASN en hígado de ratas sanas

Abundancia de mRNA: (A) *Srebp1c*, (B) *Fasn*. Abundancia de proteína y western blot representativo de: (C) SREBP1c, (D) FASN. Los valores son las medias \pm ESM, n=3 por grupo.

Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a > b > c$), $P < 0.05$. C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol; FM: proteína concentrada de frijol + proteína de maíz; Ch: proteína aislada de chícharo; E: espirulina; A: proteína aislada de ajonjolí; M: proteína de maíz.

Estudio 2. Evaluación del efecto de diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

En el estudio 1 se observó que la abundancia de mRNA y proteína de SNAT2 y GCN2 no se modificaba por el tipo o calidad de la proteína dietaria y que la secreción de insulina incrementaba con el consumo de caseína y proteína aislada de ajonjolí, lo que indicaría que probablemente la secreción de insulina se debe al patrón de aminoácidos y no al tipo de proteína dietaria. Sin embargo si se observó que la expresión de la ruta de mTORC1 en hígado, medida a través de un aumento en la fosforilación de su blanco S6K1 y abundancia de proteína de eIF4G incrementaba con el consumo de proteína de soya y con la combinación de proteína concentrada de frijol + proteína de maíz.

Adicionalmente en el estudio 1 se observó que el consumo de la combinación de proteína concentrada de frijol + proteína de maíz, favorece la ganancia de peso en la misma proporción que las ratas alimentadas con caseína.

En conjunto estos resultados, permitieron diseñar un modelo de alimentación restringida en proteína con la finalidad de evaluar el efecto de diferentes proteínas de origen vegetal y sus combinaciones (proteína concentrada de frijol negro + proteína de maíz y proteína aislada de soya + proteína de maíz) sobre la expresión de los posibles sensores de la proteína dietaria.

Ganancia de peso y consumo de alimento

Estudios previos han reportado que alimentar ratas con dietas restringidas en proteína (0.5%) genera un modelo de malnutrición (Philbrick y Hill, 1974). Se entiende por malnutrición una nutrición deficiente o desequilibrada debido a una dieta pobre o excesiva, una consecuencia a largo plazo de consumir dietas deficientes en macronutrientes es el desarrollo de desnutrición.

En el presente estudio se desarrolló un modelo animal alimentado con una dieta restringida en proteína el cual posteriormente fue alimentado con dietas con un contenido adecuado de proteína. Durante el periodo de alimentación restringida en

proteína las ratas presentaron una pérdida de peso del 21% en comparación a su peso inicial (Figura 21A) y durante el periodo de alimentación con dietas con el contenido adecuado de proteína, los grupos alimentados con C, S, SM y FM logran recuperar el peso perdido durante el periodo de alimentación restringida de proteína y presentan una ganancia de peso de 74.43 %, 66.70%, 66.80% y 64.09% respectivamente (Figura 21B).

En relación a la recuperación del peso perdido durante la alimentación restringida de proteína, se observa que después de siete días de consumir las dietas con aporte adecuado de proteínas las ratas alimentadas con C y S son las que presentan la mejor recuperación de peso (Figura 22B) y que después de consumir las dietas de recuperación durante 14 días las ratas alimentadas con C, FM y SM presentan una ganancia de 5.1 g/día, 4.7 g/ día y 4.4 g/día respectivamente (Figura 22C). Esto indica que el consumo de proteínas de buena calidad como la C, S y las mezclas de proteínas como FM y SM aseguran una buena rehabilitación nutricional después de un periodo de malnutrición.

En relación al consumo de alimento se observa que los grupos que presentaron menor consumo de alimento fueron los alimentados con BP (8.3 g/día) y M (10.6 g/día) en comparación con los demás grupos experimentales (Figura 23), como se explico previamente la deficiencia en el contenido de aminoácidos ocasiona que los roedores consuman una menor cantidad de alimento (Harper et al., 1970, Canfield y Chytil, 1978).

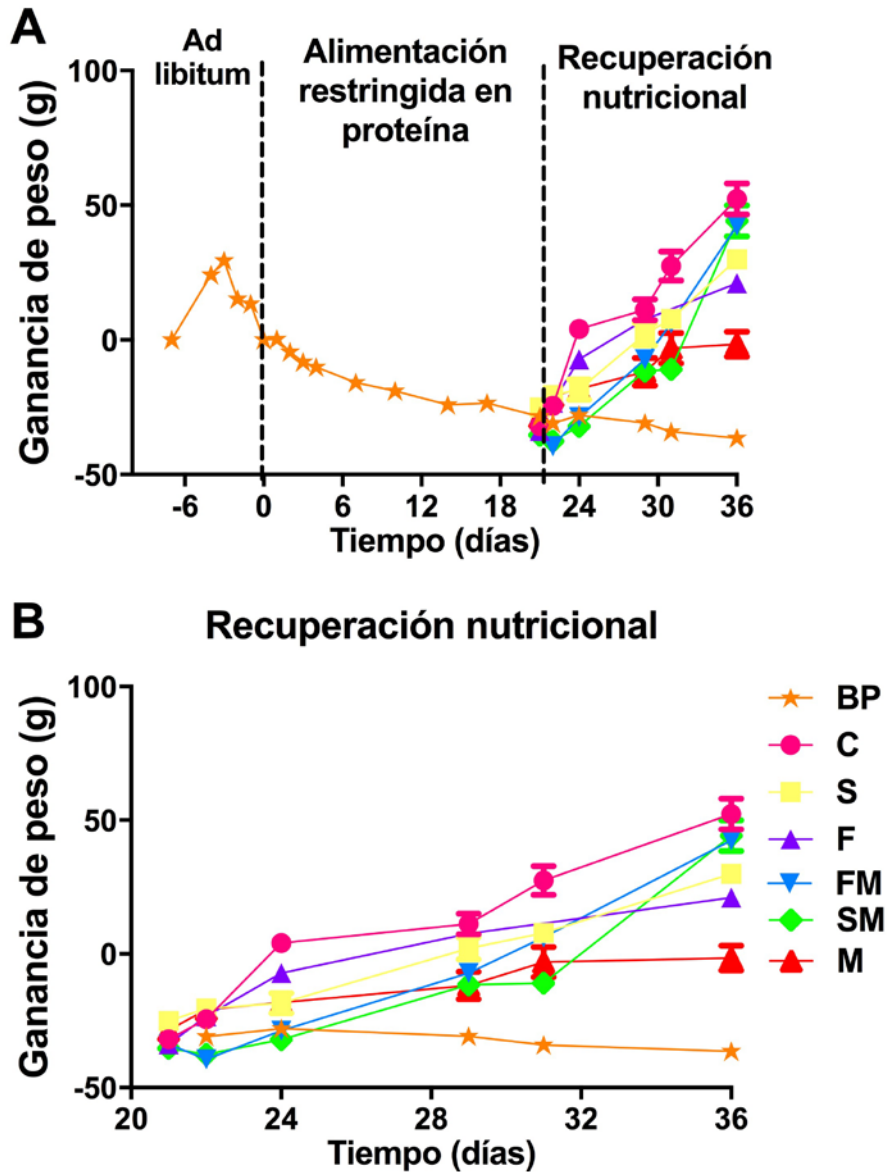


Figura 21. Ganancia de peso de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

(A) curva de ganancia de peso, (B) sección lineal de la ganancia de peso. Los valores son las medias \pm ESM, $n = 21$ por grupo. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

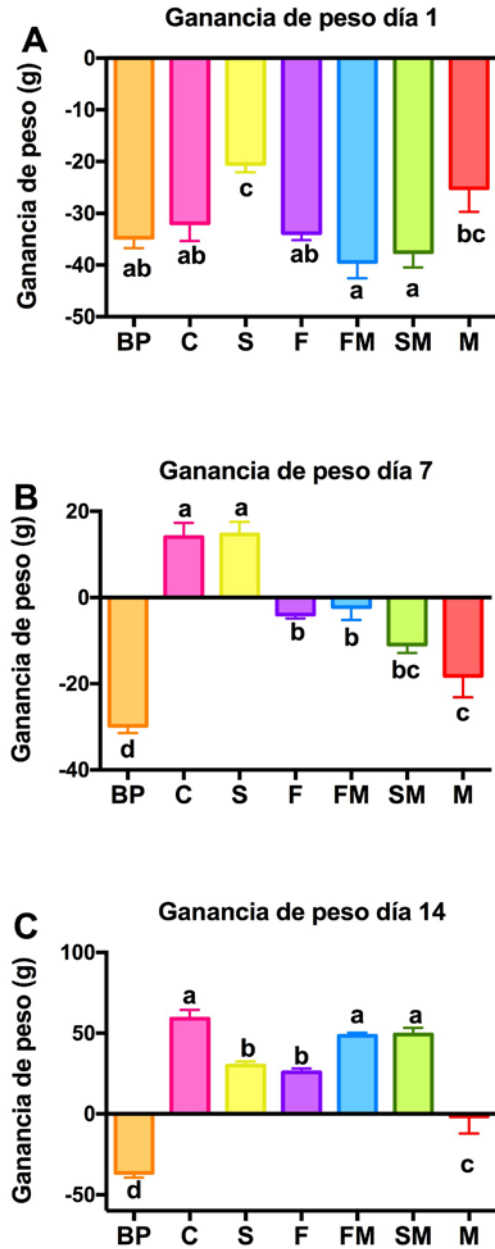


Figura 22. Ganancia de peso después de consumir las dietas con aporte adecuado de proteína durante: (A) un día, (B) siete días y (C) 14 días. Los valores son las medias \pm ESM, $n=6$ por grupo experimental. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c$), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

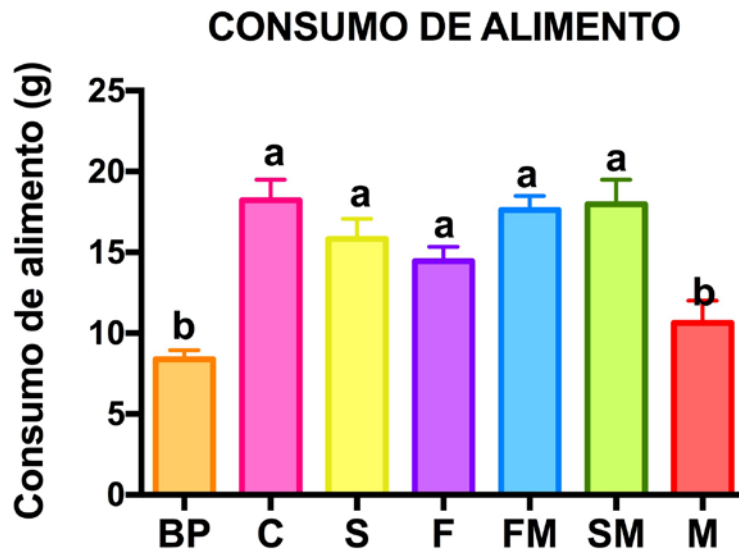


Figura 23. Consumo de alimento de estudio restringido en proteína
 Los valores son las medias \pm ESM, n = 21 por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Índice de conversión de alimento

Como se puede observar en la Figura 24B, las ratas alimentadas con C y S durante siete días presentan el mayor índice de conversión de alimento, después de 14 días de consumir las dietas con aporte suficiente de proteínas las ratas alimentadas con la SM presentan el mayor índice de conversión seguidas de las ratas alimentadas con C (Figura 24C).

Estos resultados confirman lo observado en las gráficas de ganancia de peso, es decir, que el consumo de proteínas de buena calidad como la C y la S favorecen la recuperación de peso en un peso en un periodo de tiempo más corto (siete días) en comparación al consumo de FM y SM que requiere un periodo de 14 días para asegurar la recuperación de peso.

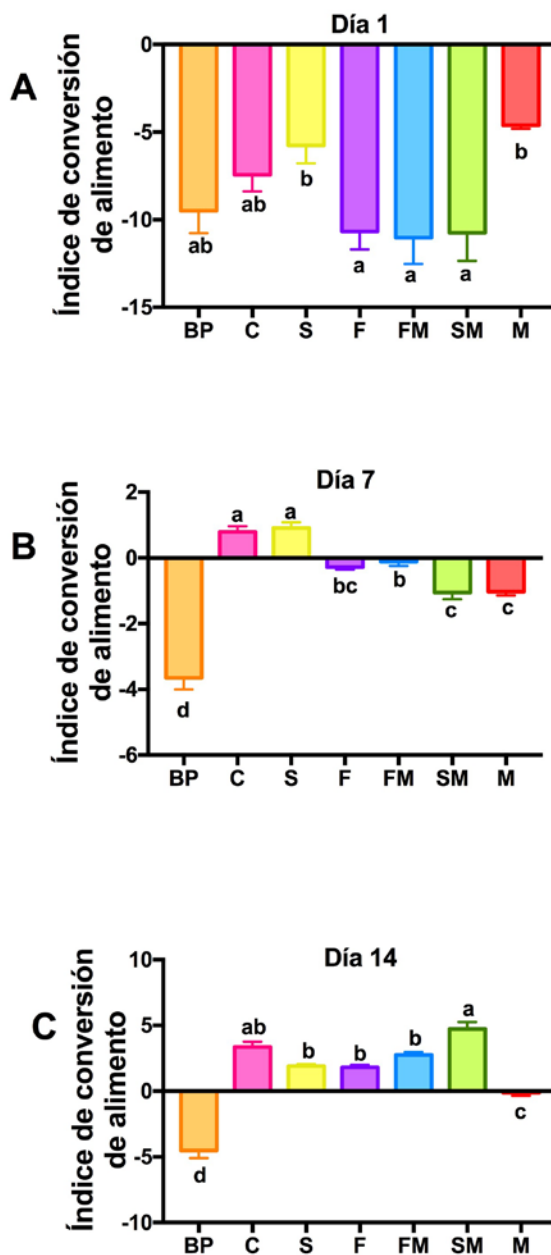


Figura 24. Índice de conversión de alimento de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

(A) después de un día, (B) después de siete días y (C) después de 14 días de consumir las dietas con aporte suficiente de proteína. Los valores son las medias \pm ESM, $n=6$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c$), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soja + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Parámetros bioquímicos en suero

En la Tabla 10 se presentan los valores de los parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con dietas con un aporte adecuado de proteína después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

Es importante resaltar que la mayoría de los parámetros bioquímicos se encuentran dentro de los valores normales, con excepción de la insulina ya que las ratas alimentadas con C presentan hiperinsulinemia, mientras que los otros grupos experimentales presentan valores normales de insulina, este incremento en la concentración de insulina no es un efecto deseable ya que la hiperinsulinemia se ha relacionado con el desarrollo de dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Kelly et al., 2014). Los grupos alimentados con C y S presentaron la mayor concentración de glucosa en suero ($P<0.05$).

El grupo alimentado con BP y las ratas alimentadas F presentan la menor relación ($P<0.05$) insulina/glucagon, mientras que el grupo alimentado con C presenta la mayor relación ($P<0.05$), esta relación puede ser un indicativo de la regulación de la expresión de genes lipogénicos (Tovar et al., 2002).

Las ratas alimentadas con C, S y F presentan al mayor incremento ($P<0.05$) en la concentración de albúmina en suero después de consumir las dietas con aporte suficiente de proteína durante siete días. Las ratas alimentadas con M presentan el menor aumento en la concentración de albúmina en suero ($P<0.05$).

Tabla 10. Parámetros bioquímicos de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

Parámetro bioquímico	Día	BP	C	S	F	FM	SM	M
Glucosa, (mmol/L)	7	8.5 ± 0.5 ^{ab}	9.3 ± 0.2 ^a	8.6 ± 0.5 ^{ab}	7.8 ± 0.2 ^{bc}	7.4 ± 0.2 ^{bc}	7.0 ± 0.3 ^c	7.7 ± 0.2 ^{bc}
Triglicéridos, (mmol/L)	7	0.77 ± 0.1 ^b	0.58 ± 0.2 ^b	1.28 ± 0.1 ^a	0.72 ± 0.1 ^b	1.15 ± 0.1 ^a	0.92 ± 0.1 ^b	0.85 ± 0.1 ^b
Colesterol, (mmol/L)	7	1.66 ± 0.1 ^b	2.73 ± 0.1 ^a	2.71 ± 0.1 ^a	1.96 ± 0.1 ^b	2.38 ± 0.2 ^a	2.39 ± 0.2 ^a	2.52 ± 0.1 ^a
Insulina, (pmol/L)	7	83.5 ± 7 ^d	445.0 ± 15 ^a	218.5 ± 17 ^b	148.1 ± 11 ^c	230.3 ± 13 ^b	249.5 ± 17 ^b	239.0 ± 14 ^b
Glucagon, (ng/L)	7	74.3 ± 4 ^c	88.9 ± 6 ^{bc}	99.0 ± 5 ^{ab}	110.2 ± 2 ^a	76.3 ± 3 ^{bc}	114.1 ± 4 ^a	105.2 ± 4 ^{ab}
Insulina/ Glucagon	7	1.1 ± 0.1 ^c	5.1 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.3 ^{bc}	1.4 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.2 ^b	2.2 ± 0.2 ^{bc}	2.3 ± 0.1 ^{bc}
Albúmina (g/dL)	Δ7-1	-0.25 ± 0.07 ^d	1.60 ± 0.11 ^a	1.32 ± 0.15 ^{ab}	1.05 ± 0.24 ^{ab}	0.73 ± 0.12 ^b	0.66 ± 0.23 ^b	0.30 ± 0.16 ^c

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz. Los valores son la media ± SEM, n= 6 por grupo. Medias en una fila sin letra común difieren entre sí , $P < 0.05$. Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se uso prueba Tukey como post-hoc

Determinación de aminoácidos en suero

Se determinó la concentración de aminoácidos en suero después de un día de consumir las dietas con aporte adecuado de proteína. Las ratas alimentadas con BP presentan el contenido más bajo de aminoácidos esenciales (AAE: treonina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, lisina, arginina e histidina) y aminoácidos de cadena ramificada en suero (AACR: valina, leucina e isoleucina), mientras que las ratas que consumieron las dietas con el aporte adecuado de proteína presentan un incremento significativo ($P < 0.05$) en la concentración de AAE y AACR (Tabla 11).

En particular las ratas alimentadas con C presentan el mayor incremento de AAE y AACR, mientras que el grupo alimentado con SM presenta un incremento similar de AAE seguido por los grupos alimentados con M, S, F y FM. Aunque las ratas alimentadas con M presentan un incremento de AAE mayor al de las ratas alimentadas con S, las primeras presentan deficiencia en triptófano y lisina.

Es importante resaltar que el aumento en AAE no necesariamente indica que se consumió una proteína de buena calidad, por ejemplo en el caso de las ratas alimentadas con M a pesar de que presentan un incremento de AAE en suero, éstas continúan presentando deficiencia de lisina, lo que se relaciona con la menor ganancia de peso en comparación a los otros grupos experimentales.

Tabla 11. Concentración de aminoácidos en plasma ($\mu\text{mol/mL}$) de ratas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

AA ($\mu\text{mol/mL}$)	BP	C	S	F	FM	SM	M
Asp	0.045 \pm 0.001 ^c	0.078 \pm 0.003 ^a	0.061 \pm 0.002 ^b	0.057 \pm 0.003 ^{bc}	0.055 \pm 0.004 ^{bc}	0.059 \pm 0.002 ^{bc}	0.056 \pm 0.003 ^{bc}
Glu	0.24 \pm 0.008 ^b	0.26 \pm 0.006 ^a	0.24 \pm 0.005 ^b	0.23 \pm 0.001 ^b	0.17 \pm 0.003 ^c	0.23 \pm 0.006 ^b	0.18 \pm 0.004 ^c
Ser	0.56 \pm 0.01 ^c	0.92 \pm 0.03 ^{ab}	1.08 \pm 0.06 ^a	0.88 \pm 0.02 ^b	0.83 \pm 0.02 ^b	0.97 \pm 0.03 ^{ab}	0.91 \pm 0.05 ^{ab}
His	0.055 \pm 0.001 ^b	0.100 \pm 0.006 ^a	0.095 \pm 0.004 ^a	0.079 \pm 0.004 ^{ab}	0.060 \pm 0.005 ^b	0.102 \pm 0.008 ^a	0.063 \pm 0.006 ^b
Gly	0.76 \pm 0.01 ^c	0.74 \pm 0.02 ^c	0.94 \pm 0.02 ^b	1.08 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.02 ^{dc}	0.65 \pm 0.02 ^{dc}	0.56 \pm 0.02 ^d
Thr	0.19 \pm 0.03 ^b	0.27 \pm 0.05 ^{ab}	0.37 \pm 0.06 ^{ab}	0.37 \pm 0.02 ^{ab}	0.31 \pm 0.07 ^{ab}	0.41 \pm 0.05 ^a	0.46 \pm 0.02 ^a
Arg	0.02 \pm 0.002 ^c	0.19 \pm 0.001 ^a	0.12 \pm 0.016 ^b	0.15 \pm 0.011 ^{ab}	0.14 \pm 0.012 ^b	0.21 \pm 0.004 ^a	0.16 \pm 0.015 ^{ab}
Ala	1.53 \pm 0.03 ^{cd}	1.68 \pm 0.05 ^{bc}	2.13 \pm 0.06 ^a	1.78 \pm 0.04 ^b	1.34 \pm 0.05 ^d	1.50 \pm 0.07 ^{cd}	1.39 \pm 0.02 ^d
Val	0.070 \pm 0.006 ^d	0.324 \pm 0.016 ^a	0.271 \pm 0.009 ^{ab}	0.242 \pm 0.012 ^{bc}	0.205 \pm 0.008 ^c	0.237 \pm 0.013 ^{bc}	0.215 \pm 0.009 ^c
Met	0.11 \pm 0.009 ^{ab}	0.15 \pm 0.010 ^a	0.11 \pm 0.007 ^{ab}	0.10 \pm 0.007 ^b	0.10 \pm 0.005 ^b	0.12 \pm 0.009 ^{ab}	0.12 \pm 0.010 ^{ab}
Cys	0.607 \pm 0.004 ^c	0.695 \pm 0.013 ^b	0.891 \pm 0.027 ^a	0.768 \pm 0.016 ^b	0.528 \pm 0.008 ^{de}	0.575 \pm 0.012 ^d	0.471 \pm 0.022 ^e
Phe	0.043 \pm 0.004 ^b	0.111 \pm 0.009 ^a	0.111 \pm 0.005 ^a	0.109 \pm 0.008 ^a	0.108 \pm 0.003 ^a	0.113 \pm 0.006 ^a	0.119 \pm 0.006 ^a
Tyr	0.040 \pm 0.002 ^d	0.185 \pm 0.005 ^{ab}	0.170 \pm 0.008 ^{ab}	0.140 \pm 0.008 ^c	0.145 \pm 0.005 ^{bc}	0.190 \pm 0.015 ^a	0.191 \pm 0.003 ^a
Ile	0.046 \pm 0.002 ^d	0.118 \pm 0.004 ^a	0.123 \pm 0.04 ^a	0.096 \pm 0.002 ^b	0.072 \pm 0.03 ^c	0.083 \pm 0.05 ^{bc}	0.066 \pm 0.004 ^c
Leu	0.060 \pm 0.005 ^d	0.201 \pm 0.006 ^b	0.179 \pm 0.008 ^{bc}	0.156 \pm 0.003 ^c	0.201 \pm 0.011 ^b	0.230 \pm 0.011 ^a	0.259 \pm 0.012 ^a
Lys	0.30 \pm 0.006 ^{cd}	0.49 \pm 0.012 ^{ab}	0.51 \pm 0.022 ^a	0.42 \pm 0.012 ^b	0.28 \pm 0.016 ^d	0.35 \pm 0.012 ^{bc}	0.17 \pm 0.014 ^e
Pro	0.31 \pm 0.01 ^c	0.68 \pm 0.02 ^a	0.48 \pm 0.001 ^b	0.34 \pm 0.02 ^c	0.45 \pm 0.01 ^b	0.39 \pm 0.02 ^c	0.51 \pm 0.001 ^b
Trp	0.036 \pm 0.003 ^b	0.093 \pm 0.008 ^a	0.078 \pm 0.004 ^a	0.031 \pm 0.002 ^b	0.024 \pm 0.003 ^b	0.037 \pm 0.005 ^b	0.018 \pm 0.003 ^c
Asn	0.032 \pm 0.001 ^c	0.065 \pm 0.03 ^b	0.116 \pm 0.007 ^a	0.70 \pm 0.004 ^b	0.75 \pm 0.005 ^b	0.108 \pm 0.03 ^a	0.081 \pm 0.001 ^b
Gln	0.81 \pm 0.01 ^c	0.89 \pm 0.001 ^a	0.88 \pm 0.001 ^a	0.84 \pm 0.001 ^{bc}	0.72 \pm 0.001 ^d	0.87 \pm 0.01 ^{ab}	0.71 \pm 0.01 ^d
ΣAACR	0.526 \pm 0.004 ^d	1.929 \pm 0.03 ^a	1.722 \pm 0.022 ^b	1.481 \pm 0.022 ^c	1.432 \pm 0.022 ^c	1.653 \pm 0.026 ^b	1.620 \pm 0.030 ^b
ΣAAE	1.909 \pm 0.01 ^e	4.666 \pm 0.02 ^a	3.993 \pm 0.02 ^c	3.994 \pm 0.02 ^c	3.684 \pm 0.02 ^d	4.692 \pm 0.02 ^a	4.462 \pm 0.03 ^b

ΣAACR , Val + Leu + Ile ; ΣAAE , Thr + Val + Ile + Leu + Met + Phe + Trp + Lys + His + Arg. BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz. Los valores son la media \pm SEM n = 6 por grupo. Medias en una fila sin letra común difieren entre sí , $P < 0.05$. Las diferencias se determinaron mediante ANOVA de una vía, se uso prueba Tukey como post-hoc

Abundancia de mRNA y proteína

Expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en hígado

Se determinó el efecto del tipo de proteína dietaria después de un periodo de alimentación restringida en proteína sobre la ruta de señalización de mTORC1 en hígado.

Los principales cambios se observaron después de un día de consumir las dietas con aporte adecuado de proteína (Figura 25). En general se observa que las ratas alimentadas con FM presentan la mayor cantidad de mTOR fosforilado ($P<0.05$) seguidas por las ratas alimentadas con C, S y F (Figura 26A). Las ratas alimentadas con SM y FM presentan un incremento significativo en S6K1 fosforilado ($P<0.05$) (Figura 26B).

Una forma de determinar si el proceso de inicio de la traducción se encuentra regulado por el tipo de proteína dietaria es mediante la cuantificación de un factor de inicio de la traducción. Se eligió medir la expresión de eIF4G por que éste se encuentra involucrado en el proceso de inicio de la traducción dependiente de cap (Anand y Gruppuso, 2005). Las ratas alimentadas con la SM muestran la mayor expresión de eIF4G seguidas de las ratas alimentadas con FM (Figura 26C).

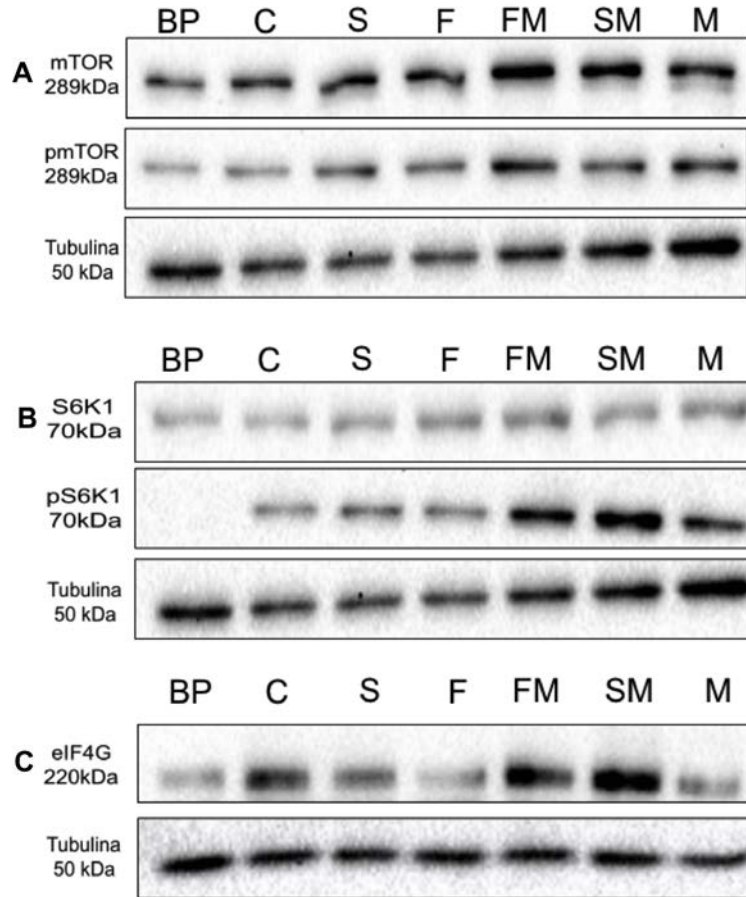


Figura 25. Western representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1, eIF4G de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

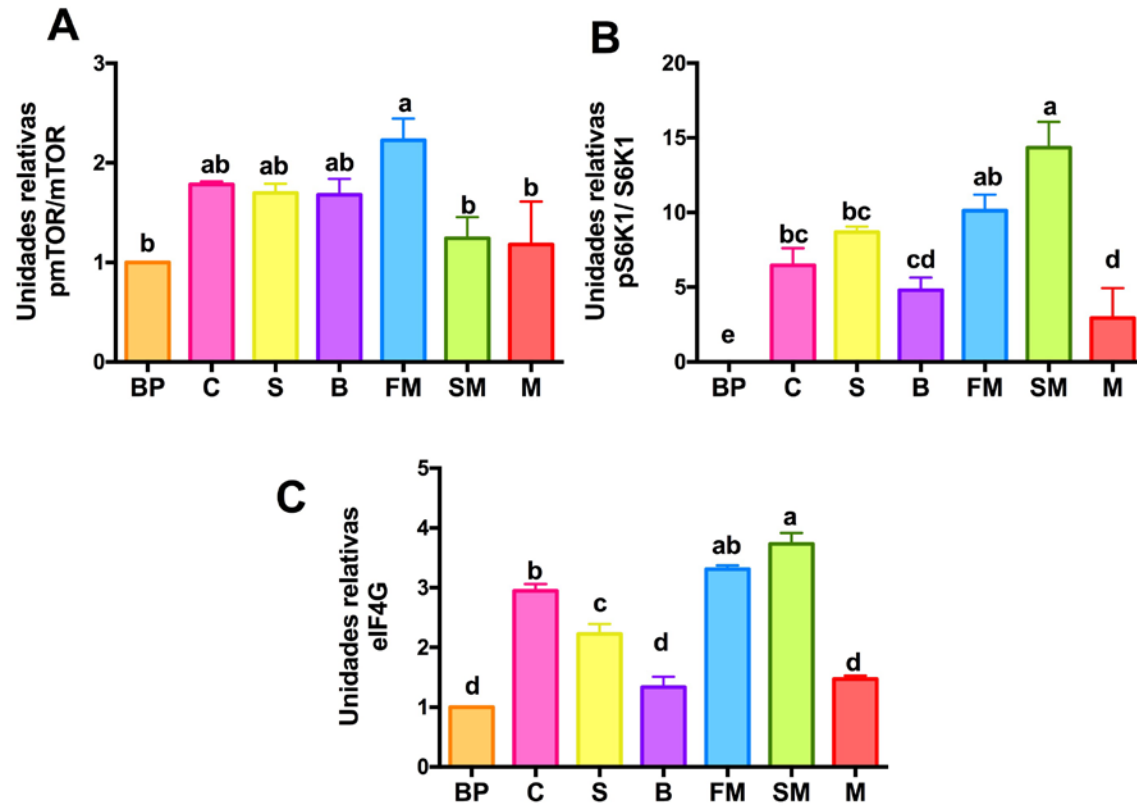


Figura 26. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína
 Abundancia de proteína de: (A) p-mTORC1/mTORC1, (B) p-S6K1/S6K1 y (C) eIF4G. Los valores son las medias \pm ESM, $n=3$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c$), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en músculo

El hígado es un órgano con un papel esencial en la síntesis de proteínas y metabolismo de nutrientes (Kuntz y Kuntz, 2008) . Sin embargo, otro tejido en donde la síntesis de proteínas es un proceso importante es el músculo, se ha demostrado que la desnutrición afecta el desarrollo del músculo (Bayol et al., 2004). Debido a lo anterior se decidió evaluar el efecto de las dietas con el aporte adecuado de proteína sobre la regulación de mTORC1 en músculo.

A diferencia de lo observado en hígado, las principales diferencias en la ruta de señalización de mTORC1 en músculo ocurren después de siete días (Figura 27).

En general se observa que los grupos alimentados con F, FM y S presentan la mayor abundancia de mTOR fosforilado ($P < 0.05$) (Figura 28A), las ratas alimentadas con FM y SM presentan la mayor cantidad de S6K1 fosforilado ($P < 0.05$) (Figura 28B). Por último se observa que la abundancia de eIF4G incrementa significativamente ($P < 0.05$) en las ratas alimentadas con S y SM (Figura 28C).

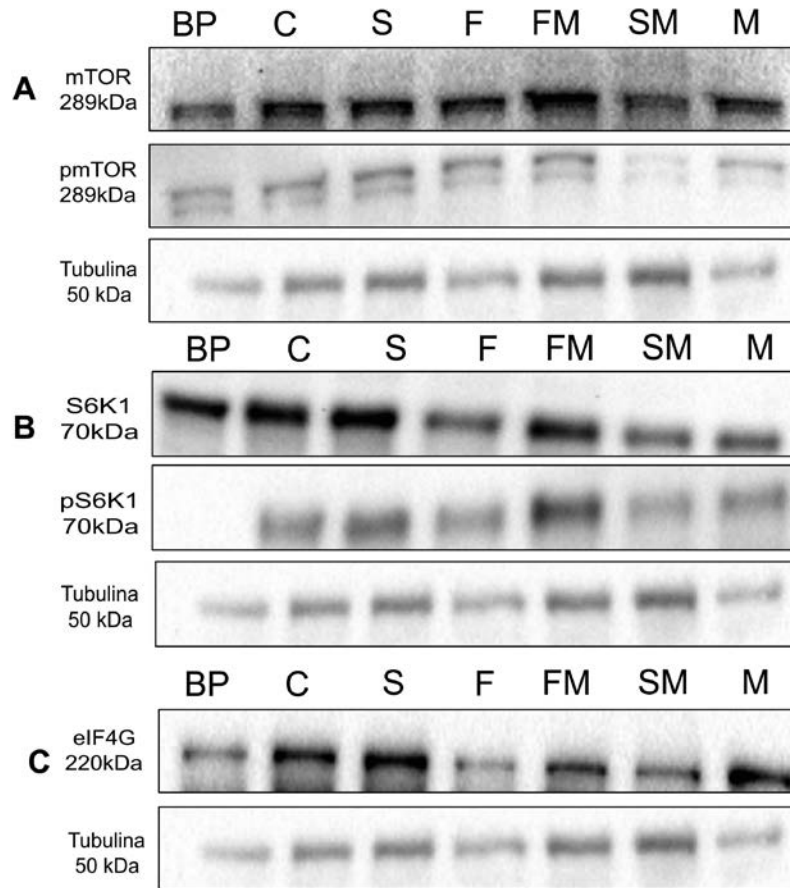


Figura 27. Western representativo de mTORC1/pmTORC1, S6K1/pS6K1, eIF4G de músculo de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

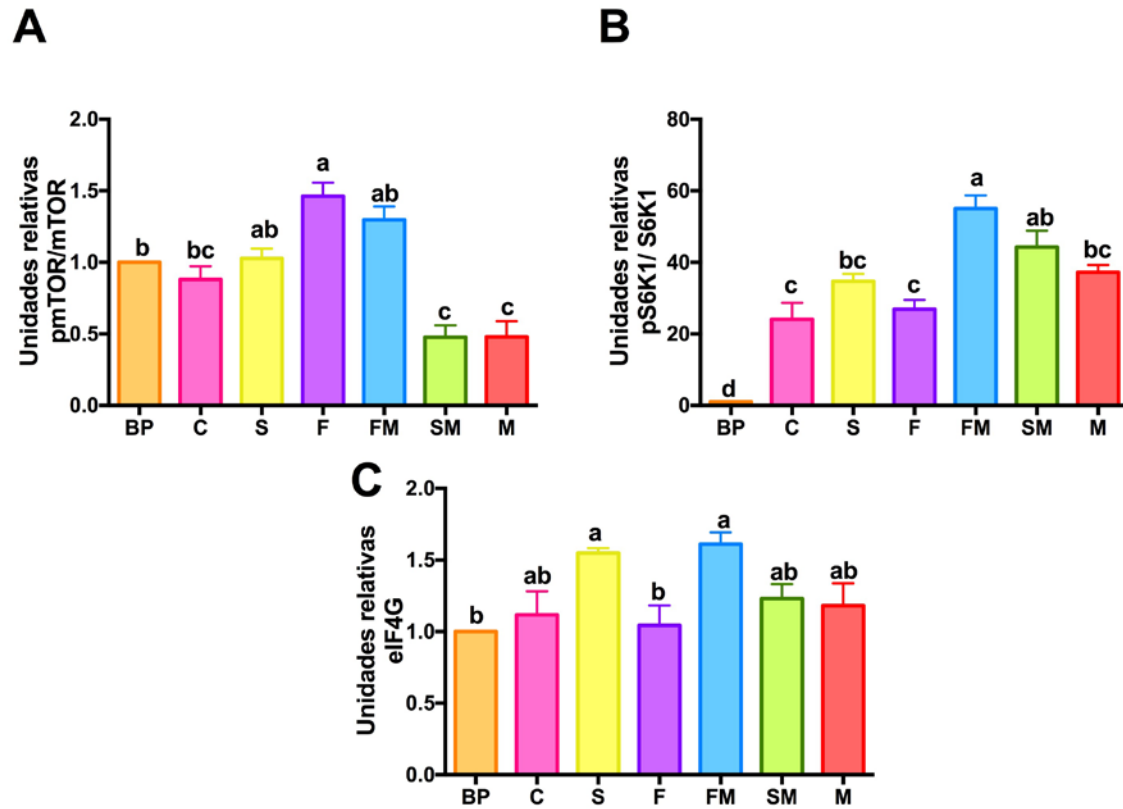


Figura 28. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1 y eIF4G en músculo después de un periodo de alimentación restringida en proteína

Abundancia de proteína de: (A) p-mTORC1/mTORC1, (B) p-S6K1/S6K1 y (C) eIF4G. Los valores son las medias \pm ESM, $n=3$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c$), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soja + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Se determinó el efecto de las proteínas dietarias sobre la ruta de señalización de mTORC1 después de un periodo de alimentación restringido en proteína en hígado y músculo de ratas. En hígado se observaron cambios en la ruta de señalización de mTORC1 después de un día, mientras que en músculo se observaron cambios después de siete días de consumir las dietas.

Es importante recordar que el proceso de síntesis de proteínas se modifica en músculo e hígado en respuesta al estado nutricional viéndose inhibido cuando hay disminución de nutrientes (Yoshizawa et al., 1997). Las diferencias observadas en el tiempo de activación de la ruta de mTORC1 en hígado y músculo probablemente se deban a las diferencias en el recambio proteico que se da en éstos tejidos, ya que el recambio proteico es un proceso más rápido en hígado (77%/día) que en músculo (12%/día) (Poupin et al., 2013).

Expresión de SREBP1c y FASN

La expresión génica de *Srebp1c* se encuentra elevada significativamente ($P<0.05$) en los grupos que consumieron C, M y BP, las ratas alimentadas con S presentan la menor abundancia de mRNA de *Srebp1c* (Figura 29A). La abundancia de proteína de SREBP1c se encuentra elevada significativamente en las ratas alimentadas con M (2.7 veces más en comparación al grupo BP) (Figura 29C).

En el caso de la expresión génica de *Fasn* se observa un comportamiento similar, es decir las ratas alimentadas con S presentan la menor abundancia de mRNA mientras que las ratas alimentadas con M presentan la mayor expresión ($P<0.05$) (Figura 29 B). La mayor cantidad de mRNA de *Srebp1c* y *Fasn* en las ratas alimentadas con proteína de maíz correlaciona con el aumento en la expresión de proteínas de SREBP1c y FASN (Figura 29C y D), lo que indica un posible aumento en la lipogénesis en este grupo experimental.

Como se mencionó anteriormente, la relación insulina/glucagon, puede regular la expresión de genes lipogénicos. Sin embargo dicha teoría no se puede aplicar a las ratas alimentadas con M ya que presentan una relación insulina/glucagon baja (2.3 ± 0.1) y una abundancia de proteína de SREBP1c y FASN elevada.

Sin embargo el aumento en la expresión de SREBP1C y FASN también se puede atribuir a la calidad de la proteína dietaria, en particular al contenido de lisina. La deficiencia de éste aminoácido además de relacionarse con un menor crecimiento también se ha relacionado el desarrollo de hígado graso (Tanphaichitr et al., 1976). Probablemente la deficiencia de lisina en la proteína de maíz (19.8 mg/proteína) se relaciona con el aumento es la expresión de genes lipogénicos.

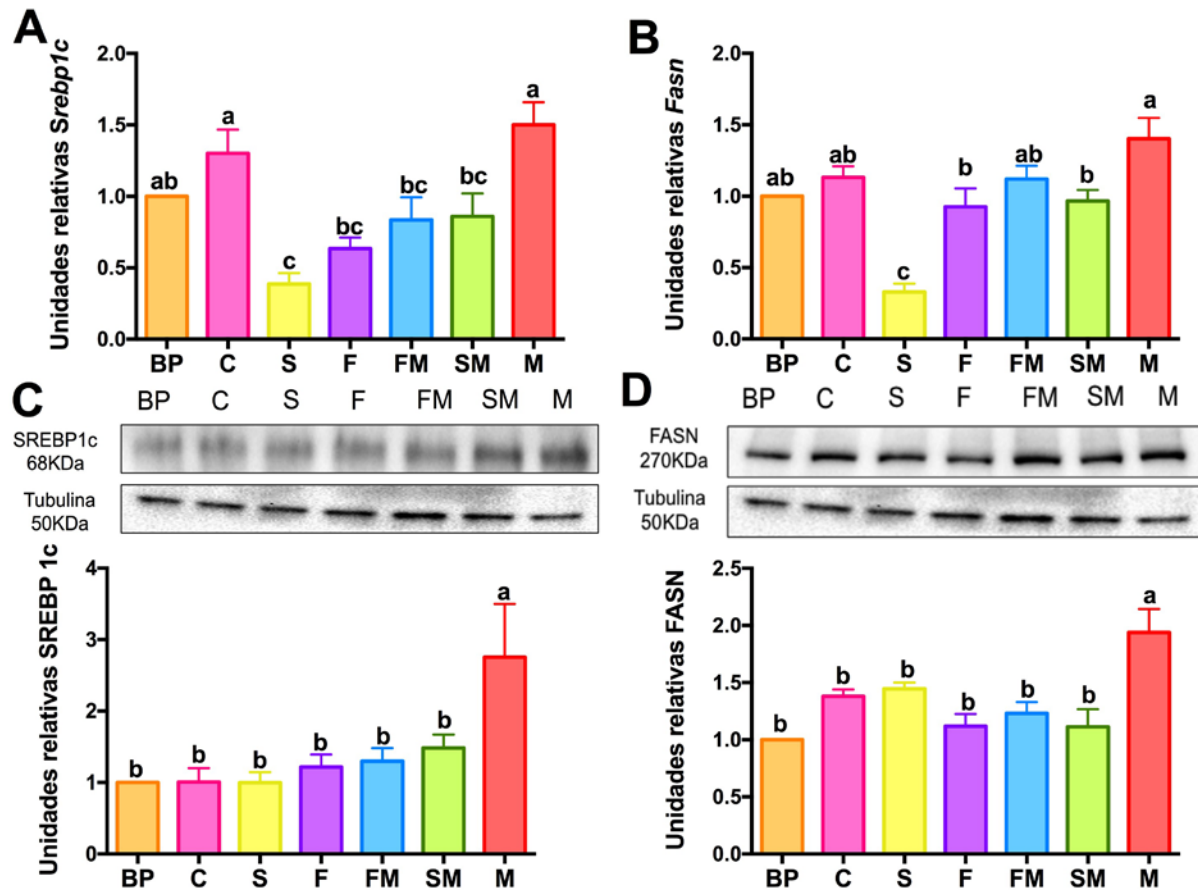


Figura 29. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de SREBP1c y FASN en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína

Abundancia de mRNA de: (A) *Srebp1c*, (B) *Fasn*. Abundancia de proteína y western blot representativo de: (C) SREBP1c, (D) FASN. Los valores son las medias \pm ESM, n= 3 por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soja + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Expresión de SNAT2

La expresión de SNAT2 incrementa cuando hay una disminución de los niveles de aminoácidos (Palii et al., 2004). La cantidad de mRNA de *Snat2* incrementó significativamente ($P < 0.05$) en las ratas alimentadas con SM y M después de un día de consumir las dietas con el aporte adecuado de proteína (Figura 31A), después de 14 días de consumir las dietas experimentales hay una disminución significativa en el mRNA de *Snat2* ($P < 0.05$) (Figura 31B), sin importar el tipo de proteína dietaria.

La abundancia de proteína de SNAT2 no se regula por el tipo de proteína dietaria (Figura 31C). Al determinar la expresión promedio de SNAT2 se observa que está elevada significativamente ($P < 0.05$) después de un día y disminuye después de siete y 14 días de consumir las dietas (Figura 30 y Figura 31D).

Lo anterior concuerda con lo observado en el estudio 1, de que la expresión del transceptor de aminoácidos SNAT2 tiene una regulación adaptativa en relación al estado nutricional (Tanaka et al., 2005).

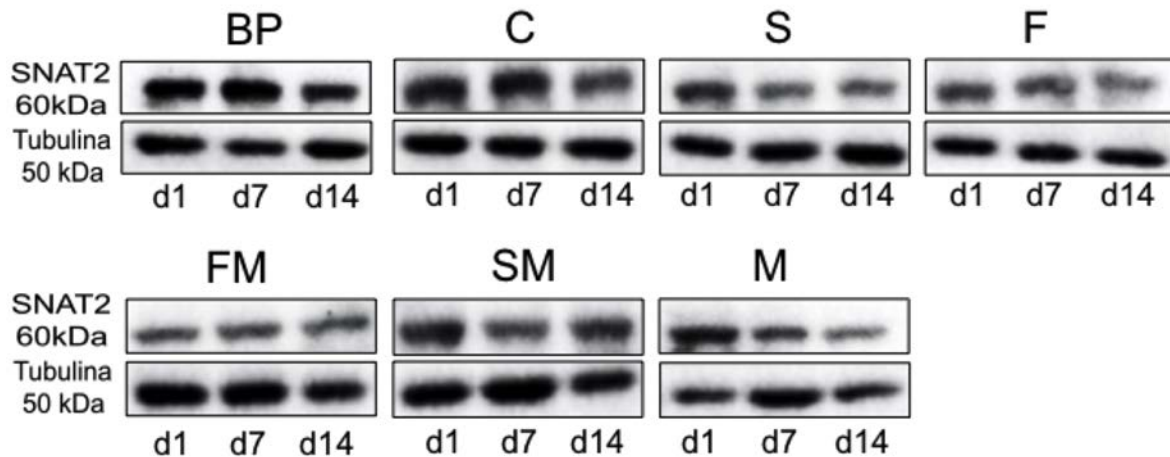


Figura 30. Western blot representativo de SNAT2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

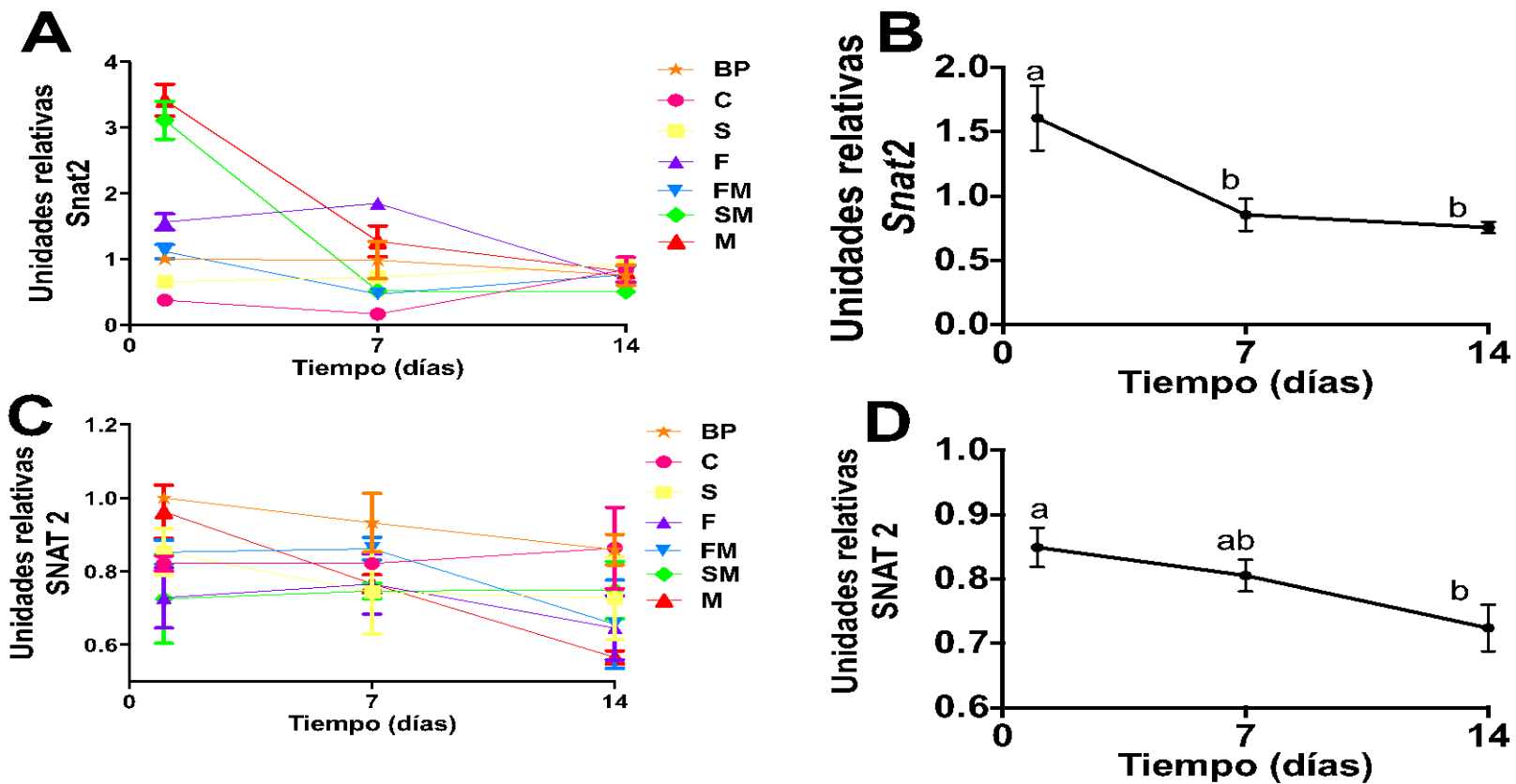


Figura 31. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de SNAT2 en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína

(A) abundancia de mRNA de *Snat2*, (B) abundancia de mRNA promedio de *Snat2*, (C) abundancia de proteína SNAT2 (D) abundancia promedio de SNAT2. Los valores son las medias \pm ESM, $n = 3$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a > b > c$), $P < 0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

Expresión de GCN2 y eIF2 α en hígado

Ratas alimentadas con M presentaron la mayor expresión de GCN2 después de siete y 14 días de consumir las dietas con aporte adecuado de proteína ($P < 0.05$), mientras que las ratas alimentadas con C, S, F, FM y SM presentaron la menor expresión de GCN2 (Figura 34A). A pesar del aumento observado en la expresión de GNC2 en todos lo grupos (Figura 32), no se observó fosforilación de su proteína blanco eIF2 α (Figura 33). Lo anterior indica que el modelo empleado no genera un déficit en la concentración de aminoácidos tal que active a GCN2 y a su blanco.

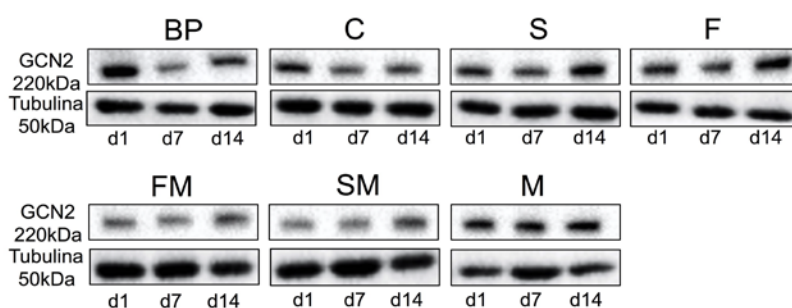


Figura 32. Western blot representativo de GCN2 de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soja + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

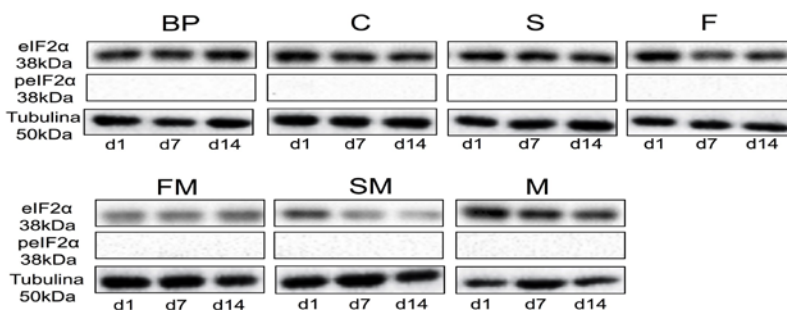


Figura 33. Western blot representativo de eIF2 α de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas después de un periodo de alimentación restringida en proteína

BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soja; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soja + proteína de maíz; M: proteína de maíz.

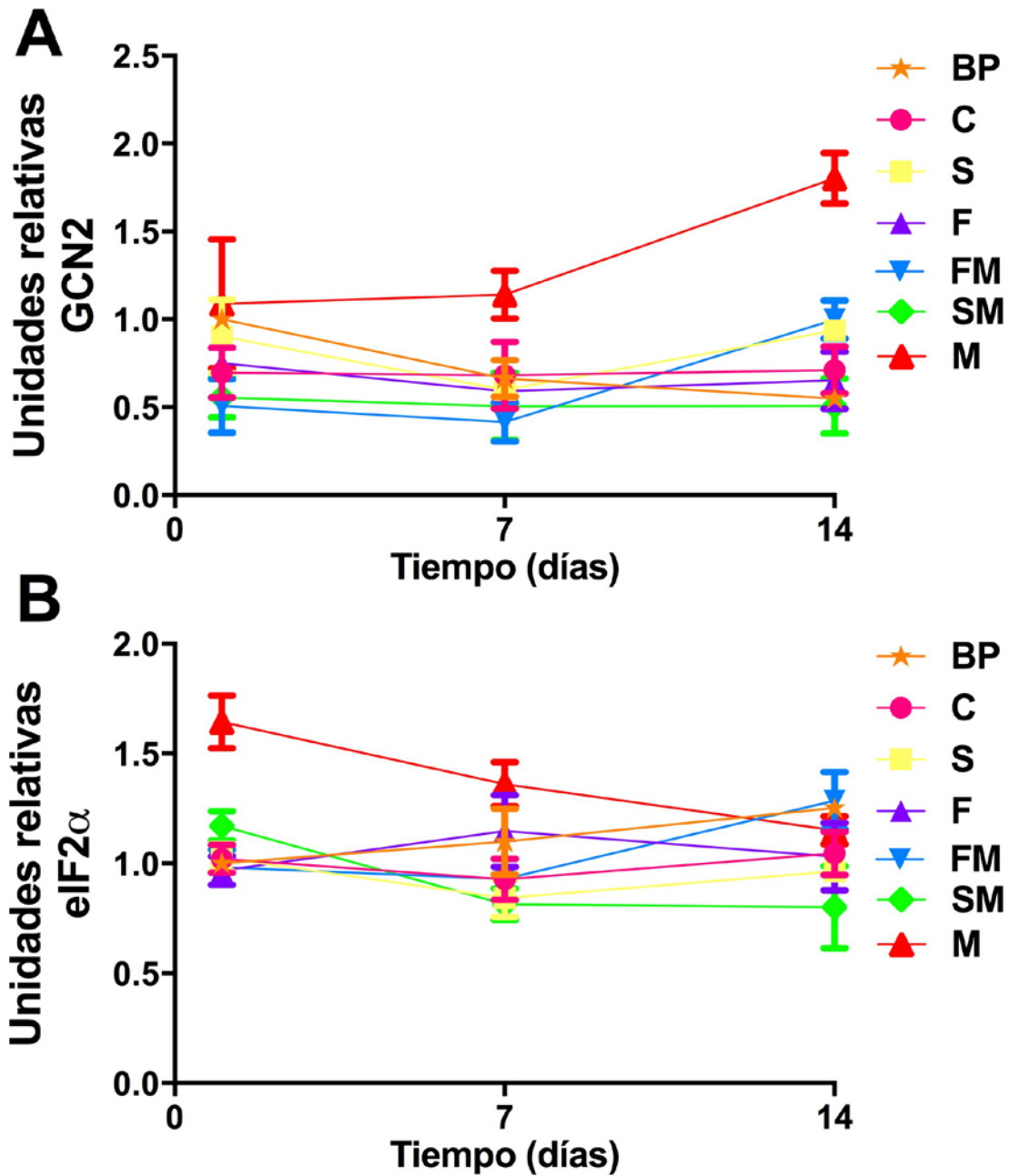


Figura 34. Efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias sobre la expresión de GCN2 y eIF2 α después de un periodo de alimentación restringida en proteína (A) Abundancia de proteína de GCN2 (B) Abundancia de proteína eIF2 α . Los valores son las medias \pm ESM, n= 3 por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes (a>b>c), $P<0.05$. BP: 0.5% caseína; C: caseína ; S: proteína aislada de soya; F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025; FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 + proteína de maíz; SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz; M: proteína de maíz

Determinación de perfiles polisomales en hígado

La síntesis de proteínas es un proceso altamente regulado que se divide en los pasos de inicio, elongación y terminación (Jackson et al., 2010). En particular el inicio de la traducción involucra la actividad de varios factores de inicio de la traducción que favorecen la formación del complejo 80S (monosoma), en donde la síntesis de proteínas se lleva a cabo. Varios monosomas 80S se pueden unir al mismo mRNA simultáneamente, formando un complejo llamado polisoma.

Los perfiles polisomales se usan para determinar cambios en la traducción de mRNA en el paso de inicio de la traducción (Coudert et al., 2014). La cantidad de aminoácidos esenciales en la dieta regula la formación de polisomales en hígado (Yokogoshi y Yoshida, 1980) y la falta de nutrimentos tiene un papel importante en la tasa de síntesis de proteínas en hígado (Efeyan et al., 2015).

Se determinaron los perfiles polisomales en hígado después de un día de consumir las dietas de recuperación, ya que es en este día cuando se observa la mayor activación de la ruta de mTORC1. Los perfiles polisomales se usan para determinar cambios en el inicio de la traducción. En ratas en ayuno la síntesis de proteínas disminuye y durante la transición entre ayuno y postprandio la cantidad de mRNA traducido aumenta (Reiter et al., 2005).

En general se observa un aumento en la formación de polisomas en todos los grupos experimentales con excepción del grupo alimentado con BP. Las ratas alimentadas con SM, FM y S presentan la mayor formación de polisomas ($P < 0.05$) (Figura 36H).

Como se mencionó anteriormente el inicio de la traducción depende de varios factores de inicio de la traducción. Uno de estos factores es eIF4G, involucrado en la formación del complejo eIF4F que favorece el inicio de la traducción dependiente de cap (Jackson et al., 2010), se ha reportado que eIF4G disminuye durante el ayuno en hígado de ratas y que aumenta significativamente en el postprandio (Anand y Gruppuso, 2005).

De acuerdo a lo anterior se puede decir que el incremento observado en la abundancia de eIF4G y de la ruta de señalización de mTORC1 en hígado ocasionado por el consumo de FM y SM se relaciona con el aumento en la formación de polisomas, lo que indica que el consumo de estas mezclas favorece la síntesis de proteínas en hígado después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

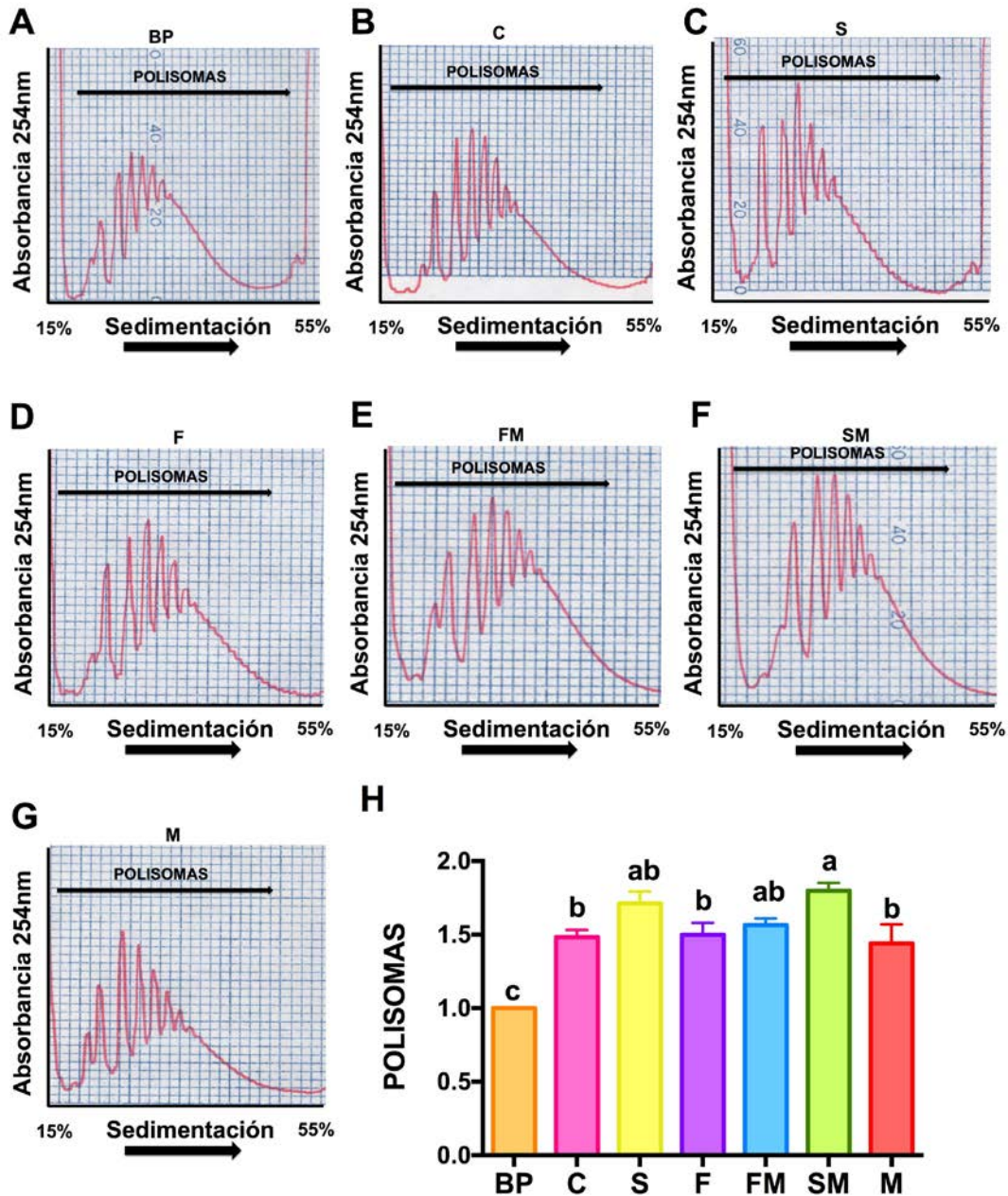


Figura 35. Perfiles polisomales de hígado de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteínas dietarias después de un periodo de alimentación restringida en proteína

- (A) **BP**: 0.5% caseína, (B) **C**: caseína, (C) **S**: proteína aislada de soya, (D) **F**: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025, (E) **FM**: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP-8025 y proteína de maíz, (F) **SM**: proteína aislada de soya proteína de maíz, (G) **M**: proteína de maíz, (H) análisis de área bajo la curva. Los valores son las medias \pm ESM, $n=3$ por grupo. Las diferencias estadísticas se indican con letras diferentes ($a>b>c$), $P<0.05$.

Discusión

La creciente demanda mundial de productos de origen animal (carne, leche y huevo) ha provocado un aumento significativo en la producción ganadera y avícola. Lo que trae como consecuencia un alto impacto al ambiente, ya que una gran cantidad de recursos naturales como agua y suelo se destinan a estas industrias. Debido a lo anterior y como una opción para disminuir el daño al ambiente se debe impulsar la producción y el consumo de proteínas de origen vegetal, ya que requieren menos insumos (van Vliet et al., 2015).

Adicionalmente el consumo de proteínas origen vegetal se ha relacionado con una reducción del riesgo cardiovascular (Richter et al., 2015), en el desarrollo de enfermedades crónicas (Hu, 2003) y como tratamiento para combatir la desnutrición (Bressani et al., 1959).

Sin embargo, existe poca información sobre los mecanismos de acción a nivel molecular de la proteína dietaria y cuáles pudieran ser sus sensores de ésta. Se planteó estudiar cuatro posibles sensores del tipo de proteína dietaria: cambios en la concentración de insulina, mTORC1, GCN2 y el transceptor de aminoácidos SNAT2. Para lo que se realizaron dos estudios, en el primer estudio se emplearon ratas sanas y en el segundo ratas recuperadas nutricionalmente después de un periodo de alimentación restringida en proteína.

Discusión estudio 1

Se observó que la calidad de la proteína dietaria, tiene un rol importante en el desarrollo de animales en la etapa de crecimiento. En particular los grupos alimentados con proteínas de buena calidad (C, S, F, Ch y FM) presentaron una buena ganancia de peso en comparación a las proteínas de baja calidad química (M, A y E).

Los parámetros bioquímicos determinados en este estudio se encuentran dentro de valores normales. Sin embargo se observó que las ratas alimentadas con Ch, considerada una proteína de buena calidad, incrementa la concentración de

glucosa en suero después de 60 minutos de consumir las dietas experimentales, en igual proporción que las ratas alimentadas con A y M (mala calidad). Razón por la cual no se optó por continuar trabajando con esta fuente de proteína.

Se ha demostrado que la proteína de soya regula la secreción de insulina, mientras que las proteínas de origen animal incrementan su secreción (Noriega-Lopez et al., 2007). Lo anterior indicaría que probablemente el consumo de otras proteínas de origen vegetal tendrían un efecto similar a la proteína de soya; sin embargo las ratas alimentadas con A presentan la mayor concentración de insulina en suero (Tabla 9), lo que indicaría que probablemente la secreción de insulina se debe al patrón de aminoácidos y no al tipo de proteína dietaria.

Otro parámetro bioquímico importante es la concentración de homocisteína en suero, ya que es un indicativo de riesgo cardiovascular. La homocisteína se obtiene a partir del metabolismo de la metionina (Sánchez et al., 2009). En el estudio uno se observa que después de 90 y 120 minutos de consumir la dieta experimental, las ratas alimentadas con C presentaron 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 (Sánchez et al., 2009). Mientras que el resto de las ratas alimentadas con las proteínas de origen vegetal sin importar su calidad presentaron 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 la caseína.

Un factor importante además del patrón de aminoácidos de las fuentes de proteínas dietarias que se debe considerar es la presencia de péptidos bioactivos, que son pequeños fragmentos de proteínas derivados de la hidrólisis de las proteínas dietarias (Lule et al., 2015) por ejemplo, péptidos obtenidos de frijol común, a través de la hidrólisis con pepsina, tienen actividad anti-inflamatoria, anti-hipertensiva, antioxidante entre otras (Mojica et al., 2016).

Por ejemplo, el lunasin es un péptido obtenido de la proteína de soya, compuesto de 43 aminoácidos y con un peso molecular de 5.5 kDa con propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y tiene un papel importante en la regulación de la biosíntesis de colesterol en el cuerpo (Lule et al., 2015).

Así que tomando en cuenta la evidencia de los efectos benéficos de péptidos bioactivos en la regulación de ciertos parámetros bioquímicos no se descarta la posibilidad que los resultados observados en la concentración de parámetros bioquímicos este influenciada por posible péptidos bioactivos formados durante la digestión de las proteínas dietarias.

En el presente estudio no se caracterizaron péptidos bioactivos presentes formados durante la digestión de las proteínas dietarias, lo que abre una línea de investigación interesante que puede brindar más información sobre los efectos benéficos del consumo de proteínas vegetales.

El transportador de aminoácidos SNAT2 tiene una regulación adaptativa de acuerdo al estado nutricional (Tanaka et al., 2005), lo cual se observa en los resultados obtenidos en el estudio uno ya que se presenta un incremento de la expresión de SNAT2 cuando las ratas se encuentran en ayuno y disminuye después de consumir las dietas experimentales, lo que indica que la expresión de SNAT2 no depende de la calidad de la proteína dietaria.

Para el caso de GCN2, cinasa de eIF2 α (Guo y Cavener, 2007), se observó que la abundancia de esta proteína incrementaba ligeramente cuando las ratas se alimentabas con proteínas de buena calidad (C, S, F, Ch y FM), sin embargo este incremento no fue significativo. Probablemente lo anterior se debe a que no se generó la condición necesaria para la activación de GCN2 (Gallinetti et al., 2013).

La ruta de señalización de mTORC1 es altamente regulada por factores de crecimiento y por aminoácidos, en particular la leucina y la arginina (Laplante y Sabatini, 2012, Bar-Peled y Sabatini, 2014). Las ratas alimentadas con M (que contiene la mayor concentración de leucina 192.0 mg/g proteína) presentan la

menor fosforilación de mTOR; mientras que las ratas alimentadas con FM presentan la mayor abundancia de mTOR fosforilado. Esto indica que además de la leucina es necesario tener otros factores para favorecer la actividad de mTORC1.

De igual manera se observó que cuando las ratas consumían dietas de mala calidad (M, A y E) había una disminución en la abundancia de S6K1 fosforilado y eIF4G en relación a los grupos alimentados con proteínas de buena calidad. Lo anterior es un indicativo de que la calidad de la proteína dietaria está involucrada en la regulación de la actividad de mTORC1 y en la activación de sus blancos.

En conjunto los resultados obtenidos indican que el consumo de proteínas de buena calidad (C, S, Ch) y la combinación de FM tienen un papel importante en el proceso de síntesis de proteínas en ratas sanas, al aumentar la expresión de mTORC1, S6K1 y del eIF4G, mientras que las ratas alimentadas con E, A y M, proteínas de mala calidad, presentan una disminución en la expresión de estas proteínas (Figura 36).

Lo anterior permitió establecer que la ruta de mTORC1 es sensible al tipo de proteína dietaria, y dio las bases para definir un experimento en donde se evaluó el efecto de diferentes tipos de proteínas dietarias y la combinación de proteínas como proteína aislada de soya + proteína de maíz y proteína concentrada de frijol + proteína de maíz sobre la recuperación y ganancia de peso, así como en la activación de la ruta de mTORC1 después de un periodo de alimentación restringida en proteína, lo que generó un modelo de malnutrición.

Se entiende por malnutrición una nutrición deficiente o desequilibrada debido a una dieta pobre o excesiva. Una consecuencia a largo plazo de consumir dietas deficientes en macronutrientes es el desarrollo de desnutrición. La desnutrición es un problema que afecta aproximadamente a 795 millones de individuos a nivel mundial.

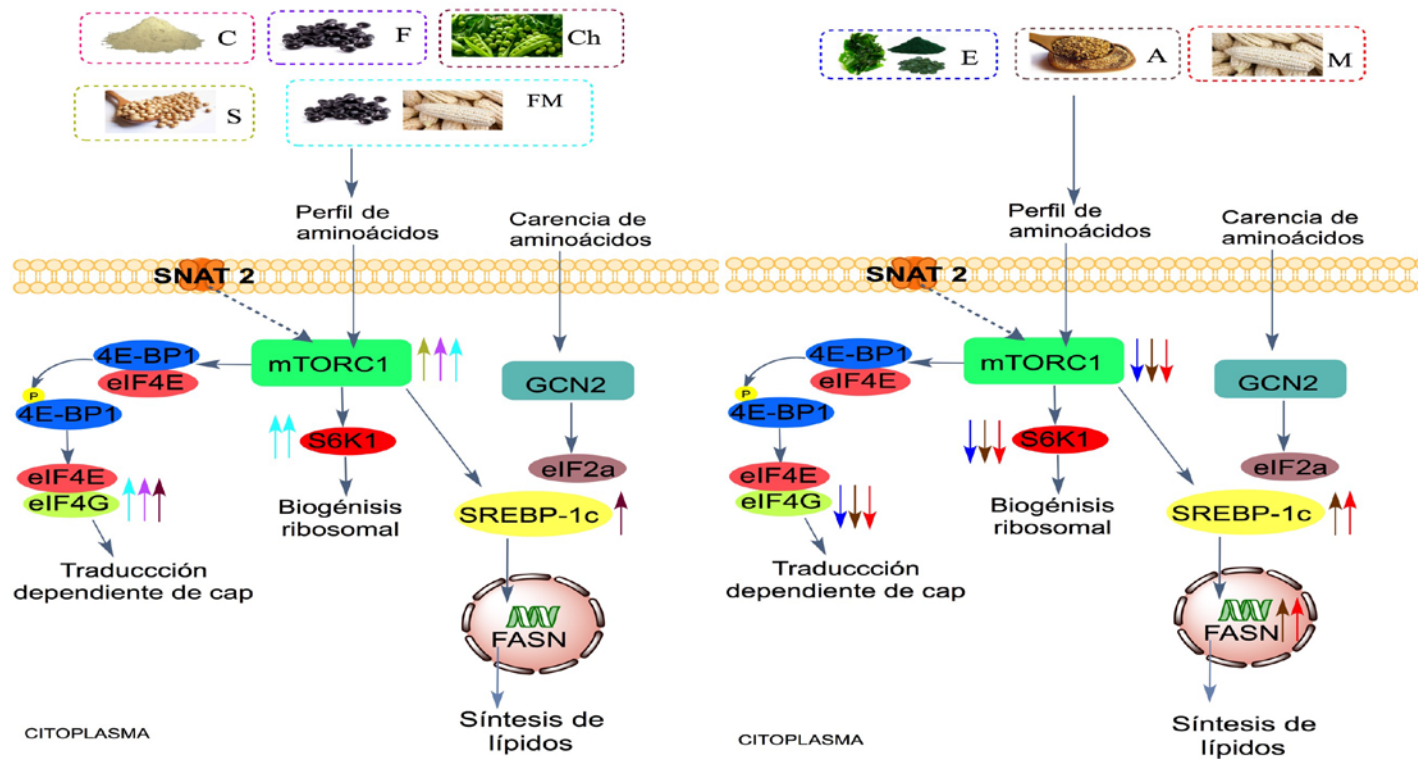


Figura 36. Efecto de diferentes tipos de proteínas sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1, eIF4G y expresión de SREBP1c y FASN en hígado de ratas sanas

Discusión estudio 2

En el estudio dos se desarrolló un modelo animal alimentado con una dieta restringida en proteína, él cual posteriormente fue alimentado con dietas con un contenido adecuado de proteína. Se observó que los animales que presentaron la mejor recuperación y ganancia de peso así como un incremento en la cantidad de aminoácido esenciales (AAE) en suero fueron los alimentados con C, S, FM y SM.

Es importante resaltar que el aumento en la cantidad de aminoácidos esenciales (AAE) en suero no necesariamente se relaciona con el consumo de una proteína de buena calidad, ya que los aminoácidos esenciales tienen un papel importante en la ganancia de peso como se puede observar en las ratas alimentadas con M, que presentan un aumento en la cantidad de aminoácido esenciales (AAE) en suero pero una menor ganancia de peso en comparación a los otros grupos experimentales (Tabla 11 y Figura 21 B).

Los parámetros bioquímicos no variaron significativamente por los tratamientos, sin embargo es importante resaltar que las ratas alimentadas con C presentan hiperinsulinemia. Dicho incremento en la concentración de insulina no es un efecto deseable ya que la hiperinsulinemia se ha relacionado con el desarrollo de dislipidemias, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Kelly et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente en el caso de la regulación de los parámetros bioquímicos no se descarta el efecto de compuestos bioactivos, como los péptidos, así que los cambios observados no se pueden atribuir únicamente al efecto de aminoácidos individuales.

En relación a la expresión de SNAT2 el estudio dos se corroboraron los resultados obtenidos en el estudio uno, es decir, que SNAT2 tiene una regulación adaptativa al estado nutricional (Tanaka et al., 2005). De igual manera en el caso de la expresión de GNC2, se observa una ligera regulación debido al consumo de las proteínas dietarias y en el caso de su proteína blanco eIF2 α no se observa fosforilación. Lo anterior indica que la cinasa GCN2 no se está activando, es decir, no hay tRNAs sin cargar en el citoplasma (Guo y Cavener, 2007). En general se

puede decir que los modelos experimentales empleados no generan un déficit de aminoácidos tal que se active a GCN2 y su proteína blanco.

El proceso de síntesis de proteínas es un proceso altamente regulado que se divide en los pasos de inicio, elongación y terminación (Jackson et al., 2010). Como se mencionó anteriormente mTORC1 se encuentra involucrado en el proceso de síntesis de proteínas, a través de la biogénesis ribosomal por medio de S6K1 y favoreciendo la formación eIF4F para iniciar la traducción dependiente de cap (Proud, 2002, Laplante y Sabatini, 2012).

En el estudio dos se evaluó el efecto de dietas con aporte adecuado de proteínas (20%) después de un periodo de alimentación restringida en proteína sobre la activación de la ruta de señalización de mTORC1 en hígado y músculo. Se observó una tendencia similar en estos tejidos, es decir, las ratas alimentadas con S, FM y SM presentaron la mayor expresión de la ruta de mTORC, sin embargo la principal diferencia fue el periodo de tiempo en que esto sucedió (Figura 26 y 28).

Para el hígado el periodo de tiempo en donde se observó la máxima activación de mTORC1, medida a través de un aumento en S6K1 fosforilado y en la abundancia del eIF4G, fue un día de alimentación con las dietas de FM y SM, lo que concuerda con lo observado en el estudio uno, es decir, que la combinación de proteínas de cereales y leguminosas favorece la expresión de la ruta de mTORC1.

La rápida respuesta observada en la activación de mTORC1 en hígado, coincide con lo reportado previamente por Anand en el 2005, en donde al alimentar ratas durante una hora, después de un ayuno prolongado, se observa un aumento significativo en S6K1 fosforilado y en la abundancia de eIF4G (Anand y Gruppuso, 2005).

Mientras que en el músculo el periodo de tiempo fue de siete días. Probablemente las diferencias en el tiempo de activación de la ruta de mTORC1 en hígado y músculo se deban al recambio proteico que se da en estos tejidos. El recambio

proteico es un proceso más rápido en hígado (77%/día) mientras que en músculo es de 12%/día (Millward et al., 1975, Garlick et al., 1976, Poupin et al., 2013).

En relación a la regulación del proceso de síntesis de proteínas, mediante una técnica que permite determinar el perfil polisomal se pueden evaluar cambios en el inicio de la traducción (Coudert et al., 2014). La formación de polisomas en hígado se regula por la cantidad de aminoácidos esenciales (Yokogoshi y Yoshida, 1980). Se determinó la formación de polisomas en hígado de ratas después de un día de consumir las dietas con el aporte adecuado de proteína y se observó que las ratas alimentadas con S, SM, FM presentan el mayor incremento en el perfil polisomal, mientras que las ratas alimentadas con M presentan el menor incremento de dicho perfil en relación a las ratas alimentadas con BP. Estos resultados concuerdan con los valores obtenidos de aminoácidos esenciales en suero (AAE), es decir, a un mejor contenido de AAE hay un mejor perfil polisomal y por lo tanto se está favoreciendo el inicio de la traducción.

En conjunto los resultados obtenidos indican, al igual que en el estudio uno que la expresión de mTORC1, S6K1 y eIF4G aumenta significativamente con las ratas alimentadas con FM y SM, mientras que las ratas alimentadas con M presentan una menor expresión de éstas proteínas y un aumento significativo en la expresión de genes lipogénicos (SREBP1c y FASN) (Figura 37).

De los resultados del presente estudio permite poner de manifiesto la importancia del consumo de frijol y maíz en la dieta del mexicano, tal como lo hacían nuestros antepasados desde la época prehispánica en donde la base de su alimentación era el maíz, frijol, calabaza, entre otros (Iturriaga, 2000). Por lo tanto es necesario volver a impulsar el consumo de alimentos tradicionales mexicanos, que desde luego tendrían un posible efecto benéfico para la salud.

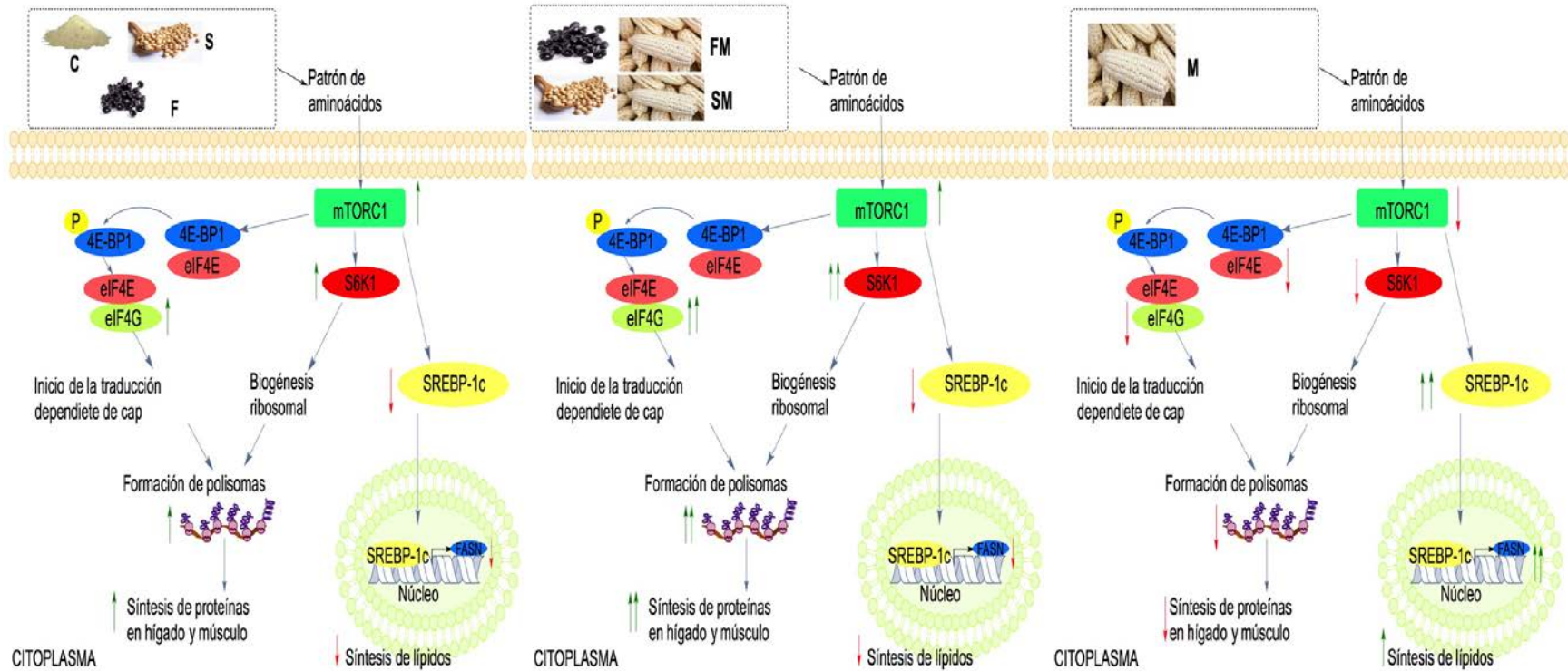


Figura 37. Efecto de diferentes tipos de proteínas sobre la expresión de la ruta de señalización de mTORC1, eIF4G, formación de polisomas hepáticos y expresión de SREBP1c y FASN después de un periodo de alimentación restringida en proteína

Conclusiones

El consumo de proteínas dietarias con una buena calificación química (C, S, F) así como la combinación de proteínas (FM, SM) favorecen la ganancia de peso de ratas sanas y la recuperación de peso perdido en ratas después de periodo de alimentación restringida en proteína, lo que indica que la combinación de proteínas de leguminosas y cereales son un buen tratamiento de rehabilitación nutricional.

No se puede considerar los cambios en la concentración de insulina como un sensor del tipo de proteína dietaria, ya que se observó en ratas sanas, que la concentración de insulina incrementaba cuando consumían C y A, proteína de origen animal de buena calidad y proteína de origen vegetal de mala calidad respectivamente, por lo tanto probablemente la secreción de insulina se regula por otros factores.

Por otro lado, el consumo de proteínas de mala calidad como el M, A y E favorece la expresión de genes lipogénicos (SREBP1c y FASN), mientras que el consumo de proteínas de buena calidad o la mezcla de proteínas disminuye la expresión de éstos genes, tanto en ratas sanas como desnutridas. Lo que indica que la calidad de la proteínas tiene un rol importante en la regulación de la lipogénesis.

El transceptor de aminoácidos SNAT2 no es regulado por el tipo o la calidad de la proteína dietaria, éste sufre una regulación adaptativa de acuerdo al estado nutricional, es decir, incrementa en el ayuno y disminuye en el postprandio. Debido a lo anterior SNAT2 no se considera como un sensor del tipo de proteína dietaria.

De igual manera no se puede considerar a GCN2 como un sensor del tipo de proteína dietaria, ya que la abundancia de esta cinasa no se modificó por el tipo de proteína dietaria suministrada. Finalmente mTORC1 se puede considerar como un posible sensor del tipo de proteína dietaria, ya que la actividad de éste y de sus blancos incremento significativamente cuando se alimentaban ratas ,ya fueran sanas o después de un periodo de alimentación restringida en proteína, con S, FM y SM.

Perspectivas

La evidencia generada en este estudio soporta la importancia de estudiar el efecto de diferentes fuentes de proteínas vegetales sobre la ganancia de peso y regulación de la ruta de señalización de mTORC1 en modelos animales sanos y desnutridos.

Es por ello que, entre las perspectivas que le suceden a este trabajo están estudiar las repercusiones de las diferentes fuentes de proteínas vegetales en modelos animales con obesidad inducida por dieta.

Además, para continuar con el estudio del efecto de las proteínas vegetales sobre la síntesis de proteínas, se plantea hacer cultivos *in vitro* con el perfil de aminoácidos en suero de cada dieta para determinar el efecto de estos en el proceso general de traducción.

Adicionalmente, convendría emplear diferentes fuentes de proteínas de origen animal y vegetal para profundizar el conocimiento sobre el mecanismo de acción de diferentes fuentes de proteínas sobre la ruta de señalización de mTORC1 y síntesis de proteínas.

Glosario

#

4EBP1 : proteína de unión a eIF4E.

A

A: proteína aislada de ajonjolí.

AACR: aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina).

AAE: aminoácidos esenciales (treonina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, lisina, arginina e histidina).

Akt: proteína cinasa b

ATF4: factor de transcripción activador 4.

ATF5: factor de transcripción activador 5.

B

BP: dieta baja en proteína (0.5% caseína).

C

C: caseína.

Cap: “capuchón” se refiere a la adición de un nucleótido modificado de guanina (7-metilguaosina trifosfato) al extremo 5' del mRNA.

Ch: proteína aislada de chícharo.

CQ: calificación química de una proteína dietaria, que se define como la deficiencia relativa del primer aminoácido limitante de una fuente de proteína en relación a una proteína patrón.

D

Deoxicolato de sodio: es una base conjugada de deoxicolato, es un detergente empleado para el aislamiento de proteínas.

Deptor: proteína que interacciona con mTOR que contiene un dominio Dep y esta proteína inhibe la actividad cinasa de mTORC1 y mTORC2 .

E

E: espirulina

eEF2K: factor de elongación 2 en eucariontes.

eIF2 α : factor de inicio de la traducción 2 alfa en eucariontes.

eIF3: factor de inicio de la traducción 3 en eucariontes.

eIF4A: factor de inicio de la traducción 4 E en eucariontes.

eIF4E: factor de inicio de la traducción 4 E en eucariontes.

eIF4F: factor de inicio de la traducción 4F en eucariontes.

eIF4G: factor de inicio de traducción eucariotico 4G.

F

F: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP – 8025.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FASN: sintasa de ácidos grasos.

FM: proteína concentrada de frijol negro variedad INIFAP – 8025 + proteína de maíz.

G

GADD34: proteína de disminución de crecimiento y daño inducible de DNA 34 .

GCN2: control general no desrepresible.

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina.

I

IFAD: Fundación Internacional para el Desarrollo de la Agricultura.

IRS: sustrato receptor de insulina.

M

M: proteína de maíz.

Met-tRNA^{Met}: RNA de transferencia unido a metionina, para el inicio de la traducción.

mLST8: proteína 8 mamífera letal con Sec13 y puede contribuir a la estabilidad del complejo,

Monosoma: ribosoma 80S competente para llevar a cabo el proceso de traducción.

mRNA: RNA mensajero.

mSin1: es la proteína cinasa de mamíferos activada por estrés y es necesaria para la estabilidad y actividad del complejo.

mTORC1: Blanco mecanístico de rapamicina 1.

mTORC2: blanco mecanístico de rapamicina 2.

N

NP-40: Detergente empleado para hidrolizar las membranas de una célula incluyendo la membrana nuclear.

O

OMS/WHO: organización mundial de la Salud.

P

PDK1: cinasa dependiente de fosfoinositidos -1.

PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa.

PIP₂: lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PIP₃: lípido de membrana fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.

Polisoma: conjunto de ribosomas asociados a una molécula de mRNA para realizar la traducción simultánea de una misma proteína.

PP1: proteína fosfatasa 1.

PRAS40: sustrato de AKT rico en prolina de 40kDa, la cual se ha identificado como un regulador negativo de mTORC1, y

Protector: es la proteína observada con Rictor.

pS6K1: fosforilación de la cinasa ribosomal 1 S6.

R

Ragulator: proteína localizada en la membrana del lisosoma involucrada en la regulación de aminoácidos por mTORC1.

Raptor: proteína regulatoria asociada a mTOR y se encarga de unir mTOR a sus sustratos.

Rheb: homólogo de Ras enriquecido en cerebro.

Rictor: compañero insensible a rapamicina de mTORC y es necesaria para la estabilidad y actividad del complejo.

rRNA: RNA ribosomal.

Rag: proteína de unión de GTP.

S

S: proteína aislada de soya.

S6K1: cinasa ribosomal 1 S6.

Sistema L: transportador que opera como un intercambiador 1:1 de aminoácidos que puede acoplar la captura de aminoácidos ramificados con la salida de aminoácidos citoplasmáticos como la glutamina

SLC38: familia de transportadores dependientes de sodio.

SM: proteína aislada de soya + proteína de maíz.

SNAT 2: Transportador de aminoácidos neutros acoplados a sodio 2.

SREBP1C: proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides.

T

TBC1D7: miembro 7 con dominio Tre2-Bub2-Cdc16-1.

tRNA: RNA de transferencia.

TSC: complejo de esclerosis tuberosa.

TSC1: hamartina.

TSC2: tuberina.

Bibliografia

- Abo-Shady, A. M., S. M. Abou-El-Souod, A. El-Raheem, R. El-Shanshoury and Y. A. Mahmoud (1992). "Protoplasts from the cyanobacterium, *Spirulina platensis*." *World J Microbiol Biotechnol* **8**(4): 385-386.
- Aitken, C. E. and J. R. Lorsch (2012). "A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes." *Nat Struct Mol Biol* **19**(6): 568-576.
- Anand, P. and P. A. Gruppuso (2005). "The regulation of hepatic protein synthesis during fasting in the rat." *J Biol Chem* **280**(16): 16427-16436.
- Averous, J., S. Lambert-Langlais, Y. Cherasse, V. Carraro, L. Parry, W. B'Chir, C. Jousse, A. C. Maurin, A. Bruhat and P. Fafournoux (2011). "Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene p8 via the GCN2/ATF4 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **413**(1): 24-29.
- Avruch, J., X. Long, S. Ortiz-Vega, J. Rapley, A. Papageorgiou and N. Dai (2009). "Amino acid regulation of TOR complex 1." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E592-602.
- Ball, R. O., K. L. Urschel and P. B. Pencharz (2007). "Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism." *J Nutr* **137**(6 Suppl 2): 1626S-1641S.
- Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." *Nature* **226**(5252): 1209-1211.
- Bar-Peled, L. and D. M. Sabatini (2014). "Regulation of mTORC1 by amino acids." *Trends Cell Biol* **24**(7): 400-406.
- Bayol, S., D. Jones, G. Goldspink and N. C. Stickland (2004). "The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth." *Br J Nutr* **91**(3): 331-339.
- Bernadier, C. D. and N. Moustaid-Moussam (2004). *Genomics and Proteomics in Nutrition*, Marcel Dekker.
- Bhaskar, P. T. and N. Hay (2007). "The two TORCs and Akt." *Dev Cell* **12**(4): 487-502.
- Bressani, R., A. Aguirre and N. S. Scrimshaw (1959). "All-vegetable protein mixtures for human feeding. II. The nutritive value of corn, sorghum, rice and buckwheat

substituted for lime-treated corn in INCAP vegetable mixture eight." *J Nutr* **69**: 351-355.

Bressani, R., N. S. Scrimshaw, M. Behar and F. Viteri (1958). "Supplementation of cereal proteins with amino acids. II. Effect of amino acid supplementation of corn-masa at intermediate levels of protein intake on the nitrogen retention of young children." *J Nutr* **66**(4): 501-513.

Broer, S. (2014). "The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters." *Pflugers Arch* **466**(1): 155-172.

Canfield, L. M. and F. Chytil (1978). "Effect of low lysine diet on rat liver nuclear metabolism." *J Nutr* **108**(8): 1336-1342.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.

Coudert, L., P. Adjibade and R. Mazroui (2014). "Analysis of translation initiation during stress conditions by polysome profiling." *J Vis Exp*(87).

Dennis, M. D., J. I. Baum, S. R. Kimball and L. S. Jefferson (2011). "Mechanisms involved in the coordinate regulation of mTORC1 by insulin and amino acids." *J Biol Chem* **286**(10): 8287-8296.

Deval, C., C. Chaveroux, A. C. Maurin, Y. Cherasse, L. Parry, V. Carraro, D. Milenkovic, M. Ferrara, A. Bruhat, C. Jousse and P. Fafournoux (2009). "Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways." *FEBS J* **276**(3): 707-718.

Diaz-Villasenor, A., O. Granados, B. Gonzalez-Palacios, C. Tovar-Palacio, I. Torre-Villalvazo, V. Olivares-Garcia, N. Torres and A. R. Tovar (2013). "Differential modulation of the functionality of white adipose tissue of obese Zucker (*fa/fa*) rats by the type of protein and the amount and type of fat." *J Nutr Biochem* **24**(11): 1798-1809.

Dibble, C. C. and B. D. Manning (2013). "Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output." *Nat Cell Biol* **15**(6): 555-564.

- Dodd, K. M. and A. R. Tee (2012). "Leucine and mTORC1: a complex relationship." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(11): E1329-1342.
- Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre and F. Foufelle (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." *Biochimie* **86**(11): 839-848.
- Efeyan, A., W. C. Comb and D. M. Sabatini (2015). "Nutrient-sensing mechanisms and pathways." *Nature* **517**(7534): 302-310.
- Fafournoux, P., A. Bruhat and C. Jousse (2000). "Amino acid regulation of gene expression." *Biochem J* **351**(Pt 1): 1-12.
- FAO (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Roma, Italia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO, IFAD and WFP (2015). *The state of food in security in the world 2015*. Rome, FAO.
- Feskens, E. J., D. Sluik and G. J. van Woudenberg (2013). "Meat consumption, diabetes, and its complications." *Curr Diab Rep* **13**(2): 298-306.
- Ford, E. S., S. J. Smith, D. F. Stroup, K. K. Steinberg, P. W. Mueller and S. B. Thacker (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." *Int J Epidemiol* **31**(1): 59-70.
- Foster, K. G. and D. C. Fingar (2010). "Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony." *J Biol Chem* **285**(19): 14071-14077.
- Gallinetti, J., E. Harputlugil and J. R. Mitchell (2013). "Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR." *Biochem J* **449**(1): 1-10.
- Garlick, P. J., J. C. Waterlow and R. W. Swick (1976). "Measurement of protein turnover in rat liver. Analysis of the complex curve for decay of label in a mixture of proteins." *Biochem J* **156**(3): 657-663.
- Groenewoud, M. J. and F. J. Zwartkruis (2013). "Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1." *Biochem Soc Trans* **41**(4): 951-955.
- Guo, F. and D. R. Cavener (2007). "The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid." *Cell Metab* **5**(2): 103-114.

- Hargrove, R. E. and J. A. Alford (1977). "Growth Rate and Feed Efficiency of Rats Fed Yogurt and Other Fermented Milks." *J Dairy Sci* **61**: 11-19.
- Harper, A. E., N. J. Benevenga and R. M. Wohlhueter (1970). "Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids." *Physiol Rev* **50**(3): 428-558.
- Henderson, J. W., R. D. Ricker, B. A. Bidlingmeyer and C. Woodward (2000). *Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. A. Technology.*
- Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast." *Annu Rev Microbiol* **59**: 407-450.
- Hoekstra, A. Y. (2008). *The water footprint of food. Water for Food. Netherlands, Twente Water Centre, University of Twente.*
- Hoekstra, A. Y. (2014). "Water for animal products: a blind spot in water policy." *Environ Res Lett* **9**: 3.
- Horton, R. R., L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry and R. J. David (2008). *Principios de Bioquímico. México, Pearson Educación.*
- Hu, F. B. (2003). "Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview." *Am J Clin Nutr* **78**(3 Suppl): 544S-551S.
- Huang, K. and D. C. Fingar (2014). "Growing knowledge of the mTOR signaling network." *Semin Cell Dev Biol* **36**: 79-90.
- Hundal, H. S. and P. M. Taylor (2009). "Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E603-613.
- Hyde, R., P. M. Taylor and H. S. Hundal (2003). "Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells." *Biochem J* **373**(Pt 1): 1-18.
- Iadevaia, V., Y. Huo, Z. Zhang, L. J. Foster and C. G. Proud (2012). "Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis." *Biochem Soc Trans* **40**(1): 168-172.
- Iturriaga, J. (2000). *Las cocinas de México I. DF.*
- Jackson, R. J., C. U. Hellen and T. V. Pestova (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2): 113-127.

- Jewell, J. L. and K. L. Guan (2013). "Nutrient signaling to mTOR and cell growth." *Trends Biochem Sci* **38**(5): 233-242.
- Kagan, A. (1975). "Radioimmunoassay of insulin." *Semin Nucl Med* **5**(2): 183-188.
- Kelly, C. T., J. Mansoor, G. L. Dohm, W. H. Chapman, 3rd, J. R. t. Pender and W. J. Pories (2014). "Hyperinsulinemic syndrome: the metabolic syndrome is broader than you think." *Surgery* **156**(2): 405-411.
- Kilberg, M. S., J. Shan and N. Su (2009). "ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation." *Trends Endocrinol Metab* **20**(9): 436-443.
- Kim, E. (2009). "Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway." *Nutr Res Pract* **3**(1): 64-71.
- Kim, J. and K. L. Guan (2011). "Amino acid signaling in TOR activation." *Annu Rev Biochem* **80**: 1001-1032.
- Kritchevsky, D. (1976). "Diet and atherosclerosis." *Am J Pathol* **84**(3): 615-632.
- Kritchevsky, D. (1979). "Vegetable protein and atherosclerosis." *J Am Oil Chem Soc* **56**(3): 135-140.
- Kuntz, E. and H. D. Kuntz (2008). *Hepatology Textbook and Atlas*. Germany, Springer.
- Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2015). "Western blotting: an introduction." *Methods Mol Biol* **1312**: 17-30.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2009). "mTOR signaling at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 20): 3589-3594.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* **149**(2): 274-293.
- Li, S., M. S. Brown and J. L. Goldstein (2010). "Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(8): 3441-3446.
- Lieberthal, W. and J. S. Levine (2012). "Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway." *Am J Physiol Renal Physiol* **303**(1): F1-10.
- Liu, H., J. Y. Liu, X. Wu and J. T. Zhang (2010). "Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker." *Int J Biochem Mol Biol* **1**(1): 69-89.

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- López, G., I. Flores, A. Gálvez, M. Quirasco and A. Farrés (2003). "Development of a liquid nutritional supplement using a Sesamun indicum L protein isolate." *Lebensm Wiss U Technol* **36**: 67-74.
- Lule, V. K., S. Garg, S. D. Pophaly, Hitesh and S. K. Tomar (2015). "Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide." *J Food Sci* **80**(3): R485-494.
- Masek, T., L. Valasek and M. Pospisek (2011). "Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients." *Methods Mol Biol* **703**: 293-309.
- Masek, T., V. Vopalensky, P. Suchomelova and M. Pospisek (2005). "Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels." *Anal Biochem* **336**(1): 46-50.
- Maurin, A. C., A. Benani, A. Lorsignol, X. Brenachot, L. Parry, V. Carraro, C. Guissard, J. Averous, C. Jousse, A. Bruhat, C. Chaveroux, W. B'Chir, Y. Muranishi, D. Ron, L. Penicaud and P. Fafournoux (2014). "Hypothalamic eIF2alpha signaling regulates food intake." *Cell Rep* **6**(3): 438-444.
- Menéndez, A. and J. E. Fernández-Britto (1999). "Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis." *Rev Cubana Invest Biomed* **18**: 14.
- Michelfelder, A. J. (2009). "Soy: a complete source of protein." *Am Fam Physician* **79**(1): 43-47.
- Millward, D. J., P. J. Garlick, R. J. Stewart, D. O. Nnanyelugo and J. C. Waterlow (1975). "Skeletal-muscle growth and protein turnover." *Biochem J* **150**(2): 235-243.
- Mojica, L., D. A. Luna-Vital and E. G. de Mejia (2016). "Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress." *J Sci Food Agric*.
- Moran-Ramos, S., A. Avila-Nava, A. R. Tovar, J. Pedraza-Chaverri, P. Lopez-Romero and N. Torres (2012). "Opuntia ficus indica (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese Zucker (fa/fa) rats." *J Nutr* **142**(11): 1956-1963.
- Nolan, T., R. E. Hands and S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* **1**(3): 1559-1582.

- Noriega-Lopez, L., A. R. Tovar, M. Gonzalez-Granillo, R. Hernandez-Pando, B. Escalante, P. Santillan-Doherty and N. Torres (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**(28): 20657-20666.
- Olson, B. J. (2016). "Assays for Determination of Protein Concentration." *Curr Protoc Pharmacol* **73**: A 3A 1-A 3A 32.
- Otten, J. J., J. Hellwig and M. D. (2006). *Dietary References Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. United States of America, Institute of Medicine.
- Palii, S. S., H. Chen and M. S. Kilberg (2004). "Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element." *J Biol Chem* **279**(5): 3463-3471.
- Peach, M., N. Marsh, E. I. Miskiewicz and D. J. MacPhee (2015). "Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice." *Methods Mol Biol* **1312**: 49-60.
- Philbrick, D. J. and D. C. Hill (1974). "Development of malnutrition in rats." *Am J Clin Nutr* **27**(8): 813-818.
- Pinilla, J., J. C. Aledo, E. Cwiklinski, R. Hyde, P. M. Taylor and H. S. Hundal (2011). "SNAT2 transceptor signalling via mTOR: a role in cell growth and proliferation?" *Front Biosci (Elite Ed)* **3**: 1289-1299.
- Poupin, N., J. F. Huneau, F. Mariotti, D. Tome, C. Bos and H. Fouillet (2013). "Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**(3): R218-231.
- Proud, C. G. (2002). "Regulation of mammalian translation factors by nutrients." *Eur J Biochem* **269**(22): 5338-5349.
- Proud, C. G. (2004). "mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(2): 429-436.
- Quiñones Peña, M. A. (2010). *Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1*. Master, UNAM.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen and G. C. Fahey, Jr. (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**(11): 1939-1951.
- Reiter, A. K., S. J. Crozier, S. R. Kimball and L. S. Jefferson (2005). "Meal feeding alters translational control of gene expression in rat liver." J Nutr **135**(3): 367-375.
- Richter, C. K., A. C. Skulas-Ray, C. M. Champagne and P. M. Kris-Etherton (2015). "Plant Protein and Animal Proteins: Do They Differentially Affect Cardiovascular Disease Risk?" Adv Nutr **6**(6): 712-728.
- Rifai , N., R. Warnick and M. H. Dominiczak (2000). Handbook of lipoprotein testing. USA, American Association for Clinical Chemistry.
- Rifai, N. B., P.S. Alber, J.J. (1999). Lipids, lipoproteins and apolipoproteins, Ashwood.
- Salinas Ramírez, G. Y. (2014). Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos., UNAM.
- Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A. L. Markhard, S. Nada and D. M. Sabatini (2010). "Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids." Cell **141**(2): 290-303.
- Sánchez, M., S. P. Jiménez and J. S. Morgado (2009). "La homocisteína un aminoácido neurotóxico." REB **28**(1): 3-8.
- Schaafsma, G. (2000). "The protein digestibility-corrected amino acid score." J Nutr **130**(7): 1865S-1867S.
- Scrimshaw, N. S., R. Bressani, M. Behar and F. Viteri (1958). "Supplementation of cereal proteins with amino acids. I. Effect of amino acid supplementation of corn-masa at high levels of protein intake on the nitrogen retention of young children." J Nutr **66**(4): 485-499.
- Sen, M. and D. K. Bhattacharyya (2001). "Nutritional quality of sesame seed protein fraction extracted with isopropanol." J Agric Food Chem **49**(5): 2641-2646.
- SIAP (2012). Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. C. U. Miramontes Piña. México, D.F.
- SIAP (2015). Atlas Agroalimentario. México, D.F.: 204.

- Sinha, R., A. J. Cross, B. I. Graubard, M. F. Leitzmann and A. Schatzkin (2009). "Meat intake and mortality: a prospective study of over half a million people." *Arch Intern Med* **169**(6): 562-571.
- Spielmann, J., G. I. Stangl and K. Eder (2008). "Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **92**(6): 683-693.
- Steinfeld, H., P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales and C. Haan (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options.*
- Suzuki, T. and K. Inoki (2011). "Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**(9): 671-679.
- Tanaka, K., A. Yamamoto and T. Fujita (2005). "Functional expression and adaptive regulation of Na⁺-dependent neutral amino acid transporter SNAT2/ATA2 in normal human astrocytes under amino acid starved condition." *Neurosci Lett* **378**(2): 70-75.
- Tanphaichitr, V., M. S. Zaklana and H. P. Broquist (1976). "Dietary lysine and carnitine: relation to growth and fatty livers in rats." *J Nutr* **106**(1): 111-117.
- Taylor, P. M. (2009). "Amino acid transporters: eminences grises of nutrient signalling mechanisms?" *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 237-241.
- Taylor, P. M. (2012). "Session 6: Amino acid transport." *Genes Nutr* **6**(1): 39-43.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." *Nature* **226**(5252): 1211-1213.
- Tesuo, S., M. Aye Aye and K. Masumi (2004). "Nondestructive near-infrared reflectance spectroscopic analyses of the major constituents of sesame (*Sesamum indicum* L.) whole seeds with different coat color." *Plant Prod Sci* **7**: 363-366.
- Thorell, J. I. and A. Lanner (1973). "Influence of Heparin-Plasma, EDTA-Plasma, and Serum on the Determination of Insulin with three different radioimmunoassays." *Scand J Clin Lab Invest* **31**: 187-190.
- Tomaselli, L., M. Palandri and M. Tredici (1996). "On the correct use of the *Spirulina* designation." *Algol Stud* **83**: 539-548.

- Torres, N., I. Torre-Villalvazo and A. R. Tovar (2006). "Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders." *J Nutr Biochem* **17**(6): 365-373.
- Tovar, A. R., F. Murguia, C. Cruz, R. Hernandez-Pando, C. A. Aguilar-Salinas, J. Pedraza-Chaverri, R. Correa-Rotter and N. Torres (2002). "A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome." *J Nutr* **132**(9): 2562-2569.
- Tsurugizawa, T., H. Uneyama and K. Torii (2014). "Brain amino acid sensing." *Diabetes Obes Metab* **16 Suppl 1**: 41-48.
- Unger, R. H. (1973). "Radioimmunoassay of glucagon." *Metabolism* **22**(8): 979-985.
- van Sluijters, D. A., P. F. Dubbelhuis, E. F. Blommaart and A. J. Meijer (2000). "Amino-acid-dependent signal transduction." *Biochem J* **351 Pt 3**: 545-550.
- van Vliet, S., N. A. Burd and L. J. van Loon (2015). "The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant- versus Animal-Based Protein Consumption." *J Nutr* **145**(9): 1981-1991.
- Vargas, L. (2002). *La alimentación de los criollos y mestizos en el México colonial. México.*
- Vazquez-Martin, A., T. Sauri-Nadal, O. J. Menendez, C. Oliveras-Ferraros, S. Cufi, B. Corominas-Faja, E. Lopez-Bonet and J. A. Menendez (2012). "Ser2481-autophosphorylated mTOR colocalizes with chromosomal passenger proteins during mammalian cell cytokinesis." *Cell Cycle* **11**(22): 4211-4221.
- Velasquez, M. T. and S. J. Bhathena (2007). "Role of dietary soy protein in obesity." *Int J Med Sci* **4**(2): 72-82.
- Wang, L., C. J. Rhodes and J. C. Lawrence, Jr. (2006). "Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1." *J Biol Chem* **281**(34): 24293-24303.
- Weng, Q. P., M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M. J. Comb and J. Avruch (1998). "Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies." *J Biol Chem* **273**(26): 16621-16629.
- WHO (2015). *Global and regional food consumption patterns and trends.*

- Yang, H., R. Gong and Y. Xu (2013). "Control of cell growth: Rag GTPases in activation of TORC1." *Cell Mol Life Sci* **70**(16): 2873-2885.
- Yokogoshi, H. and A. Yoshida (1980). "Effects of supplementation and depletion of a single essential amino acid on hepatic polyribosome profile in rats." *J Nutr* **110**(3): 375-382.
- Yoshizawa, F., S. R. Kimball and L. S. Jefferson (1997). "Modulation of translation initiation in rat skeletal muscle and liver in response to food intake." *Biochem Biophys Res Commun* **240**(3): 825-831.
- Young, R. V. and P. L. Peller (1994). "Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition." *Am J Clin Nutr* **59**: 1212-1230.
- Zoncu, R., L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak and D. M. Sabatini (2011). "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase." *Science* **334**(6056): 678-683.

Anexo 1

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 38. 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%).
4. porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2.
5. Calcular el % de adherencia de cada muestra (B) y el estándar (Bo).
6. $\%B/Bo = (\text{Muestra o estándar}/\text{tubos 5-6}) \times 100$
7. Graficar el %B/Bo de cada muestra en el eje de las "y" así como la concentración conocida en el de las "x".
8. Construir la curva de referencia.
9. Calcular los $\mu\text{g/mL}$ de cada muestra interpolando en la curva de referencia.
10. 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 I-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 39. 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%)
 4. porcentaje de tubos 5-6/porcentaje de tubos 1-2
 5. Calcular el % de adherencia de cada muestra (B) y del estándar (Bo)
 6. $\%B/Bo = (\text{Muestra o estándar}/\text{tubos 5-6}) \times 100$
 7. Graficar el %B/Bo de cada estándar en el eje de las y la concentración conocida en el de las x
 8. Construir la curva de referencia
 9. 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 Internacional

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

Tabla 12. 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

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

$$\text{Concentración Estándar} = 200\text{mg} / \text{dL}$$

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 13. 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

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

$$\text{Concentración Estándar} = 200\text{mg} / \text{dL}$$

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 μ L 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 μ mol/L

EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA total se realizó empleando el reactivo TRIzol (Cat: 15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), el cual es una solución monofásica que mantiene la integridad del RNA al mismo tiempo que altera la estabilidad de la célula disolviendo sus componentes.

1. Limpiar el área de trabajo con etanol y agua DEPC.
2. Agregar 1 mL de TRIzol (Cat: 15596-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en tubo eppendorf PCR (PCR Clean Microcentrifuge Tubes, #cat: 05-402-94, Fisher Scientific, Waltham ,Ma, USA).
3. Colocar un balón de acero inoxidable a cada tubo (Stainless Steel Beads, 5mm cat: 69989, QIAGEN, Valencia, CA, USA).
4. Sacar los tejidos del ultracongelador y ponerlos en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen.
5. Cortar aproximadamente 200-250mg de tejido y depositarlo en los tubos con TRIzol.
6. Se colocan los tubos en el equipo TissueLyser II (cat. 85300, QIAGEN, Valencia, CA, USA).
7. Las muestras se homogeneizan por dos minutos a 300rpm.
8. Después de homogeneizar se adicionan 200 μ L de cloroformo al 100%, se incuban 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugan 15 min, 4°C, 14000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11).
9. Se recupera la fase acuosa y se transfiere a tubos eppendorf de 1.5mL y se adicionan 500 μ L de isopropanol al 100% .
10. Agitar por 30 segundos en vortex las muestras.
11. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 15 min, 4°C, 14000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11).
13. Decantar el sobrenadante.
14. Añadir 1 mL de etanol 75 % frío y dar vortex hasta desprender la pastilla.

15. Centrifugar 15 min, 4 °C, 14000 rpm Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11).
16. Tirar el etanol y secar el borde del tubo.
17. Suspender la pastilla con 200 µL de agua DEPC y dar vortex hasta disolver completamente.
18. Almacenar a -80°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 14. 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 µg/µl y mantener en hielo.
3. En tubos eppendorf nuevos realizar la siguiente mezcla de reacción

Tabla 15. 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 µg/ µL
Volumen final	20 µL

1. Incubar 65°C por cinco minutos.
2. Llenar la cámara de electroforesis con MOPS 1X frío hasta 1 mm por encima del gel.
3. 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 dos 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 16. Ejemplo de cálculo para RT

Muestra	Conc ng/ μ L	Promedio	PARA RT		
			FD	μ L de RNA	μ L 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 μ L de RNA total, así que tomando en cuenta el FD antes calculado sabemos que por 1 μ L de RNA vamos a poner 3.82 μ L de agua DEPC. Por lo tanto si voy a tomar 20 μ L de RNA de agua DEPC para hacer la dilución y tener el RNA total a una concentración de 3000 ng/ μ L necesitamos: (20 μ L de RNA * FD) 76.35 μ L 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.

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

Tabla 17. Mezcla de reacción para síntesis de RT

Reactivo	1x
Buffer 5x	4 μ L
Oligonucleótido dT 0.01 μ g/mL	2 μ L
dNTP 2Mm	4 μ L
DTT 0.1M	2 μ L
Transcriptasa reversa M-MULV (Invitrogen, Carlsbad, CA)	0.5 μ L
Agua	4.5 μ L
RNA	4 μ L
Total	22 μ L

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

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 18. Mezcla de reacción para RT-PCR

Reactivo	1x
Master Mix	6 μ L
H ₂ O libre de RNAasas	4 μ L
Ensayos fluorogénicos Taqman de Applied Biosystem inventariados ó Primers SYBR® Premix	0.6 μ L
RT	1.4 μ L

1. 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 μ L de RT.
2. Agitar en vortex y se mantienen los tubos en hielo.
3. Se toma una placa de 96 pozos de Applied Biosystem.
4. Pipetear 10 μ L por triplicado en los pozos de la placa.
5. Cubrir la placa con una cubierta plástica adhesiva de Applied Biosystem.
6. Leer en equipo ABI prism 7000 de Applied Biosystem.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Para la extracción de proteína se empleó el método de extracción con buffer de lisis RIPA.

1. Preparar el buffer de lisis RIPA de acuerdo a la siguiente Tabla:

Tabla 19. Formulación para preparar buffer de lisis RIPA

	mL						
	10	50	100	150	200	250	500
PBS 1X mL	9.9	49.5	99	148.5	198	247.5	495
NP-40 al 1% mL	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	5
Deoxicolato de sodio al 0.5% g	0.05	0.25	0.5	0.75	1	1.25	2.5
SDS 0.1% g	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.5
Azida de sodio al 0.006% g	0.0006	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.03

2. Almacenar a 4°C en frasco ambar. Dura un par de meses pero revisar que no se formen hongos.
3. Al momento de la extracción, el buffer de lisis RIPA se activa según la siguiente Tabla.

Tabla 20. Activación de buffer de lisis RIPA

	[] final	10 mL RIPA	50 mL RIPA
Pastilla de inhibidores (cat: 11836153001, Roche Applied Science, Indiana, USA)	1x	1 pastilla	5 pastillas
NaF 100mM (4°C, oscuridad)	1mM	100 µL	500 µL
Na ₃ VO ₄ 100 mM (-20°C, oscuridad)	2mM	200 µL	1 mL

4. El RIPA ya con todo dura 1 mes a -20°C.
5. En tubos de eppendorf de 1.5mL agregar 150µL de buffer de lisis RIPA activado en hielo.
6. Agregar 100-500 mg de tejido congelado.
7. Homogeneizar los tejidos
8. Agregar 100µL de buffer de lisis.
9. Incubar en hielo por 30-45 min.
10. Centrifugara 14, 000 rpm por 15 minutos a 4°C.
11. Colectar el sobrenadante y transferir a tubos de 1.5mL.
12. Homogeneizar en vortex y dividirlo en alícuotas de 100 – 500 µL.
13. Almacenar a -70°C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para la cuantificación de proteína se emplea el método de Lowry con el ensayo de proteína DC (DC Protein Assay, # cat 5000116, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

1. Preparar reactivo A': 1 mL de reactivo A más 20 µL de reactivo S.

2. Hacer diluciones de las muestras 1:20, 1:50 ó 1:100 con agua desionizada en caso necesario.
3. Curva estándar de albúmina Bio-Rad (#cat. 500-007, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, y 4 mg/mL (stock 6 mg/mL).
4. Pipetear en tubos eppendorf por duplicado:
5. 10µL de cada muestra (blanco, estándares ó muestra)
6. Con pipeta repetidora pipetear:
7. 50µL reactivo A', vortex
8. 400µL reactivo B, vortex
9. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (de preferencia en oscuridad)
10. Vaciar en celdas de plástico y leer a 750nm

Análisis de resultados

Graficar concentración de estándares (eje de las x en mg/mL) vs Absorbancia (eje de las Y), obtener la ecuación de la recta, despejar X para interpolar los datos de absorbancia de las muestras. En caso que se hayan diluido, multiplicar por el factor de dilución.

WESTERN BLOT

PREPARACION DE GELES

1. Lavar vidrios Bio-Rad de 1.5mm de grosor (#cat 1653312, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y vidrios delgado Bio-Rad (#cat 1653308, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con agua y etanol y secar con kimwipes (Kimtech Science, cat: 34120, Kimberly-Clark, USA).
2. Montar vidrios, sellarlos con cinta.
3. Preparar el gel separador (ver Tabla 19), vaciarlo y adicionar etanol al 70 % frio para eliminar burbujas esperar a que polimerice (20 min).
4. Vaciar el etanol.
5. Preparar gel concentrador al 4%, poner peine de 15 pozos (#cat 1653360, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) esperar a que polimerice (20 min).
6. Quitar el peine, limpiar los pozos con agua desionizada.
7. Colocar los geles en la cámara y agregar buffer de corrida 1X (Tris base, glicina, SDS, pH 8.3).

Tabla 21. Geles de poliacrilamida para western blot

GEL SEPARADOR

10%	8mL	16mL	24mL	32mL	40mL	48mL	56mL	64mL
Agua (mL)	3.21	6.42	9.63	12.84	16.05	19.26	22.47	25.68
Tris 1.5M pH 8.8 (mL)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10% (µL)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30% (mL)	2.67	5.34	8.01	10.68	13.35	16.02	18.69	21.36
APS 10% * (µL)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMEd * (µL)	8	16	24	32	40	48	56	64
12%	8mL	16mL	24mL	32mL	40mL	48mL	56mL	64mL
Agua (mL)	2.68	5.36	8.04	10.72	13.4	16.08	18.76	21.44
Tris 1.5M pH 8.8 (mL)	2	4	6	8	10	12	14	16
SDS 10% (µL)	80	160	240	320	400	480	560	640
Poliacrilamida 30% (mL)	3.2	6.4	9.6	12.8	16	19.2	22.4	25.6
APS 10% * (µL)	40	80	120	160	200	240	280	320
TEMEd * (µL)	8	16	24	32	40	48	56	64

GEL CONCENTRADOR

4%	4.57mL	9.14mL	13.71mL	18.28mL	22.85mL	27.42mL	31.99mL	36.56mL
Agua (mL)	2.69	5.39	8.08	10.77	13.47	16.16	18.85	21.55
Tris 0.5M pH 8.8 (mL)	1.13	2.25	3.375	4.5	5.625	6.75	7.875	9
SDS 10% (µL)	45	90	135	180	225	270	315	360
Poliacrilamida 30% (mL)	0.6	1.2	1.8	2.4	3	3.6	4.2	4.8
APS 10% * (µL)	22.5	45	67.5	90	112.5	135	157.5	180
TEMEd * (µL)	9	18	27	36	45	54	63	72

MUESTRAS

1. Adicionar al buffer de muestra Laemmli Bio-Rad (#cat 1610737, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) el β -mercaptoetanol (950 μ l:50 μ l).
2. Mezclar la proteína con el buffer de muestra Laemmli Bio-Rad adicionado con β -mercapto en una proporción 1:1.
3. Calentar las muestras 5 min a 80°C, después dejarlas en hielo.
4. Enseguida cargar las muestras en los carriles.
5. Poner el marcador de peso molecular directo en el gel (sin buffer de muestra Laemmli Bio-Rad), en los carriles vacíos poner sólo el buffer de muestra Laemmli Bio-Rad.

CORRIMIENTO DE GEL

1. Correr el gel a 75 V por 25-30 min para que las muestras se alineen en el gel concentrador.
2. Una vez alineadas, subir el voltaje a 100, dejar correr el gel por 1:30 min – 2:30 min aproximadamente dependiendo del grado de separación que se desee.

TRANSFERENCIA DEL GEL A MEMBRANA DE PVDF

6. Preparar 1L de buffer de transferencia (48mM Tris base, 39 mM glicina, 0.00375% SDS, 20% metanol, pH 9.2) y almacenarlo a -20°C.
7. Cortar membranas de PVDF 9.0 x 6.0 cm y cortar filtros 9.5 x 6.5 cm.
8. Colocar las membranas 15 segundos en metanol y 5 minutos en agua desionizada.
9. Una vez que el gel haya corrido lo suficiente, desmontar los vidrios y retirar el gel de los vidrios.
10. Preparar las cámaras de transferencia húmeda de Bio-Rad (#cat 170-3930, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), llenándolas a la mitad de su capacidad con buffer de transferencia 1X frío (500mL) y colocar la unidad enfriadora en la cámara.
11. Realizar el "sándwich" de transferencia sobre el casete de transferencia colocando: esponja, filtro, gel, membrana PVDF, filtro y esponja.
12. Llenar la cámara de transferencia húmeda con el buffer de transferencia 1x frío sobrante.
13. Realizar la transferencia a 100v durante 1 hora.
14. Al término, desmontar el sándwich y retirar la membrana
15. Lavar las membranas 2 veces por 5 min en agua desionizada.

TINCIÓN DE LA MEMBRANA CON ROJO PONCEAU-S.

1. Sumergir la membrana 20 segundo en metanol.
2. Incubar la membrana en agitación suave por 2 minutos con 2ml de reactivo Rojo Ponceau-S.
3. Lavar con agua desionizada hasta observar el bandeo en la membrana.
4. Lavar la membrana con TBS 1X – Tween 0.1%, hasta eliminar completamente el Rojo Ponceau-S.

BLOQUEO.

1. Incubar la membrana en solución de bloqueo (Leche desgrasada 5% en TBS 1X-Tween 0.1%)
2. Incubar suavemente (120 rpm) por 1 hora a temperatura ambiente.

3. Lavar las membranas por 5 min en TBS 1X – Tween 0.1% 3 veces (150 rpm).

ANTICUERPO PRIMARIO

1. Agregar la solución de anticuerpo primario (anticuerpo de interés a la dilución adecuada en solución de bloqueo).
2. Incubar suavemente (120 rpm) durante toda la noche a 4°C y posteriormente se puede dejar 30 min-1 h a TA para asegurar la unión (120 rpm).
3. Lavar las membranas por 10 min con TBS 1X – Tween 0.1% por 3 veces (150 rpm)

ANTICUERPO SECUNADARIO

1. Agregar la solución de anticuerpo secundario en solución de bloqueo
2. Incubar suavemente (120 rpm) por 1-2 horas a temperatura ambiente
3. . Lavar las membranas por 10 min con TBS 1X – Tween 0.1% por 3 veces (150 rpm).
4. Lavar las membranas 2 veces por 5 minutos con agua desionizada

REVELADO

1. Encender el equipo ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
2. Mezclar los dos reactivos ECL Immobilon Western (millipore) 1:1 y equilibrar a temperatura ambiente.
3. Cubrir la membrana con esta solución e incubar durante 5 minutos.
4. Eliminar el exceso de reactivo y colocar las membranas entre películas de acetato.
5. Colocar las películas de acetato con las membranas en las charolas de el equipo ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
6. Adquirir las imágenes.

DETERMINACIÓN DE PERFILES POLISOMALES (Coudert et al., 2014)

Mantener todo en hielo

1. Limpiar el área de trabajo con etanol y agua DEPC.
2. Sacar los tejidos del ultracongelador y ponerlos en nitrógeno líquido para evitar que se descongelen.
3. En un homegenizador Dounce de vidrio añadir 2 mL de buffer de lisis sin NP-40 [20mM Tris HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 20U/mL RNAseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA cat. No. 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals)].
4. Cortar aproximadamente 500mg de tejido y depositarlo en el homogeneizador Dounce.
5. Homogeneizar suavemente.
6. Transferir el homogenado a tubos eppendorf de 1.5 mL
7. Centrifugar 15 minutos, 4°C, 12 000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a tubos falcon de 15 mL y se re suspendió hasta un volumen de 8 mL con buffer de lisis adicionado con 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio.

9. En un tubo de polialómero de 13mL se agregan 3mL de una solución de sacarosa al 50% preparada en buffer de lisis y se adicionan los 8mL de sobrenadante obtenidos durante la homogeneización.
10. Centrifugar 2 horas, 4°C, 35 000 rpm empleando el rotor TH-641 para ultracentrífuga Sorvall.
11. Después de la centrifugación se elimina el sobrenadante y se suspende la pastilla con 1 mL de buffer de lisis adicionado con 1% NP-40 y 1% deoxicolato de sodio.
12. Se hacen los gradientes de sacarosa del 15% al 55% en tubos de polialómero de 13 mL (20mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5 U/mL RNaseOUT™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA cat. No. 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals), para el hacer el gradiente de sacarosa se empleo el generador de gradientes Teledyne Isco Modelo 160, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se conservaron los gradientes a 4°C hasta su uso.
13. Se cuantificó la concentración de RNA presente en el extracto usando un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer) y se cargaron 10 unidades OD₂₆₀ del extracto en el gradiente de sacarosa.
14. Centrifugar 2 horas 30 minutos, 4°C, 37 000 rpm empleando el rotor TH-641 para ultracentrífuga Sorvall.
15. Los gradientes se fraccionaron con el sistema automatizado de fraccionamiento por densidad acoplado a un espectrofotómetro a 254 nm (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), con una solución de sacarosa al 60% [20mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5 U/mL RNaseOUT™ (invitogen cat. No. 10777-019), 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Mini Complete, Roche Biochemicals] adicionada con glicerol al 10% para aumentar su densidad.
16. En paralelo al fraccionamiento del gradiente el perfil de polisomas se imprimió en papel gráfico.
17. Se determinó el área bajo la curva de los perfiles con el programa ImageJ.

Anexo 2

Artículo publicado

Article

The mTORC1-Signaling Pathway and Hepatic Polyribosome Profile Are Enhanced after the Recovery of a Protein Restricted Diet by a Combination of Soy or Black Bean with Corn Protein

Claudia C. Márquez-Mota ¹, Cinthya Rodriguez-Gaytan ¹, Pauline Adjibade ², Rachid Mazroui ², Amanda Gálvez ³, Omar Granados ¹, Armando R. Tovar ¹ and Nimbe Torres ^{1,*}

¹ Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; claudia.qa@gmail.com (C.C.M.-M.); citzelg@hotmail.com (C.R.-G.); ograpo@yahoo.com (O.G.); tovar.ar@gmail.com (A.R.T.)

² Centre de Recherche du Chu de Québec, Département de Biologie Moléculaire, Biochimie Médicale et Pathologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec City, QC G1V 0A6, Canada; pauline.adjibade@gmail.com (P.A.); Rachid.Mazroui@crchudequebec.ulaval.ca (R.M.)

³ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; galvez@unam.mx

* Correspondence: nimbester@gmail.com; Tel.: +52-55-5655-3038

Received: 13 July 2016; Accepted: 12 September 2016; Published: 20 September 2016

Abstract: Between 6% and 11% of the world's population suffers from malnutrition or undernutrition associated with poverty, aging or long-term hospitalization. The present work examined the effect of different types of proteins on the mechanistic target of rapamycin (mTORC1)-signaling pathway in: (1) healthy; and (2) protein restricted rats. (1) In total, 200 rats were divided into eight groups and fed one of the following diets: 20% casein (C), soy (S), black bean (B), B + Corn (BCr), Pea (P), spirulina (Sp), sesame (Se) or Corn (Cr). Rats fed C or BCr had the highest body weight gain; rats fed BCr had the highest pS6K1/S6K1 ratio; rats fed B, BCr or P had the highest eIF4G expression; (2) In total, 84 rats were fed 0.5% C for 21 day and protein rehabilitated with different proteins. The S, soy + Corn (SCr) and BCr groups had the highest body weight gain. Rats fed SCr and BCr had the highest eIF4G expression and liver polysome formation. These findings suggest that the quality of the dietary proteins modulate the mTORC1-signaling pathway. In conclusion, the combination of BCr or SCr are the best proteins for dietary protein rehabilitation due to the significant increase in body weight, activation of the mTORC1-signaling pathway in liver and muscle, and liver polysome formation.

Keywords: soy protein; black bean protein; SNAT2; mTORC1-signaling pathway; polysome profiling; protein rehabilitation

1. Introduction

A deficiency of protein and energy causes a type of malnutrition called protein-energy malnutrition (PEM), which affects children, elderly people and hospitalized patients [1,2] and accounts for six million deaths annually [3]. Numerous studies have demonstrated the extent of malnutrition in hospitals, with a prevalence reaching 50% depending on the patient population and the criteria of malnutrition [4]. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), approximately 795 million people are undernourished globally and, although the number of undernourished people has decreased in recent years, this remains an important health issue [5]. Several approaches have been used to improve the nutritional status of people with malnutrition in developing countries. Two approaches are dietary enrichment [6] and oral protein

calorie supplementation [7]. In the case of PEM, the main approach used to improve body weight and recovery is the use of a combination of vegetable proteins, such as corn, beans, sorghum, rice, soy and peanuts, among others [8]. It has been widely reported that the combination of cereals and legumes complement the limiting amino acids in each source [8–10]. Although several studies have demonstrated the effect of dietary protein, mainly casein or whey [11,12], on growth and protein synthesis [13–15], less is known about the effect of different dietary protein sources or combinations of vegetable proteins to activate liver and muscle mTORC1 (mechanistic target of rapamycin)-signaling pathway. Clinical and consumer market interest is increasingly directed toward the use of plant-based proteins as dietary components to increase protein synthesis; however, there is controversy about whether the ingestion of a plant-based diet results in lower protein synthesis compared to animal-derived proteins. This could be attributed to the lower digestibility of some plant-based sources due to the low content of some essential amino acids such as methionine in legumes and lysine in cereals. Furthermore, most plant proteins have a relatively low leucine content (with the exception of corn), which may further reduce protein synthesis when compared with animal proteins [16]. However, diets as consumed inevitably consist of mixtures of proteins, which improve the quality of the protein by complementing the limiting amino acids in each source. Most studies have assessed muscle protein synthesis after the ingestion of free amino acids, milk, whey or casein [12]. In contrast, few studies have assessed the impact of plant-based protein ingestion on mTORC1-signaling pathway involved in protein synthesis. It is surprising that only soy protein [17] and wheat protein [11] have been studied for its postprandial muscle protein synthesis. Combining proteins is of high priority in developing countries to improve the quality of the vegetable proteins and the lower cost than animal proteins [18] and for decreasing the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes [19]. From the standpoint of global sustainability, plant-based foods are proposed to be advantageous over animal-based foods [16]. It has been suggested that the production of plant-based foods requires less water, land, and energy.

It has long been known that starvation or lack of nutrients influences protein synthesis rates in mammalian tissues and cells [20,21]. Nutrient availability, growth factors and the energy of the cell are important for the regulation of the translational machinery linked to the mTORC1 (mechanistic target of rapamycin) pathway [20,22]. mTORC1 is a serine/threonine protein kinase that belongs to the family of phosphatidylinositide-3 kinase related kinases (PI3KK). Pharmacological and genetic studies have demonstrated that mTORC1 activation increases cell growth in diverse organisms from yeast to humans [22,23]. Amino acid transporters have been considered as the amino acid sensor and play a role in the activation of the mTORC1-signaling pathway, particularly SNAT2 (small neutral amino acid transporter 2), a member of the SLC38 family that have a dual activity of transporter and transceptor [24]. SNAT2 transports alanine, asparagine, cysteine, glutamine, histidine, methionine, proline and serine [25]. The activity of SNAT2 allows the accumulation of intracellular amino acids which facilitates exchange uptake of amino acids through transporters such as the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) to increase the transport of branched chain amino acids into the cell leading to the activation of mTORC1 [24,26]. Signaling through mTORC1 is activated by amino acids [27], with the branched-chain amino acid leucine playing a major role [28]. The activated mTORC1 phosphorylates substrates such as eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and p70 ribosomal S6 kinase (S6K) [29]. The phosphorylation of 4E-BP1 prevents its binding to the cap-binding protein eIF4E, enabling it to participate in the formation of the eIF4F complex, which is required for the initiation of cap-dependent translation. Through a variety of effectors, activation of S6K1 leads to an increase in mRNA biogenesis, as well as translational initiation and elongation [30]. On the contrary, when there is a scarcity of amino acids, GCN2 (general control nonderepressible 2) is activated and phosphorylates eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 alpha) leading to the general inhibition of protein synthesis [31]. Few studies have assessed postprandial liver and muscle protein synthesis after the ingestion of plant proteins or combinations of plant proteins in healthy and after a protein restricted period. Therefore, the purpose of this study was: (1) to determine the effect of different dietary vegetable proteins such as

pea, sesame, spirulina, corn, black bean, soy protein or the combination of proteins on weight gain, biochemical parameters and the ability to activate the mTORC1 pathway in healthy rats; and (2) to study the acute response to dietary protein rehabilitation, and protein synthesis through regulation of the mTORC1 signaling pathway and the polysome formation in the rat liver after a period of protein restricted diet. We found that the combination of BCr, SCr or S are the best proteins for dietary protein rehabilitation due to the significant increase in body weight, the activation of the mTORC1-signaling pathway in liver and muscle, and liver polysome formation.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Protocol and Diets

2.1.1. Study 1: Effect of Different Types of Vegetable Proteins on Healthy Rats

The purpose of this study was to determine the best protein or combination of proteins to ensure an optimal weight gain in healthy rats. Male Sprague-Dawley rats (3–4 weeks old, 180–200 g, $n = 200$) with free access to water were randomly assigned to one of eight experimental diets ($n = 25$ per group): (1) 20% casein (C) (control diet); (2) 20% soy protein (S); (3) 20% black bean protein (B); (4) 20% corn protein (Cr); (5) 20% pea protein (P); (6) 20% spirulina (Sp); (7) 20% sesame protein (Se); and (8) 10% B + 10% Cr (BCr). To synchronize food intake during the day, the rats were trained to consume one of the eight experimental diets during a restricted period of 10 h (08:00–18:00) for 21 days to guarantee similar food intake to animals fed ad libitum. The animals were weighed every other day, and food consumption was quantified every day. On Day 21, rats previously anesthetized with CO₂ were euthanized by decapitation at fasting, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min ($n = 5$ per time) after starting to eat their corresponding diets. All diets contained the same amount of nutrients with the exception of the type of protein that was adjusted to 20% taking into account the purity of the protein source as recommended by the American Institute of Nutrition [32]. The amino acid composition of each dietary protein is presented in Table S1. The composition of the experimental diets is presented in Table 1. The rat livers were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C. Blood samples were obtained after decapitation, and serum was separated and frozen at -20 °C to measure biochemical variables. The animal protocol was approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ in Mexico City (CINVA 277).

2.1.2. Study 2: Effect of Different Types of Vegetable Proteins on Protein Restricted Rats

The purpose of this study was to evaluate specific proteins or combination of proteins after a protein restricted period. Male Sprague-Dawley rats (3–4 weeks old, 180–200 g, $n = 84$) were fed a low-protein diet (LP; 0.5% casein) and allowed free access to water for 21 days. To synchronize food intake, the rats were trained to consume the experimental diet during a restricted period of 10 h (8:00–18:00). On Day 22, the rats were randomly assigned to one of the seven experimental diets ($n = 12$ per group): (1) Low protein (LP); (2) C; (3) S; (4) B; (5) Cr; (6) BCr; and (7) 10% S + 10% Cr (SCr). The composition of the experimental diets is presented in Table 1. On Days 1 and 7 of the dietary protein rehabilitation, rats previously anesthetized with CO₂ were euthanized by decapitation ($n = 6$ per day) at 60 min after starting to eat their corresponding diets. The rat livers and muscles were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C. Blood samples were obtained after decapitation, and serum was separated and frozen at -20 °C to measure biochemical variables. The animal protocol was approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S.Z in Mexico City (CINVA 277).

Table 1. Composition of experimental diets used in healthy and protein restricted rats.

Ingredients	C	LP	S	B	P	Sp	Se	Cr	BCr	SCr
Casein ¹ , g	219.8	5.5	0	0	0	0	0	0	0	0
Soy protein isolate ² , g	0	0	220	0	0	0	0	0	0	110.2
Black bean protein concentrate ³ , g	0	0	0	287.5	0	0	0	0	144.3	0
Pea protein isolate ⁴ , g	0	0	0	0	275.3	0	0	0	0	0
Spirulina ⁵ , g	0	0	0	0	0	410.3	0	0	0	0
Sesame protein isolate ⁶ , g	0	0	0	0	0	0	232	0	0	0
Corn protein isolate ⁷ , g	0	0	0	0	0	0	0	336.2	167.4	167.9
Corn starch, g	390.4	520.4	389.9	371.7	373	331.8	386.6	352.6	362.2	371.3
Dextrinized cornstarch, g	126	172.7	127	110.2	111.4	69.7	126.2	89	99.6	108
Sucrose, g	94.2	130.8	95.3	78.7	79.8	38.1	94.8	57.2	68	76.3
Soybean oil, g	69.5	70	68.2	55.8	61.9	39.9	62.6	66.1	61	67.2
α-Cellulose, g	49.8	50	49.5	46.4	48.9	47.7	48.2	48.8	47.6	49.2
AIN-93-MX, g	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
AIN-93-VX, g	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
L-Cystine, g	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Choline bitartrate, g	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ, g	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
Total amount, g	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Total protein content, % kcal	19.3	0.5	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3	19.3
Total carbohydrate content, % kcal	65.5	84.3	65.5	65.5	65.5	65.5	65.5	65.5	65.5	65.5
Total fat content, % kcal	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2	15.2
Energy density, kcal/g	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1

¹ Harlan Teklad; ² SUPRO 710; ³ Black bean protein; ⁴ Nutralys pea protein, Roquette; ⁵ AEH, Solarium Biotechnology; ⁶ SESAPROT, Dipasa México; ⁷ INGREDION, México; TBHQ, tert-butylhydroquinone. C: casein; LP: low protein; S: soy protein; B: black bean protein; P: pea protein; SP: spirulina; SE: sesame protein; Cr: corn protein; BCr: black bean protein + corn protein; SCr: Soy protein + corn protein.

2.2. Biochemical Parameters

Blood was collected in tubes with gel and clot activator (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 1000× g for 15 min to obtain serum. Serum glucose was measured using an YSI2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Incorporated, Yellow Sprig, OH, USA). Serum cholesterol and triglycerides were quantified by a Cholesterol FS* kit and Triglycerides FS* kit (DiaSys Diagnostic System GmbH, Holzheim, Germany). Insulin and glucagon were measured using a rat-specific radioimmunoassay kit (Millipore, St. Charles, MO, USA). Serum homocysteine (Hcy) was determined using Hcy kit (AxSYM System Abbott, Chicago, IL, USA).

2.3. Determination of Plasma Amino Acids

The concentration of amino acids in the plasma was determined in triplicate by HPLC. A total of 150 µL of plasma was mixed with 38 µL of trichloroacetic acid, incubated for 30 min at 4 °C and centrifuged at 4 °C at 13,500 rpm for 12 min. The supernatant was used for derivatization of amino acids with OPA (O-Phthaldialdehyde) and FMOC (9-fluorenylmethylchloroformate). A sample was injected to an analytic column Agilent ZORBAX Eclipse AAA size 4.6 × 150 mm, 5 µm coupled to a fluorescence detector at 340 nm excitation and 450 nm emission (Agilent G1321B) for analysis. We used an HPLC Agilent 1260 Infinity system coupled to a binary pump (Agilent G1312B) and a robotic auto-sampler (Agilent G1367B).

2.4. Real-Time Quantitative PCR

Total RNA from livers was extracted according to the method of Chomczynski and Sacchi [33], followed by determination of integrity, concentration and purity. cDNA synthesis was carried out using an M-MLV reverse transcriptase enzyme and oligo (dT) 12–18 primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR using Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Roche, Branchburg, NJ, USA). The PCR scheme used was 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s followed by 60 °C for 1 min. TaqMan fluorogenic

assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and SYBR Green I[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used according to the manufacturer's instructions, using β -actin as the univariate control. The primers are shown in Table S2. The relative amounts of mRNA were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with an efficiency adjustment according to the Pfaffl equation [34].

2.5. Western Blot Analysis

Proteins were extracted using RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) lysis buffer (1% IGEPAL CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1 mM sodium fluoride, 2 mM sodium orthovanadate and complete protease inhibitor cocktail tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), all dissolved in phosphate-buffered saline). The protein concentration was measured using the Lowry method with the DC Protein Assay (Bio-Rad., Hercules, CA, USA). Forty micrograms of total protein were heated for 5 min in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and loaded on 8%–10% polyacrylamide gels, separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Blots were blocked for 1 h at room temperature with 5% blotting grade blocker nonfat dry milk (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mTOR (cat #2972, dil 1:1000), pmTOR (Ser 2481) (cat #2974, dil 1:1000), p70S6K1 (Thr 389) (cat #9234, dil 1:1000), eIF4G (cat #2498, dil 1:1000) and GCN2 (cat #3302, dil 1:1000), eIF2 α (cat#9722, dil 1:6000), peIF2 α (Ser 51) (cat #9721, dil 1:500) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies against p70S6K1 (cat sc-230, dil 1:3000), SREBP-1 (cat sc-366, dil 1:250), FAS (cat sc-20140, dil 1:1000), SNAT2 (cat sc-67081, dil 1:800), β -actin (cat sc-1615, dil 1:1000) and tubulin (cat sc-7396, dil 1:1000) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Appropriate secondary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The blots were then incubated with anti-rabbit or -goat immunoglobulin G antibody conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:3500. The blots were developed by the enhanced chemiluminescence method with Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) the blot image was acquired through the ChemiDoc MP imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The samples were analyzed three times in independent blots. Semiquantification of the bands was carried out by optical densitometry and analyzed using the ImageJ digital imaging processing software (ImageJ 1.48v, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The expression of each protein analyzed was normalized with γ -tubulin.

2.6. Polyribosome Studies

Rat frozen liver (400–500 mg) was homogenized in ice-cold Dounce homogenizer with 2 mL of lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 U/mL RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and protease inhibitor (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)) and centrifuged at 11,000 \times g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and diluted in lysis buffer supplemented with 1% NP-40 and 1% sodium deoxycholate and layered onto a 50% sucrose cushion (which will allow the sedimentation of heavy complexes such as polysomes but not light complexes such as 40S, 60S and 80S) in buffer A (20 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 U/mL RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and protease inhibitor (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)) and centrifuged for 2 h at 200,000 \times g in a Beckman SW-40Ti rotor at 4 °C. The pellet was resuspended in 1 mL of lysis buffer supplemented with 1% NP-40 and 1% sodium deoxycholate and incubated on ice for 30 min. RNA was quantified, and 7.5 OD₂₆₀ units were loaded onto the 15% to 55% sucrose gradient in buffer A (20 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1mM DTT, 5 U/mL RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), supplemented with complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and centrifuged for 2 h 30 min at 230,000 \times g using a Beckman SW-40Ti rotor at 4 °C. Gradients were fractionated using an Automated Density Fractionation System (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) with continuous monitoring of absorbance at 254 nm, the polyribosomal profile was edited on chart paper.

The area under the curve of the profile was determined using the program ImageJ digital imaging processing software (ImageJ 1.48v).

2.7. Statistical Analysis

Values are expressed as the means \pm SEM. The data were analyzed using GraphPad Prism (version 6.0f; Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be significant when $p < 0.05$. In Study 1, the final weight gain, food intake, serum biochemical parameters, gene and protein expression levels were analyzed by 1-factor ANOVA. Means were analyzed by Tukey's post hoc analysis. In Study 2, the initial body weight, food intake, body weight d0, body weight d7, serum biochemical parameters, gene and protein expression levels were analyzed by 1-factor ANOVA. Means were analyzed by Tukey's post hoc analysis.

3. Results

3.1. Study 1

3.1.1. Weight Gain, Food Intake and Feed Conversion Ratio of Healthy Rats Fed Different Types of Proteins

The final body weight was significantly higher ($p < 0.05$) in the rats fed C, BCr, P, S and B than in the rats fed Sp, Se and Cr. The mean daily food intake was significantly higher ($p < 0.05$) in the rats fed C, B and Sp than in the rats fed S, BCr, P, Se and Cr (Table 2). The feed conversion ratio (FCR) that indicates the efficiency of the experimental diets to produce an optimal weight gain was significantly higher ($p < 0.05$) in the BCr and P groups, meanwhile rats fed Sp, Se or Cr showed the lowest FCR.

3.1.2. Serum Biochemical Parameters and Homocysteine (Hcy) of Healthy Rats Fed Different Types of Proteins

All serum biochemical parameters after 1 h refeeding in all groups were within the normal range. However, there was a significant difference in several parameters in some groups (Table 2). The more relevant differences were observed in the groups fed P, Se or Cr with the highest postprandial serum glucose concentrations ($p < 0.05$). The groups fed C or Se had the highest ($p < 0.05$) postprandial insulin concentrations. The highest glucagon concentration was observed in the B group ($p < 0.05$). The B group had the lowest insulin/glucagon ratio, whereas the C and Se groups had the highest insulin/glucagon ratio ($p < 0.05$). Since Sp contains nucleic acid and the biochemical degradation ends by producing uric acid, we determined serum uric acid concentration in rats fed Sp resulting in normal values ($81.3 \pm 6.0 \mu\text{mol/L}$). Previous studies have demonstrated that the consumption of soy protein reduces serum Hcy concentration [35] due to that the limiting amino acid in soy is methionine, thus we assessed whether other different types of dietary vegetable proteins used in the present study regulates serum homocysteine concentration. Interestingly, rats fed with all different types of vegetable protein had significantly lower serum Hcy concentration at 90 and 120 min than the C group. Hcy concentration was significantly higher in fasting rats fed C with respect to all groups with exception of P group. The average fasting serum Hcy in rats fed vegetable protein was $6.83 \pm 0.43 \mu\text{mol/L}$, whereas, in the C group, it was $12.6 \pm 1.5 \mu\text{mol/L}$. After two hours of feeding, rats fed vegetable proteins, had average serum Hcy concentration of 8.9 ± 0.5 , whereas the C group rats had $19.2 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ (Figure 1A), a value that is considered as hyperhomocysteinemia [36].

3.1.3. Expression of the mTORC1-Signaling Pathway in the Livers of Healthy Rats Fed Different the Types of Proteins

After 1 h of feeding, the p-mTORC1/mTORC1 ratio was significantly increased ($p < 0.05$) in the S, B and BCr groups, while the Cr and P groups had lower phosphorylation of mTORC1 (Figure 2A). The BCr group had the highest p-S6K1/S6K1 ratio among the experimental groups ($p < 0.05$) indicating a possible increase in ribosomal biogenesis [37]. Interestingly, the Cr group exhibited the lower

phosphorylation of S6K1 (Figure 2B) indicating that, although Cr is rich in leucine that can stimulate mTORC1 [38], the deficiency of lysine and tryptophan in Cr could repress the activity of S6K1. We measured the expression of eIF4G, a translation initiation factor involved in the formation of eIF4E [39], and we observed that the expression of eIF4G was significantly increased ($p < 0.05$) in the B, BCr and P groups; meanwhile, the S, Cr, Sp and Se groups exhibited lower expression ($p < 0.05$) of eIF4G (Figure 2C).

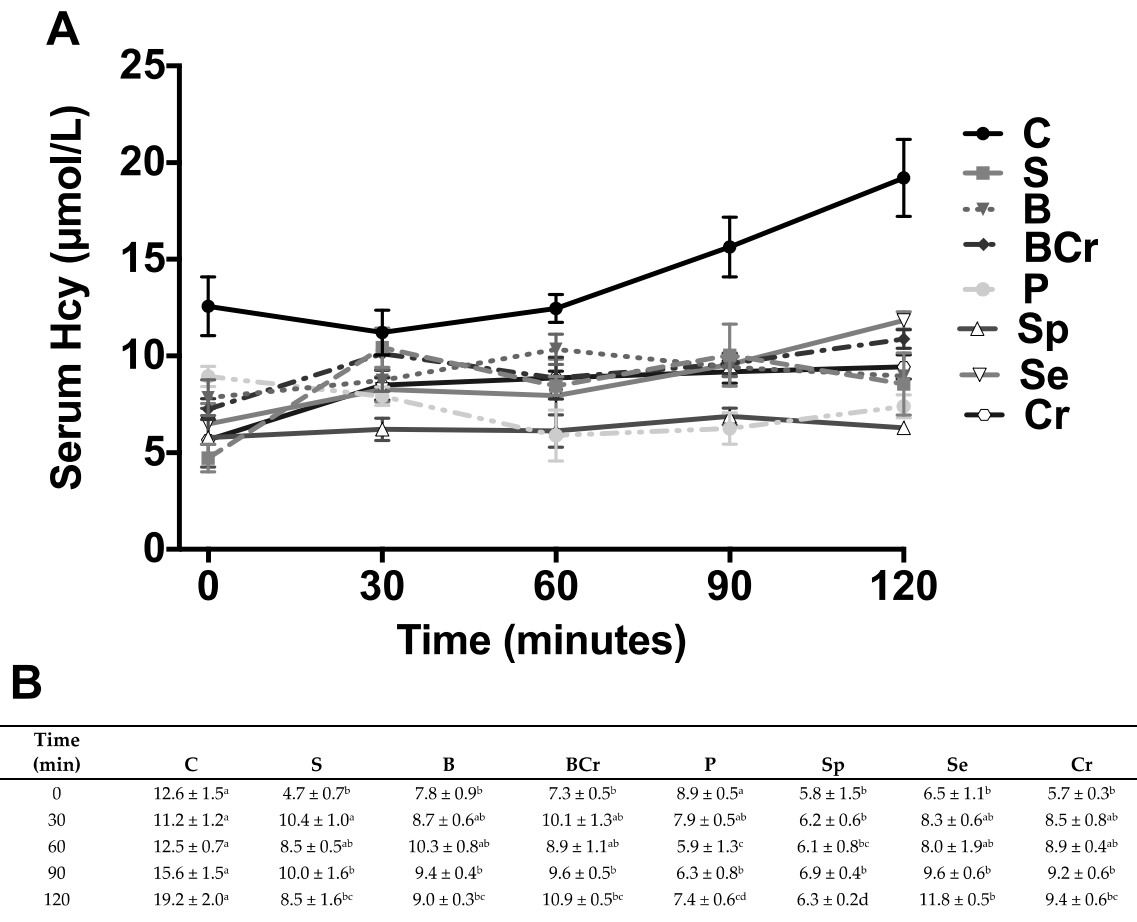


Figure 1. Serum Homocysteine (Hcy) concentration in healthy rats fed different types of dietary protein: (A) Fasting serum Hcy concentration and after 30, 60, 90 and 120 min of feeding casein (C), soy protein (S), black bean (B), black bean + corn (BCr), pea (P), spirulina (SP), sesame (Se) or corn (Cr); and (B) values are means ± SEM, $n = 5$. Different letter superscript indicates significant differences among rows, $p < 0.05$, $a > b > c$.

Table 2. Biochemical, anthropometric variables and feed conversion ratio of healthy Sprague-Dawley rats after one hour of feeding with different types of protein during 21 days.

	C	S	B	BCr	P	Sp	Se	Cr	<i>P</i> ¹	<i>P</i> ²
Initial body weight, g	200.2 ± 1.3 ^b	193.5 ± 2.5 ^{bc}	195.5 ± 1.5 ^b	197.1 ± 2.1 ^b	186.7 ± 1.6 ^c	199.3 ± 1.9 ^b	199.8 ± 2.1 ^b	212.5 ± 1.9 ^a	0.001	0.001
Final body weight, g	255.4 ± 1.9 ^a	239.8 ± 3.3 ^{bc}	236.7 ± 2.3 ^{bd}	248.9 ± 2.2 ^{ac}	245.0 ± 3.0 ^{ac}	228.4 ± 2.7 ^d	225.9 ± 2.0 ^d	229.6 ± 2.4 ^d	0.001	0.001
Weight gain, day 4–21, g	55.2 ± 1.9 ^{ab}	46.3 ± 2.3 ^b	41.2 ± 2.2 ^c	51.8 ± 2.3 ^{bc}	58.3 ± 2.6 ^a	29.2 ± 2.9 ^d	26.1 ± 2.0 ^{de}	17.1 ± 1.6 ^{de}		
Food intake, g/day	19.0 ± 0.9 ^a	16.8 ± 0.8 ^{ab}	17.4 ± 0.4 ^a	15.5 ± 0.5 ^b	15.4 ± 1.0 ^b	16.1 ± 0.7 ^a	14.2 ± 0.4 ^b	15.8 ± 0.5 ^b		
Feed conversion ratio (FCR)	2.9 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.2 ^c	2.4 ± 0.1 ^{cd}	3.4 ± 0.2 ^{ab}	3.9 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.2 ^d	1.8 ± 0.2 ^d	1.1 ± 0.1 ^e		
Serum										
Glucose, mmol/L	7.2 ± 0.3 ^{ab}	6.8 ± 0.2 ^b	6.2 ± 0.2 ^b	7.0 ± 0.1 ^{ab}	7.9 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.4 ^b	7.4 ± 0.2 ^a	7.5 ± 0.2 ^a		
Triglycerides, mmol/L	0.28 ± 0.1 ^b	0.51 ± 0.1 ^{ab}	0.5 ± 0.1 ^{ab}	0.61 ± 0.1 ^{ab}	0.58 ± 0.1 ^{ab}	0.71 ± 0.1 ^a	0.40 ± 0.1 ^{ab}	0.63 ± 0.1 ^{ab}		
Cholesterol, mmol/L	1.64 ± 0.50 ^b	1.60 ± 0.06 ^b	1.54 ± 0.05 ^b	1.77 ± 0.12 ^b	1.58 ± 0.07 ^b	1.79 ± 0.07 ^a	2.11 ± 0.10 ^a	2.14 ± 0.06 ^a		
Insulin, pmol/L	269.9 ± 5.2 ^a	158.7 ± 3.7 ^{cd}	55.8 ± 5.6 ^e	160.5 ± 5.8 ^c	167.0 ± 5.7 ^c	168.4 ± 6.3 ^c	204.7 ± 7.3 ^b	134.0 ± 3.5 ^d		
Glucagon, ng/L	75.3 ± 2.3 ^{bc}	70.1 ± 1.1 ^{bc}	103.3 ± 2.4 ^a	70.3 ± 3.5 ^{bc}	74.6 ± 3.3 ^{bc}	65.2 ± 5.3 ^c	44.9 ± 2.9 ^d	86.4 ± 5.8 ^b		
Insulin/Glucagon	3.8 ± 0.3 ^a	2.3 ± 0.1 ^{bc}	0.6 ± 0.1 ^d	2.2 ± 0.1 ^{bc}	2.3 ± 0.1 ^{bc}	2.7 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.3 ^a	1.5 ± 0.1 ^{cd}		

C, casein; S, soy protein; B, black bean protein; P, pea protein; Sp, spirulin protein; Se, sesame protein; Cr, corn protein. The values are mean ± SEM. Means in a row without a common letter differ, $p < 0.05$. Differences are based on one-way ANOVA. Tukey test was used as post hoc analysis; P^1 , weight; P^2 , weight × diet.

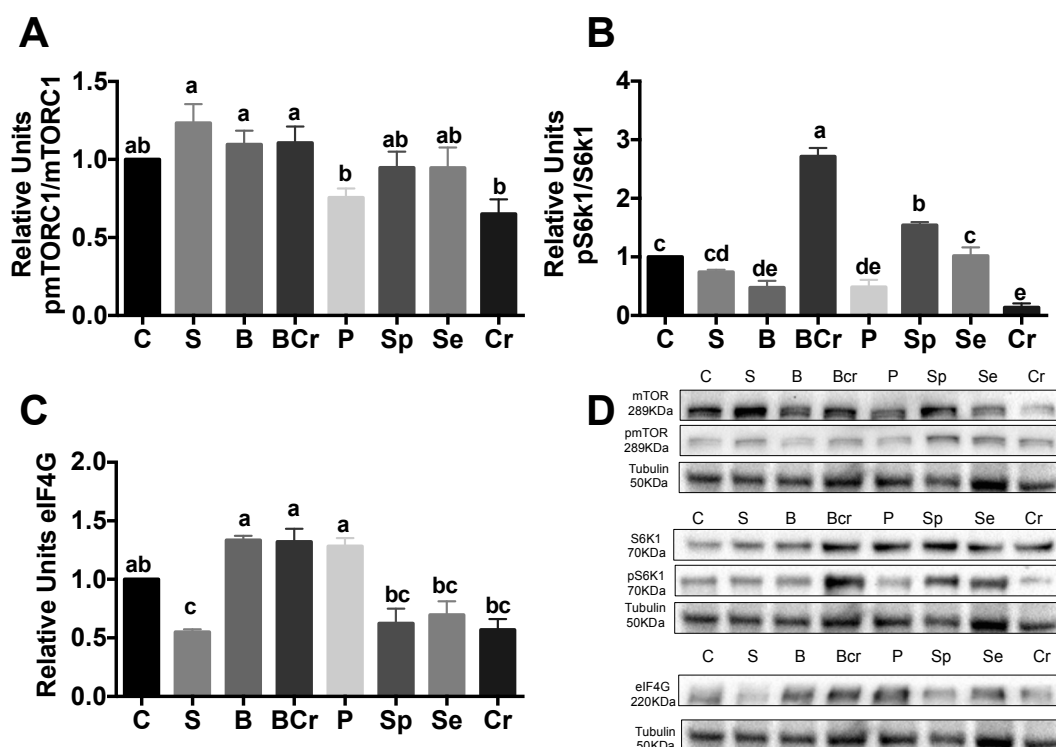


Figure 2. Western blot analysis and quantification of the: (A) phosphorylation of mTORC1; (B) phosphorylation of S6K1; (C) protein abundance of eIF4G in livers of healthy rats fed different types of dietary proteins and (D) representative immunoblot. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.1.4. Expression of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Liver of Healthy Rats Fed Different Types of Proteins

Gene and protein expression of SNAT2 was not modified by the type of dietary protein (Figure 3A,B), however it was increased during the fasting period and decreased after feeding period (inset Figure 3A,B) ($p < 0.05$).

3.1.5. Liver Gene and Protein Expression of the Transcription Factor SREBP1c and Its Target Enzyme FASN of Healthy Rats Fed Different Types of Proteins

Diets low in lysine lead to fatty liver [40]. For this reason, we assessed the gene expression of the transcription factor *Srebp1c*, which is involved in fatty acid synthesis [41]. *Srebp1c* expression was significantly increased ($p < 0.05$) in the Cr and Se groups by 3.1- and 1.4-fold, respectively, with respect to the C group. Interestingly, the S, BcR, Sp and P groups showed the lowest gene expression of *Srebp1c* (Figure 4A). The protein expression of SREBP1c was significantly increased ($p < 0.05$) in the rats fed P, Sp, Se and Cr, while the rats fed S, B and BcR showed the lowest expression of SREBP1c (Figure 4C). The fatty acid synthase gene (*Fasn*), the target gene of SREBP-1c, was significantly increased ($p < 0.05$) in the Cr group followed by the Se group after refeeding (Figure 4B). The protein expression of FASN increased in the Se and Cr groups after refeeding by 59% and 36.2%, respectively, in comparison with the C group (Figure 4D).

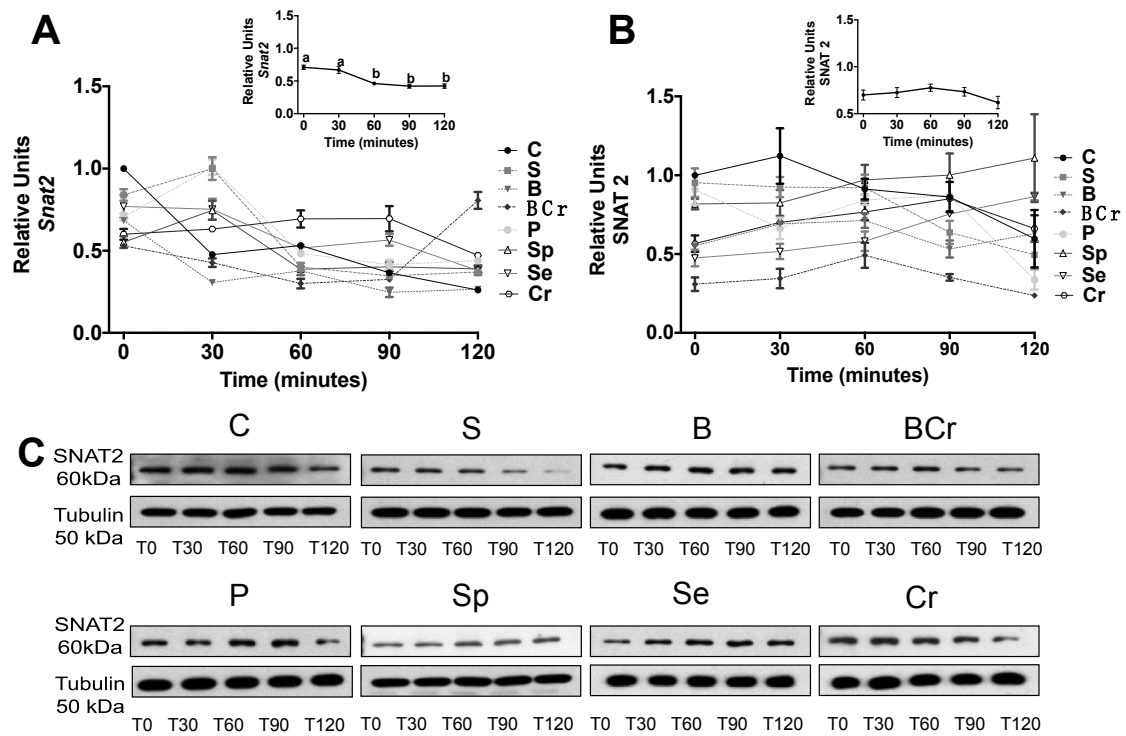


Figure 3. mRNA gene expression and Western blot analysis of SNAT2 in liver of healthy rats fed different types of dietary protein: (A) *Snat2* mRNA abundance; (B) protein abundance of *Snat2*; and (C) representative immunoblot of SNAT2. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among different times of feeding, $p < 0.05$, $a > b > c$.

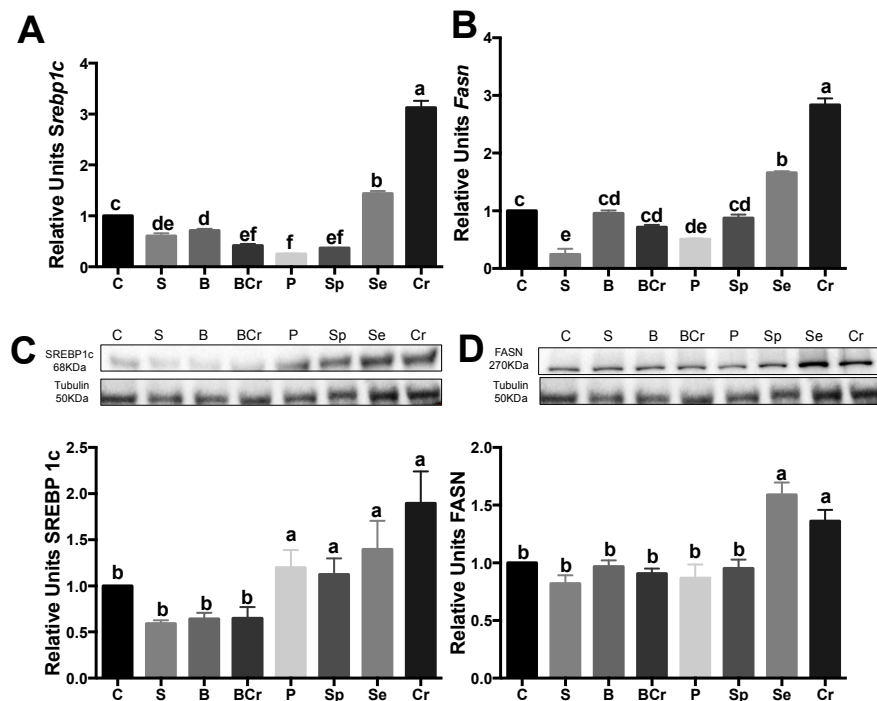


Figure 4. mRNA gene expression and Western blot analysis of SREBP1C and FASN in healthy rats: (A) *Srebp1c* and (B) *Fasn* mRNA abundance; (C) protein abundance of SREBP1c; and (D) FASN. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript in the bars indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.2. Study 2

3.2.1. Weight Gain, Food Intake and Feed Conversion Ratio of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

After the protein restricted period, the rats had 18% body weight loss. Subsequently, the rats underwent a dietary protein rehabilitation with different types and combinations of proteins. The rats fed LP for seven days lost an additional 4% of body weight, while the rats fed C, BCr or SCr had the highest ($p < 0.05$) final body weight gain after seven days of treatment. The group with the lowest ($p < 0.05$) final body weight gain was the Cr group. The mean daily intake was similar in all groups, with the exception of the rats fed Cr, who had similar food intake to those fed LP (Table 3). The highest FCR was seen in the C or S groups whereas the lowest FCR was seen in the SCr and Cr groups at Day 7.

3.2.2. Serum Biochemical Variables of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

The groups fed C or S had the highest ($p < 0.05$) serum glucose concentration, which were slightly higher than the normal value. The concentrations of serum triglycerides and cholesterol in all groups were within the normal range. Interestingly, the rats fed the C diet had the highest ($p < 0.05$) level of serum insulin, which was high enough to be considered hyperinsulinemia, whereas the rest of the groups had normal insulin concentrations. The groups with the highest ($p < 0.05$) glucagon concentrations were SCr and B. The B and LP groups had the lowest ($p < 0.05$) insulin/glucagon ratios, whereas the C group had the highest insulin/glucagon ratio ($p < 0.05$). We observed that rats fed C, S and B had the highest increase ($p < 0.05$) in albumin concentration, relative to Day 1, after seven days of eating the experimental diets. Interestingly, the rats fed Cr showed the lowest ($p < 0.05$) increase in albumin concentration (Table 3).

3.2.3. Plasma Amino Acids of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

Rats fed LP had the lowest total amount of indispensable plasma amino acids (IAA) and the lowest branched amino acid (BCAA) concentration among the experimental groups. Protein restricted rats fed any of the dietary proteins for rehabilitation showed a significant increase in the concentration of Σ IAA and Σ BCAA ($p < 0.05$). However, the C group showed the highest increase in Σ BCAA and Σ IAA. Interestingly, rats fed SCr exhibited a similar increase in Σ IAA concentration followed by Cr, S, B and BCr. Even though rats fed Cr had higher Σ IAA than S, the limiting amino acids in Cr were tryptophan and lysine (Table 4).

3.2.4. Expression of the mTORC1-Signaling Pathway in the Livers of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

The major differences in the mTORC1-signaling pathway in the liver were observed after one day of consuming the experimental diets. The BCr group showed the highest increase in the phosphorylation of mTORC1 ($p < 0.05$) (Figure 5A), whereas the SCr group showed the highest pS6K1/S6K ratio ($p < 0.05$) (Figure 5B), and the SCr group followed by the BCr group showed the highest expression of eIF4G ($p < 0.05$) (Figure 5C). These results suggest that the combination of dietary proteins significantly increases the hepatic mTORC1-signaling pathway, which could be related to an increase in protein synthesis.

Table 3. Biochemical, anthropometric variables and feed conversion ratio of Sprague-Dawley rats fed different types of protein after a protein-restricted period.

		LP	C	S	B	BCr	SCr	Cr	<i>P</i> ¹	<i>P</i> ²
Initial body weight, g		147.3 ± 2.0 ^a	145.3 ± 1.6 ^{abc}	144.6 ± 1.9 ^{abc}	151.7 ± 1.6 ^a	140.9 ± 1.5 ^{bc}	137.5 ± 1.8 ^c	143.2 ± 2.1 ^{bc}	0.048	0.001
Body weight, day 7, g		114.7 ± 1.5 ^d	157.7 ± 1.9 ^a	138.6 ± 2.6 ^{bc}	140.3 ± 2.6 ^{bc}	154.7 ± 4.5 ^a	149.2 ± 2.5 ^{ab}	133.4 ± 2.1 ^c	0.048	0.001
Food intake, g/day		8.39 ± 0.6 ^b	18.22 ± 1.3 ^a	15.82 ± 0.9 ^a	14.44 ± 0.9 ^a	17.61 ± 0.9 ^a	17.96 ± 1.5 ^a	10.64 ± 0.6 ^b		
Feed conversion ratio, day 7		−3.7 ± 0.4 ^d	0.8 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	−0.3 ± 0.1 ^{bc}	−0.1 ± 0.1 ^b	−1.1 ± 0.2 ^c	−1.0 ± 0.1 ^d		
Biochemical parameters	Day									
Glucose, mmol/L	7	8.5 ± 0.5 ^{ab}	9.3 ± 0.2 ^a	8.6 ± 0.5 ^{ab}	7.8 ± 0.2 ^{bc}	7.4 ± 0.2 ^{bc}	7.0 ± 0.3 ^c	7.7 ± 0.2 ^{bc}		
Triglycerides, mmol/L	7	0.77 ± 0.1 ^b	0.58 ± 0.2 ^b	1.28 ± 0.1 ^a	0.72 ± 0.1 ^b	1.15 ± 0.1 ^a	0.92 ± 0.1 ^b	0.85 ± 0.1 ^b		
Cholesterol, mmol/L	7	1.66 ± 0.1 ^b	2.73 ± 0.1 ^a	2.71 ± 0.1 ^a	1.96 ± 0.1 ^b	2.38 ± 0.2 ^a	2.39 ± 0.2 ^a	2.52 ± 0.1 ^a		
Insulin, pmol/L	7	83.5 ± 6.8 ^d	445.0 ± 15.3 ^a	218.5 ± 16.5 ^b	148.1 ± 10.9 ^c	230.3 ± 12.9 ^b	249.5 ± 16.9 ^b	239.0 ± 13.8 ^b		
Glucagon, ng/L	7	74.3 ± 3.7 ^c	88.9 ± 6.3 ^{bc}	99.0 ± 4.7 ^{ab}	110.2 ± 2.2 ^a	76.3 ± 3.2 ^{bc}	114.1 ± 3.8 ^a	105.2 ± 3.8 ^{ab}		
Insulin/Glucagon	7	1.1 ± 0.1 ^c	5.1 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.3 ^{bc}	1.4 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.2 ^b	2.2 ± 0.2 ^{bc}	2.3 ± 0.1 ^{bc}		
Albumin g/dL	Δ7-1	−0.25 ± 0.07 ^d	1.60 ± 0.11 ^a	1.32 ± 0.15 ^{ab}	1.05 ± 0.24 ^{ab}	0.73 ± 0.12 ^b	0.66 ± 0.23 ^b	0.30 ± 0.16 ^c		

LP, low protein; C, casein; S, soy protein; B, black bean protein; Cr, corn protein. The values are mean ± SEM, intake. Means in a row without a common letter differ, *p* < 0.05. Differences are based on one-way ANOVA. Tukey correction was used as post hoc analysis. *P*¹, weight; *P*², weight × diet.

Table 4. Plasma amino acid concentration ($\mu\text{mol/mL}$) of Sprague-Dawley rats fed different types of protein after a protein restricted period.

AMINO ACIDS ($\mu\text{mol/mL}$)	LP	C	S	B	BCr	SCr	Cr
Asp	0.045 \pm 0.001 ^c	0.078 \pm 0.003 ^a	0.061 \pm 0.002 ^b	0.057 \pm 0.003 ^{bc}	0.055 \pm 0.004 ^{bc}	0.059 \pm 0.002 ^{bc}	0.056 \pm 0.003 ^{bc}
Glu	0.24 \pm 0.008 ^b	0.26 \pm 0.006 ^a	0.24 \pm 0.005 ^b	0.23 \pm 0.001 ^b	0.17 \pm 0.003 ^c	0.23 \pm 0.006 ^b	0.18 \pm 0.004 ^c
Ser	0.56 \pm 0.01 ^c	0.92 \pm 0.03 ^{ab}	1.08 \pm 0.06 ^a	0.88 \pm 0.02 ^b	0.83 \pm 0.02 ^b	0.97 \pm 0.03 ^{ab}	0.91 \pm 0.05 ^{ab}
His	0.055 \pm 0.001 ^b	0.100 \pm 0.006 ^a	0.095 \pm 0.004 ^a	0.079 \pm 0.004 ^{ab}	0.060 \pm 0.005 ^b	0.102 \pm 0.008 ^a	0.063 \pm 0.006 ^b
Gly	0.76 \pm 0.01 ^c	0.74 \pm 0.02 ^c	0.94 \pm 0.02 ^b	1.08 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.02 ^{dc}	0.65 \pm 0.02 ^{dc}	0.56 \pm 0.02 ^d
Thr	0.19 \pm 0.03 ^b	0.27 \pm 0.05 ^{ab}	0.37 \pm 0.06 ^{ab}	0.37 \pm 0.02 ^{ab}	0.31 \pm 0.07 ^{ab}	0.41 \pm 0.05 ^a	0.46 \pm 0.02 ^a
Arg	0.02 \pm 0.002 ^c	0.19 \pm 0.001 ^a	0.12 \pm 0.016 ^b	0.15 \pm 0.011 ^{ab}	0.14 \pm 0.012 ^b	0.21 \pm 0.004 ^a	0.16 \pm 0.015 ^{ab}
Ala	1.53 \pm 0.03 ^{cd}	1.68 \pm 0.05 ^{bc}	2.13 \pm 0.06 ^a	1.78 \pm 0.04 ^b	1.34 \pm 0.05 ^d	1.50 \pm 0.07 ^{cd}	1.39 \pm 0.02 ^d
Val	0.070 \pm 0.006 ^d	0.324 \pm 0.016 ^a	0.271 \pm 0.009 ^{ab}	0.242 \pm 0.012 ^{bc}	0.205 \pm 0.008 ^c	0.237 \pm 0.013 ^{bc}	0.215 \pm 0.009 ^c
Met	0.11 \pm 0.009 ^{ab}	0.15 \pm 0.010 ^a	0.11 \pm 0.007 ^{ab}	0.10 \pm 0.007 ^b	0.10 \pm 0.005 ^b	0.12 \pm 0.009 ^{ab}	0.12 \pm 0.010 ^{ab}
Cys	0.607 \pm 0.004 ^c	0.695 \pm 0.013 ^b	0.891 \pm 0.027 ^a	0.768 \pm 0.016 ^b	0.528 \pm 0.008 ^{de}	0.575 \pm 0.012 ^d	0.471 \pm 0.022 ^e
Phe	0.043 \pm 0.004 ^b	0.111 \pm 0.009 ^a	0.111 \pm 0.005 ^a	0.109 \pm 0.008 ^a	0.108 \pm 0.003 ^a	0.113 \pm 0.006 ^a	0.119 \pm 0.006 ^a
Tyr	0.040 \pm 0.002 ^d	0.185 \pm 0.005 ^{ab}	0.170 \pm 0.008 ^{ab}	0.140 \pm 0.008 ^c	0.145 \pm 0.005 ^{bc}	0.190 \pm 0.015 ^a	0.191 \pm 0.003 ^a
Ile	0.046 \pm 0.002 ^d	0.118 \pm 0.004 ^a	0.123 \pm 0.04 ^a	0.096 \pm 0.002 ^b	0.072 \pm 0.03 ^c	0.083 \pm 0.05 ^{bc}	0.066 \pm 0.004 ^c
Leu	0.060 \pm 0.005 ^d	0.201 \pm 0.006 ^b	0.179 \pm 0.008 ^{bc}	0.156 \pm 0.003 ^c	0.201 \pm 0.011 ^b	0.230 \pm 0.011 ^a	0.259 \pm 0.012 ^a
Lys	0.30 \pm 0.006 ^{cd}	0.49 \pm 0.012 ^{ab}	0.51 \pm 0.022 ^a	0.42 \pm 0.012 ^b	0.28 \pm 0.016 ^d	0.35 \pm 0.012 ^{bc}	0.17 \pm 0.014 ^e
Pro	0.31 \pm 0.01 ^c	0.68 \pm 0.02 ^a	0.48 \pm 0.001 ^b	0.34 \pm 0.02 ^c	0.45 \pm 0.01 ^b	0.39 \pm 0.02 ^c	0.51 \pm 0.001 ^b
Trp	0.036 \pm 0.003 ^b	0.093 \pm 0.008 ^a	0.078 \pm 0.004 ^a	0.031 \pm 0.002 ^b	0.024 \pm 0.003 ^b	0.037 \pm 0.005 ^b	0.018 \pm 0.003 ^c
Asn	0.032 \pm 0.001 ^c	0.065 \pm 0.03 ^b	0.116 \pm 0.007 ^a	0.70 \pm 0.004 ^b	0.75 \pm 0.005 ^b	0.108 \pm 0.03 ^a	0.081 \pm 0.001 ^b
Gln	0.81 \pm 0.01 ^c	0.89 \pm 0.001 ^a	0.88 \pm 0.001 ^a	0.84 \pm 0.001 ^{bc}	0.72 \pm 0.001 ^d	0.87 \pm 0.01 ^{ab}	0.71 \pm 0.01 ^d
Σ BCAA	0.526 \pm 0.004 ^d	1.929 \pm 0.03 ^a	1.722 \pm 0.022 ^b	1.481 \pm 0.022 ^c	1.432 \pm 0.022 ^c	1.653 \pm 0.026 ^b	1.620 \pm 0.030 ^b
Σ IAA	1.909 \pm 0.01 ^e	4.666 \pm 0.02 ^a	3.993 \pm 0.02 ^c	3.994 \pm 0.02 ^c	3.684 \pm 0.02 ^d	4.692 \pm 0.02 ^a	4.462 \pm 0.03 ^b

Σ BCAA = The sum of the concentration of the three branched chain amino acids Val, Leu, Ile. Σ IAA = The sum of the concentration of the amino acids Thr, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Lys, His, Arg. C: casein; LP: low protein; S: soy protein; B: black bean protein; Cr: corn protein; BCr: black bean protein + corn protein; SCr: Soy protein + corn protein. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

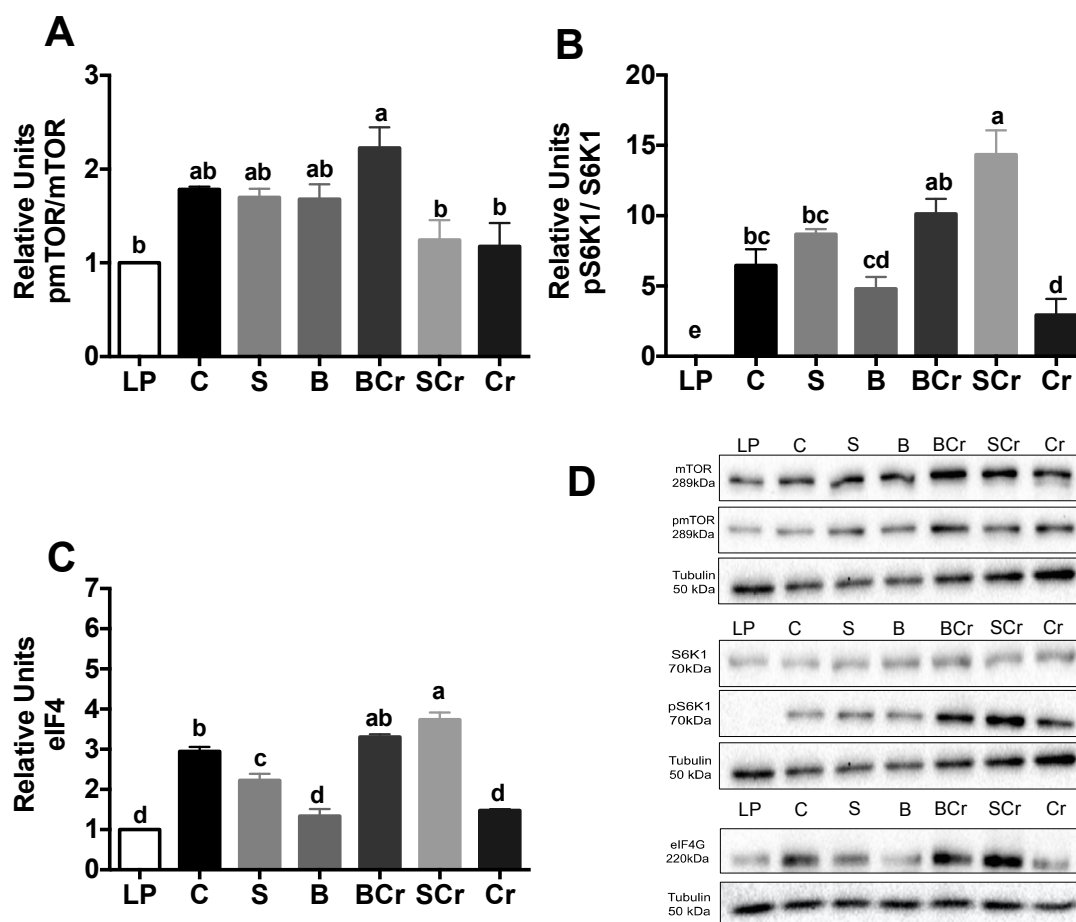


Figure 5. Western blot analysis and quantification of the: (A) phosphorylation of mTORC1; (B) phosphorylation of S6K1; and (C) protein abundance of eIF4G in the livers of rats fed different types of proteins after a protein restricted period; and (D) representative Western blot analysis. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.2.5. Expression of the Amino Acid Transporter SNAT2 in the Liver of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

Previous studies demonstrated that SNAT2 was upregulated in response to amino acid deprivation [42]. Thus, we evaluated SNAT2 as a possible amino acid sensor and if it could be regulated by the physiological state. The gene expression of *Snat2* was significantly increased ($p < 0.05$) in the SCr and Cr groups after one day of eating the experimental diets (Figure 6A); interestingly after seven and 14 days of eating the experimental diets there is a significant decrease ($p < 0.05$) in the gene expression of *Snat2* (Figure 6B) regardless the experimental diet indicating adaptive regulation, a process in which amino acid starvation induces the transport activity [43]. The protein expression of SNAT2 was significantly elevated ($p < 0.05$) after one day of eating the experimental diets and decreased after seven and 14 days of dietary protein rehabilitation (Figure 6C).

3.2.6. Expression of GCN2 and eIF2 α in the Liver of Rats Fed Different Types of Proteins after a Restricted Protein Period

Rats fed Cr showed the highest expression of GCN2 after seven and 14 days ($p < 0.0001$) of eating the experimental diets, while rats fed C, S, B, BCr or SCr showed the lowest expression of GCN2 (Figure 7A,C). Despite the abundance of GCN2 in all groups, we did not observed phosphorylation of its target protein eIF2 α (Figure 7B,D).

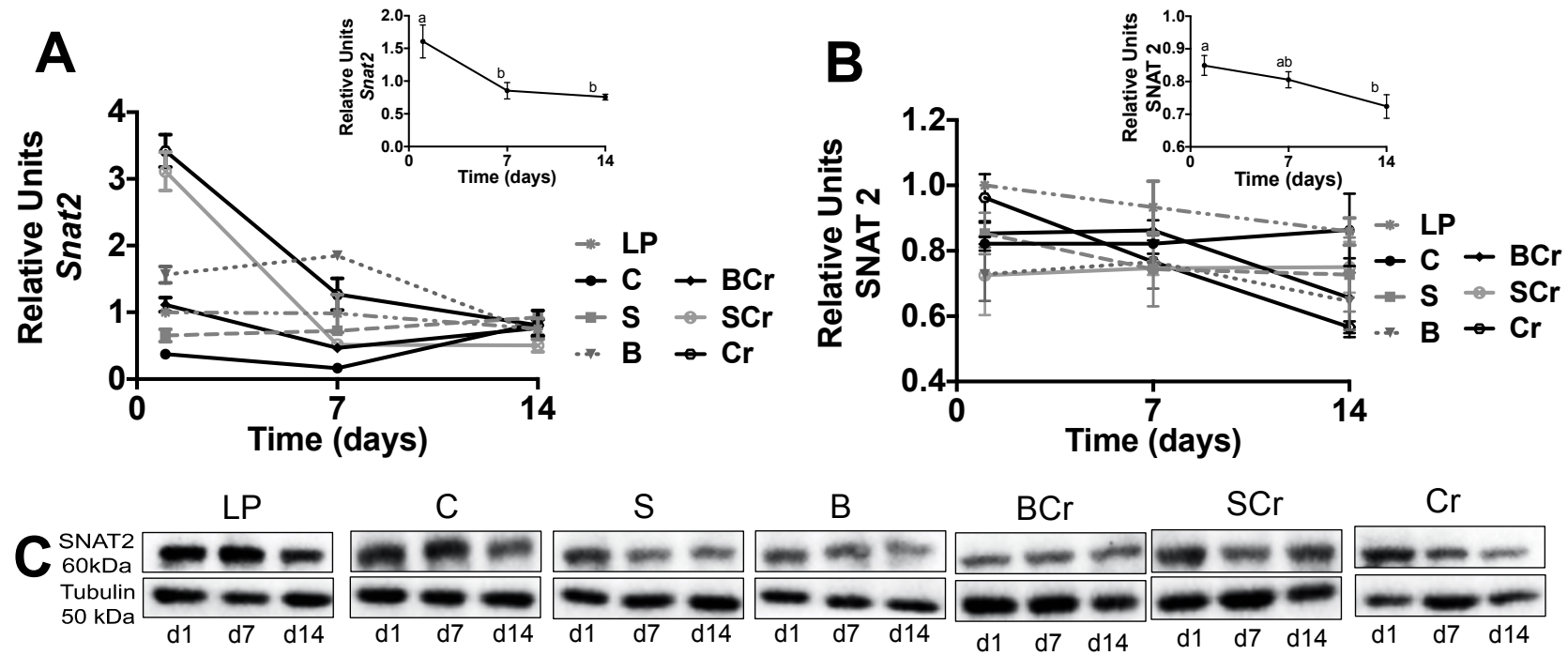


Figure 6. mRNA gene expression and Western blot analysis of SNAT2 in liver of rats fed different types of proteins after a protein restricted period: (A) *Snat2* mRNA abundance; (B) protein abundance of *Snat2*; and (C) representative Western blot analysis. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among time, $p < 0.05$, $a > b > c$.

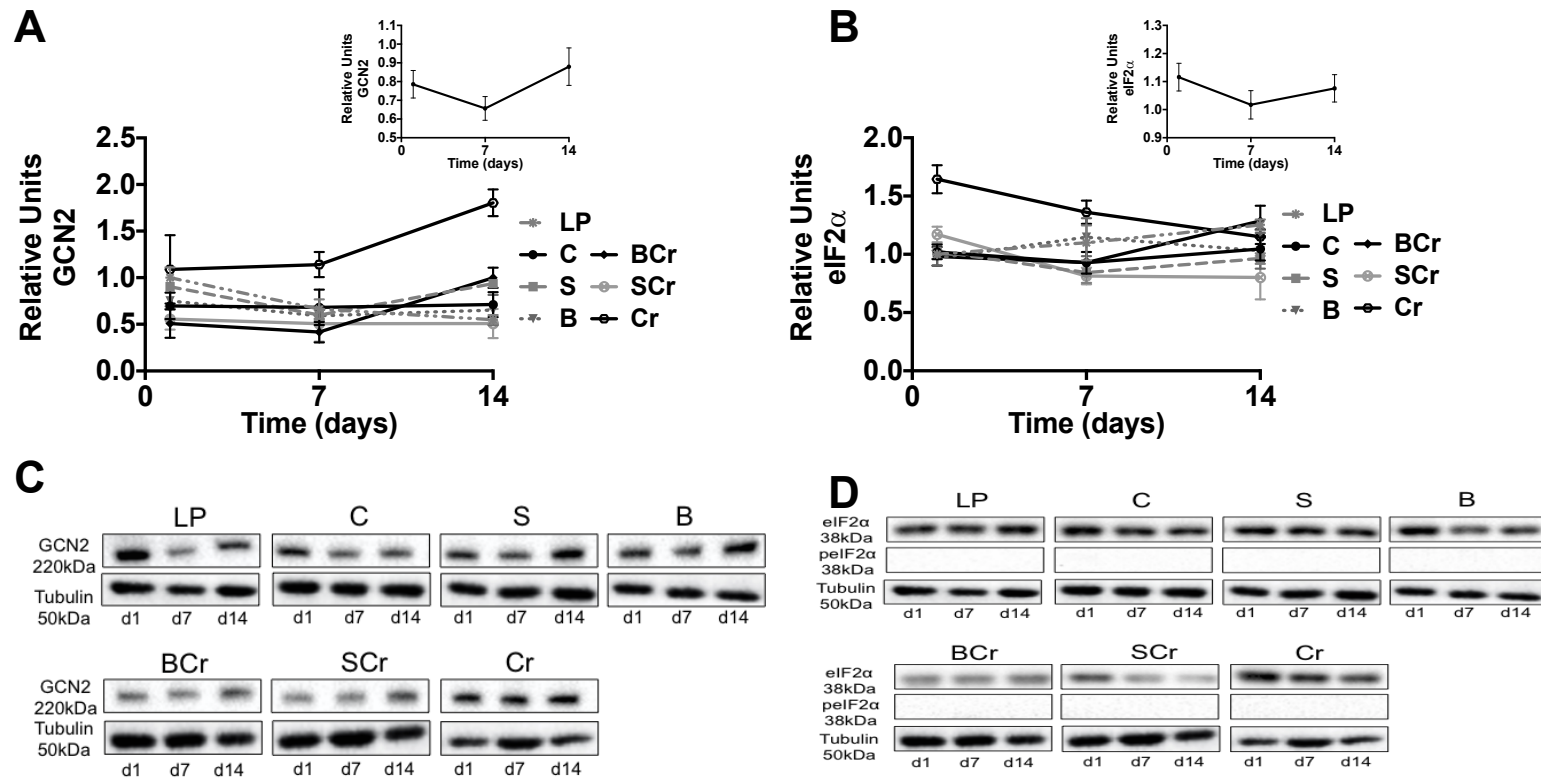


Figure 7. Western blot analysis and quantification of GCN2 and eIF2 α in liver of rats fed different types of proteins after a protein restricted period: (A) representative Western blot analysis of GCN2 and (B) eIF2 α ; (C) protein abundance of GCN2; and (D) protein abundance of eIF2 α . Values are means \pm SEM, $n = 3$, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.2.7. Liver Gene and Protein Expression of the Transcription Factor SREBP1c and Its Target Enzyme FASN of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

Srebp1c gene expression was significantly increased in the C, Cr and LP groups ($p < 0.05$), and, interestingly, the S group showed the lowest expression of *Srebp1c* ($p < 0.05$) (Figure 8A). SREBP1c protein expression was significantly increased ($p < 0.05$) in the Cr group by 2.7-fold in comparison with the LP group (Figure 8C). The gene expression of *Fasn* was significantly increased ($p < 0.05$) in the Cr group, and the rats fed S had the lowest expression of *Fasn* ($p < 0.05$) (Figure 8B). The highest protein expression of FASN was observed in the Cr group and was significantly decreased by the combination of Cr with S or B (Figure 8D).

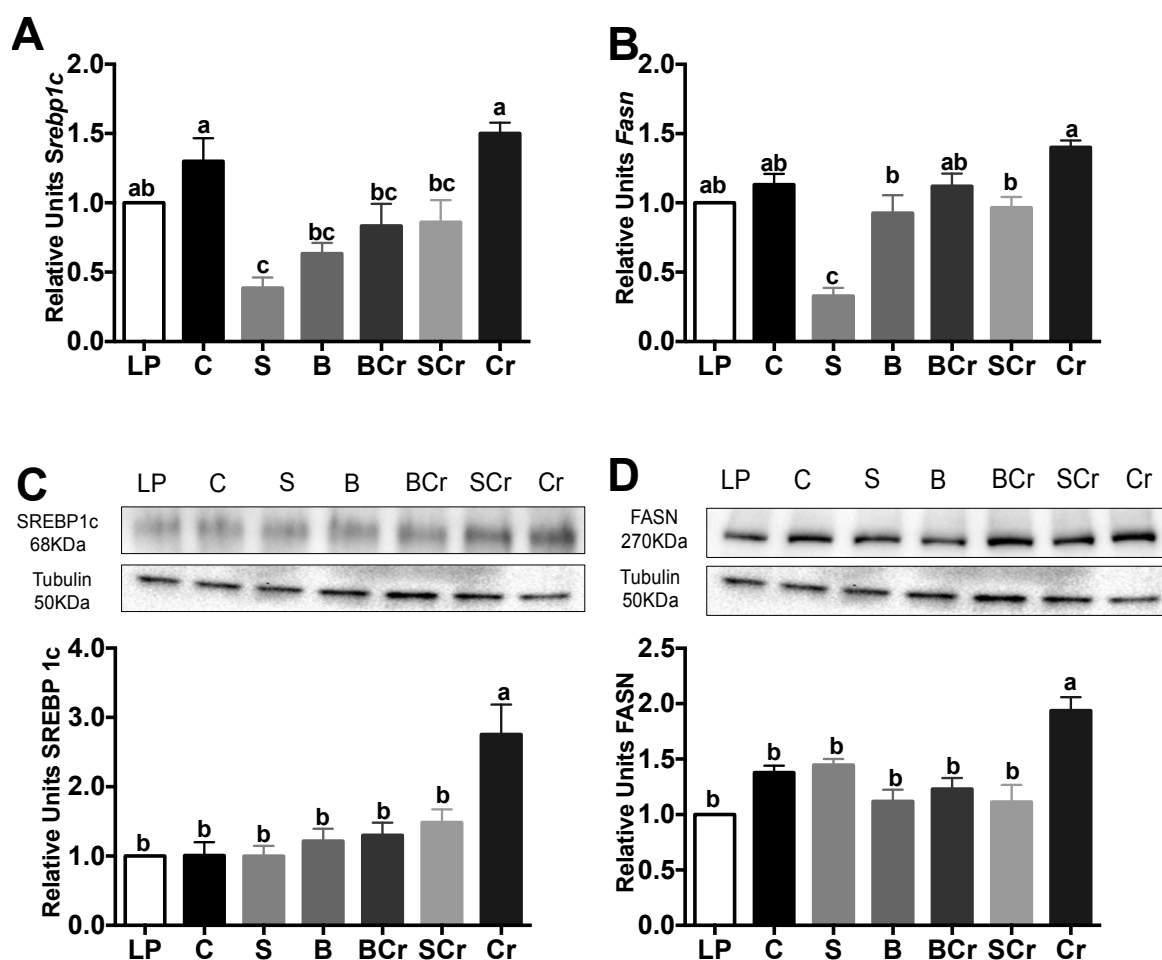


Figure 8. mRNA gene expression and Western blot analysis of SREBP1c and FASN in rats fed different types of proteins after a protein restricted period: (A) *Srebp1c* mRNA abundance; (B) *Fasn* mRNA abundance; (C) abundance of SREBP1c; and (D) abundance of FASN. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.2.8. Hepatic Polysome Profile of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

The results indicate that each type of dietary protein generates a specific pattern of expression and phosphorylation of factors involved in the initiation of translation leading to a specific pattern of polysome formation. In general, there was a significant increase ($p < 0.05$) in polysome formation in all groups in comparison with the LP group (Figure 9A–G). The polysome profiles in the livers of rats fed SCr, S and BCr showed the highest polysome formation (Figure 9H) indicating a possible increase in the initiation of protein translation.

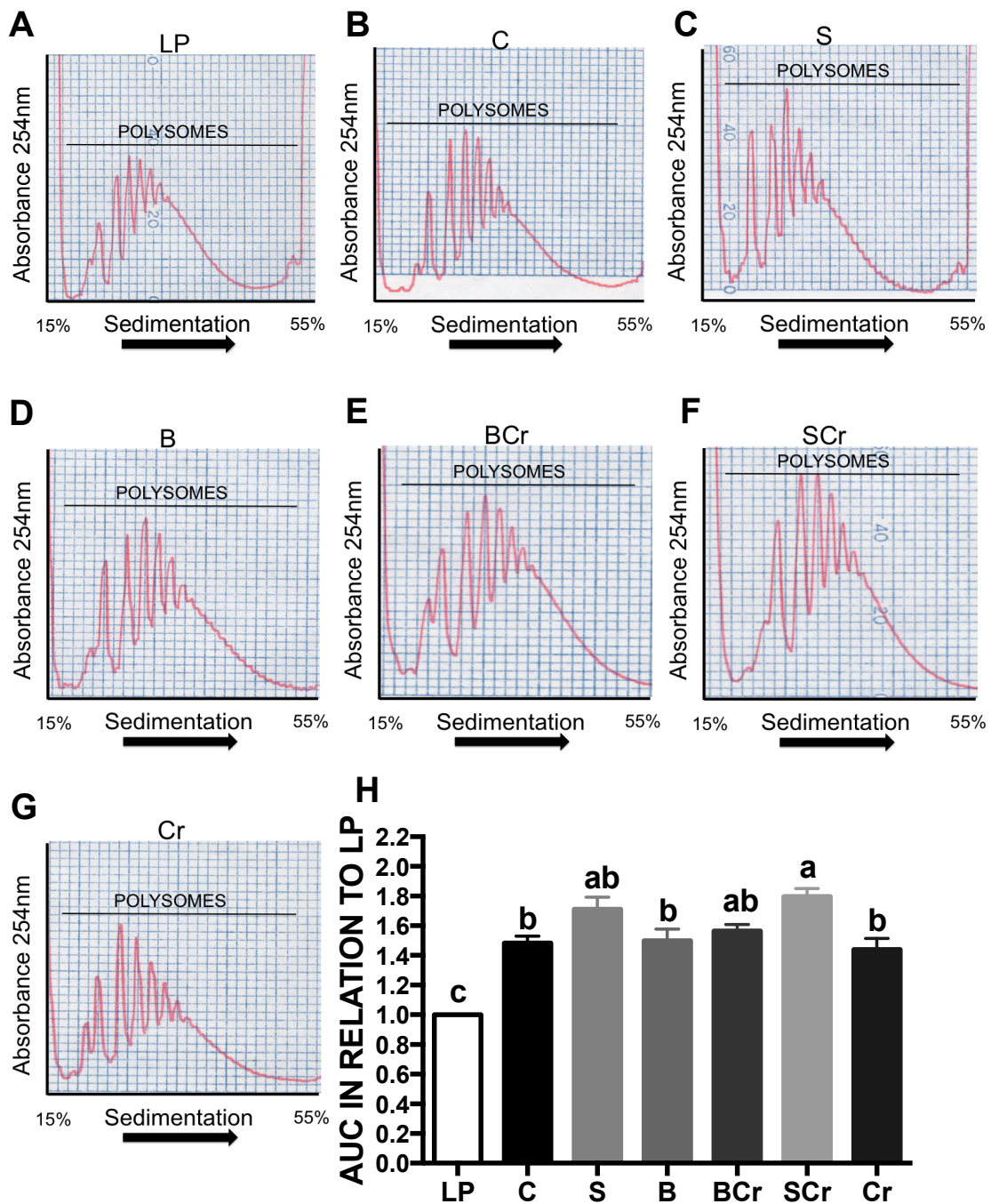


Figure 9. Hepatic polysome profile of rats fed different types of dietary proteins after a protein restricted period: (A) 0.5% casein; (B) casein; (C) soy; (D) black bean; (E) black bean + corn; (F) soy + corn; (G) corn; and (H) area under the curve analysis. The values are mean ± SEM, $n = 3$ per group. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

3.2.9. Expression of the mTORC1-Signaling Pathway in the Muscles of Rats Fed Different Types of Proteins after a Protein Restricted Period

Skeletal muscle is one of the main sites of protein synthesis. After a meal, as nutrients are absorbed, the rate of protein synthesis increases [44]. Because the Cr diet contains three times the leucine requirement, and leucine increases protein synthesis, we were interested in evaluating whether the Cr diet could modify muscle mTORC1-signaling pathway. No changes were observed in the phosphorylation of mTORC1 and S6K1 in muscle after one day of consuming the different experimental

diets (Figure S1). Interestingly, after seven days of consuming the experimental diets, we observed a significant increase in the mTORC1 phosphorylation in the B and BCr groups followed by the S group. The Cr and SCr groups showed the lowest p-mTORC1/mTORC1 ratio (Figure 10A). The BCr group followed by the SCr group showed the highest ($p < 0.05$) p-S6K1/S6k1 ratio among the groups (Figure 10B). The protein expression of eIF4G in muscle was significantly increased in the S and BCr groups (Figure 10C).

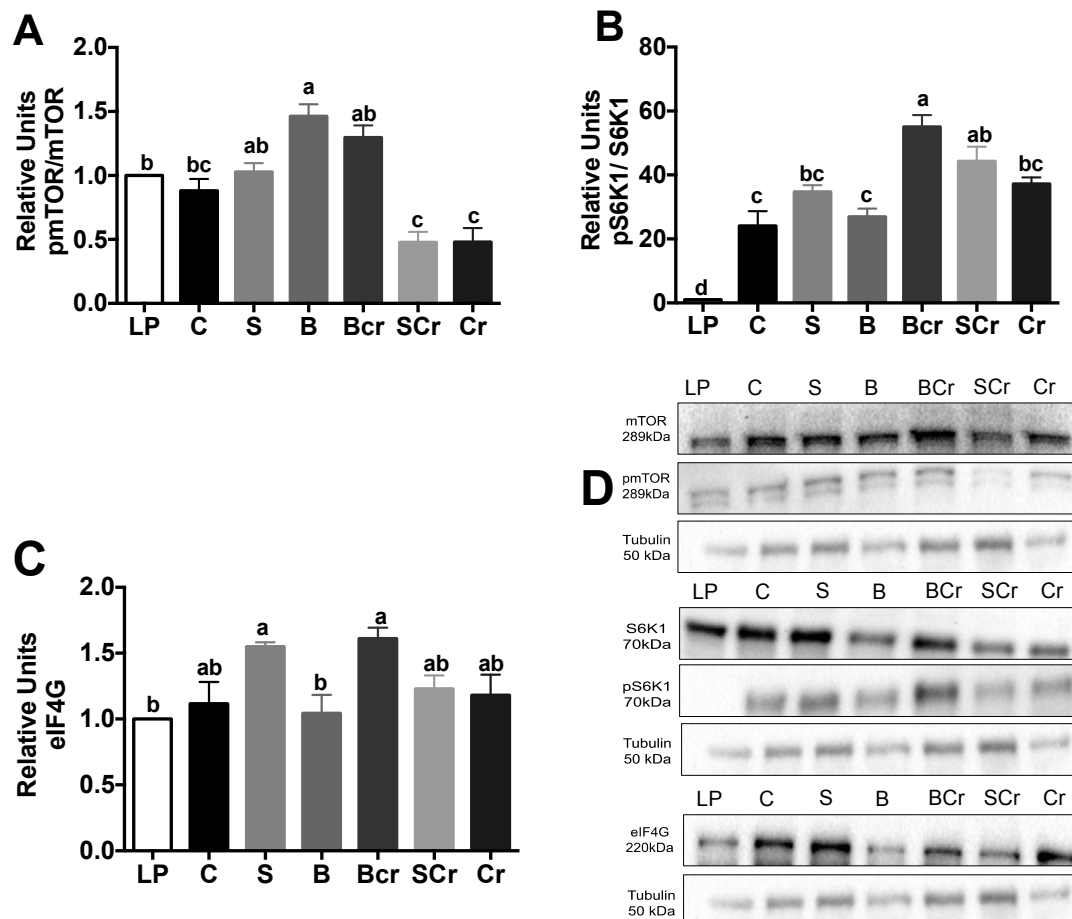


Figure 10. Western blot analysis and quantification of the: (A) phosphorylation of mTORC1; (B) phosphorylation of S6K1; (C) protein abundance of muscle eIF4G; and (D) representative Western blot of rats fed different types of protein for seven days after a protein restricted period. Values are means \pm SEM, $n = 3$. Different letter superscript indicates significant differences among groups, $p < 0.05$, $a > b > c$.

4. Discussion

Undernutrition and malnutrition are serious health problems that affect 795 million individuals worldwide. The use of dietary proteins, particularly the combination of legumes and cereals, has been reported to be a good strategy for combating undernutrition [8]. Legume proteins are a good source of lysine but are deficient in methionine, and cereals are rich in methionine but deficient in lysine and tryptophan. Thus, the combination of these two proteins results in proteins with a quality similar to those from animal sources [9,10]. Using nutrigenomics, it is currently possible to understand the mechanism of action at the molecular level that determines how these proteins or combinations of proteins can regulate protein synthesis through the activation of the mTORC1 signaling pathway after a protein restricted period. In order to know more about the possible sensor of amino acids in the cells, we also studied the transport system SNAT2. Certain amino acid transporters such as SNAT2 may

have dual receptor-transporter function operating as transceptors [45]. Consequently, the activity of this amino acid transporter could potentially activate mTORC1 [24].

We assessed the effect of quality of different types of proteins. The quality of a protein is evaluated by expressing the content of the first limiting essential amino acid of the test protein as a percentage of the content of the same amino acid in a reference pattern of essential amino acids to identify the best proteins to use in the dietary protein rehabilitation experiment. Several studies have demonstrated the benefits of soy protein [46] on optimal animal growth, however less is known about the effects of other vegetable proteins. We found that C, S, P, BCr and B were the best proteins for adequate weight gain, and BCr and P proteins had the highest FCR, however, P was not included in the second part because the consumption of this protein produced high postprandial glucose concentration. The proteins with the lowest chemical scores were Sp (47), Se (42) and Cr (34), as was reflected by lower weight gain in these groups with respect to rest of the groups. Interestingly, rats fed vegetable proteins showed lower serum Hcy concentration than casein, indicating that consumption of vegetable protein could reduce the risk of atherosclerosis [47,48]. In the second part of the study, we included the combination of BCr and SCr since corn contains three times the leucine requirement and could have an additive effect on the activation of the mTORC1-signaling pathway and polysome formation. BCr was included in the first study since both proteins constitutes the staple diet for most Mexicans, and after analyzing the results of the first study we realize the importance of combination of proteins mainly a cereal with a legume as previously described [49] for this reason we included SCr combination.

The mTORC1 signaling pathway is highly regulated by insulin and amino acids [23]. To activate mTORC1, sufficient levels of amino acids are necessary and, in particular, the concentrations of leucine and arginine are critical [50]. On the other hand, the System A transporter SNAT2 besides its transporter activity, it has been involved in the activation of the mTORC1-signaling pathway [24]. Interestingly we observed that the expression of this transporter was increased in fasting and decreased after feeding the experimental diets regardless the type or quality of the dietary protein. These results indicate that the regulation of mTORC1 activity is independent of the SNAT2 activity. Previous studies demonstrated that SNAT2 was upregulated in response to amino acid deprivation indicating adaptive regulation, a process in which amino acid starvation induces the transport activity. Interestingly in the present study, we observed that SNAT2 was significantly increased during the fasting and decreased after refeeding independently of the type of protein indicating adaptive regulation. Despite the fact that the Cr diet had almost triple the amount of leucine recommended by the FAO, healthy rats fed the Cr diet showed a significant decrease in the phosphorylation of S6K1 probably due to the limiting amino acids Trp and Lys in this diet. Interestingly, when the Cr protein was combined with B in similar proportions, the phosphorylation of S6K1 was enhanced, indicating that complementation of these proteins could increase ribosomal biogenesis. Interestingly, low quality proteins such as Se or Cr stimulated SREBP1c and its target gene Fasn. This could be due to the low content of lysine. A previous report demonstrated that diets low in lysine cause impairment of growth and development of fatty liver [40]. In the present study, diets with Se or Cr exhibited the lowest lysine content, and this was associated with higher expression of lipogenic genes. However, when Cr is combined with B, the expression of these genes is significantly decreased. These results indicate that the quality of dietary proteins plays an important role in the regulation of fatty acid synthesis.

During the dietary protein rehabilitation after the protein restricted period, the combination of S or B with Cr increased the body weight of rats to a similar extent as that of control rats fed the C diet. This could be explained by an improvement in plasma Σ IAA mainly in the SCr group. It is important to point out that an increase in Σ IAA does not necessarily indicate a very good quality protein. The Σ IAA in the Cr group is similar to the C group, however the limiting amino acids in Cr group were Lys and Trp than can limit the protein synthesis through a decrease of the mTORC1-signaling pathway. The limiting amino acids play an important role in weight gain and the activation of the mTORC1-signaling pathway as seen in the Cr group. SCr or BCr are good protein combinations because they did not increase the serum insulin concentration as observed in the C group, indicating

that complementation of dietary proteins could be a good strategy for dietary protein rehabilitation to avoid the development of hyperinsulinemia and lipogenesis. Interestingly, rats fed Cr showed an increase in the abundance of GCN2, probably due to the limitation of lysine and tryptophan inhibiting polysome formation and the ability to activate mTORC1-signaling pathway. On the other hand, the combination of SCr or BCcr showed a similar pattern of activation of mTORC1, S6K1 and eIF4G increasing polysome formation that could indicate an increase in the initiation of protein synthesis in the liver after a protein restricted period.

During dietary protein rehabilitation, we observed changes in the mTORC1-signaling pathway at Day 1 in liver, whereas we observed changes until Day 7 in muscle. We could not compare the results between liver and muscle at Day 1 because most of the proteins involved in the mTORC1-signaling pathways were not observed in the Western blot analysis for muscle. The most relevant results indicate that the combination of SCr or BCcr are the more adequate protein to regulate some proteins involved in mTORC1-signaling pathway such as S6K1, and eIF4G. Meanwhile, in muscle at Day 7, we observed an increase in p-S6K1 and eIF4G. These results indicate that the protein synthesis rate is faster in liver than in muscle, and it has been reported to be 77%/day in liver and 12%/day in muscle [51,52]. The activation of the mTORC1-signaling pathway in muscle is enhanced by amino acids, particularly leucine [23]; however, we observed that rats fed Cr, with the highest leucine content showed the lowest activation of the mTORC1-signaling pathway. This could be related to the lack of lysine and tryptophan in this protein. Interestingly, when Cr is combined with B or S, the quality of the dietary protein significantly increases and is able to sustain mTORC1 activation in liver and muscle. Differences in the activation of mTORC1 signaling pathway by the different dietary proteins could be due to content and the amino acid pattern of the dietary proteins.

5. Conclusions

Our results provide evidence that the optimal combination of some vegetable proteins complement the deficiency in amino acids of each source and improve the quality of the dietary protein similar to that of animal proteins. It is unrealistic to presume that a perfect diet can be formulated, one that can satisfy all circumstances [33], however mixing adequate vegetable proteins such as SCr, BCcr or S could minimize cost while maintaining adequate growth, activate mTORC1-signaling pathway and increase eIF4G and liver polysome formation after a period of protein restricted diet. The results of the present study could be helpful in the development of local food supplements for the treatment of individuals with malnutrition, although further research is necessary to study other combinations of proteins.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/9/573/s1>. Figure S1: Western blot analysis of the (A) total mTORC1 and phosphorylation of mTORC1, (B) total S6K1 and phosphorylation of S6K1 (C) total eIF4G in the muscles of rats fed different types of proteins for one day after a protein restricted period, Table S1: Amino acid composition of dietary protein sources, Table S2: primers sequence.

Acknowledgments: This work was supported in part by the Programa de Apoyo a la Investigacion y Posgrado (PAIP), grant No. 5000-9096 to (AG) from the Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM) and by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada # 1256477) to (RM). Pilot plant production of black bean concentrate was performed at the Instituto de Biotecnologia-UNAM with the help of Leobardo Serrano, Mario Caro and Raunel Tinoco.

Author Contributions: N.T. and A.R.T. designed the research. C.C.M.-M., C.R.G. and P.A. conducted the research. O.G. and C.C.M.-M. determined serum amino acids. C.C.M.-M., P.A. and R.M. analyzed the data. N.T., C.C.M.-M. and A.R.T. wrote the manuscript. A.G. supervised the production of the experimental protein concentrates (B and Se). N.T. was responsible for the final content of the manuscript. All of the authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baldwin, C.; Parsons, T.; Logan, S. Dietary advice for illness-related malnutrition in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2001**. [[CrossRef](#)]
2. Grover, Z.; Ee, L.C. Protein energy malnutrition. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2009**, *56*, 1055–1068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dietary Reference Intakes. *The Essential Guide to Nutrient Requirements*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2006.
4. Barker, L.A.; Gout, B.S.; Crowe, T.C. Hospital malnutrition: Prevalence, identification and impact on patients and the healthcare system. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 514–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Food and Agriculture Organization; International Fund for Agricultural Development; World Food Programme. *The State of Food in Security in the World 2015*; FAO: Rome, Italy, 2015.
6. Trabal, J.; Farran-Codina, A. Effects of dietary enrichment with conventional foods on energy and protein intake in older adults: A systematic review. *Nutr. Rev.* **2015**, *73*, 624–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Francis, D.K.; Smith, J.; Saljuqi, T.; Watling, R.M. Oral protein calorie supplementation for children with chronic disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *5*, CD001914. [[PubMed](#)]
8. Bressani, R.; Aguirre, A.; Scrimshaw, N.S. All-vegetable protein mixtures for human feeding. II. The nutritive value of corn, sorghum, rice and buckwheat substituted for lime-treated corn in incap vegetable mixture eight. *J. Nutr.* **1959**, *69*, 351–355. [[PubMed](#)]
9. Mensa-Wilmont, Y.; Phillips, R.D.; Hargrove, J.L. Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutr. Res.* **2001**, *21*, 849–857. [[CrossRef](#)]
10. Scrimshaw, N.S.; Bressani, R.; Behar, M.; Viteri, F. Supplementation of cereal proteins with amino acids. I. Effect of amino acid supplementation of corn-masa at high levels of protein intake on the nitrogen retention of young children. *J. Nutr.* **1958**, *66*, 485–499. [[PubMed](#)]
11. Gorissen, S.H.; Horstman, A.M.; Franssen, R.; Crombag, J.J.; Langer, H.; Bierau, J.; Respondek, F.; van Loon, L.J. Ingestion of wheat protein increases in vivo muscle protein synthesis rates in healthy older men in a randomized trial. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 1651–1659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kanda, A.; Nakayama, K.; Sanbongi, C.; Nagata, M.; Ikegami, S.; Itoh, H. Effects of whey, caseinate, or milk protein ingestion on muscle protein synthesis after exercise. *Nutrients* **2016**, *8*, 339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Carrillo, M.C.; Carnovale, C.E.; Favre, C.; Monti, J.A.; Scapini, C. Hepatic protein synthesis and serum aminoacid levels during liver regeneration in young and old malnourished rats. *Mech. Ageing Dev.* **1996**, *91*, 55–64. [[CrossRef](#)]
14. Chotchuang, N.; Azzout-Marniche, D.; Bos, C.; Chaumontet, C.; Gausseres, N.; Steiler, T.; Gaudichon, C.; Tome, D. mTOR, Ampk, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E1313–E1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yoshizawa, F.; Kimball, S.R.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, E814–E820. [[PubMed](#)]
16. Van Vliet, S.; Burd, N.A.; van Loon, L.J. The skeletal muscle anabolic response to plant- versus animal-based protein consumption. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1981–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Butteiger, D.N.; Cope, M.; Liu, P.; Mukherjea, R.; Volpi, E.; Rasmussen, B.B.; Krul, E.S. A soy, whey and caseinate blend extends postprandial skeletal muscle protein synthesis in rats. *Clin. Nutr.* **2013**, *32*, 585–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hernandez, M.; Montalvo, I.; Sousa, V.; Sotelo, A. The protein efficiency ratios of 30:70 mixtures of animal:vegetable protein are similar or higher than those of the animal foods alone. *J. Nutr.* **1996**, *126*, 574–581. [[PubMed](#)]
19. Le, L.T.; Sabate, J. Beyond meatless, the health effects of vegan diets: Findings from the adventist cohorts. *Nutrients* **2014**, *6*, 2131–2147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Proud, C.G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5338–5349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tan, V.P.; Miyamoto, S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *95*, 31–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bai, X.; Jiang, Y. Key factors in mtor regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 239–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**, *149*, 274–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pinilla, J.; Aledo, J.C.; Cwiklinski, E.; Hyde, R.; Taylor, P.M.; Hundal, H.S. SNAT2 transceptor signalling via mTOR: A role in cell growth and proliferation? *Front. Biosci.* **2011**, *3*, 1289–1299. [[CrossRef](#)]
25. Broer, S. The SLC38 family of sodium-amino acid co-transporters. *Pflug. Arch.* **2014**, *466*, 155–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dickinson, J.M.; Rasmussen, B.B. Amino acid transporters in the regulation of human skeletal muscle protein metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, *16*, 638–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Duvel, K.; Yecies, J.L.; Menon, S.; Raman, P.; Lipovsky, A.I.; Souza, A.L.; Triantafellow, E.; Ma, Q.; Gorski, R.; Cleaver, S.; et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 171–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Efeyan, A.; Comb, W.C.; Sabatini, D.M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **2015**, *517*, 302–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Proud, C.G. A new link in the chain from amino acids to mTORC1 activation. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 7–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Toyoshima, Y.; Tokita, R.; Ohne, Y.; Hakuno, F.; Noguchi, T.; Minami, S.; Kato, H.; Takahashi, S. Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *J. Mol. Endocrinol.* **2010**, *45*, 329–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Averous, J.; Lambert-Langlais, S.; Mesclon, F.; Carraro, V.; Parry, L.; Jousse, C.; Bruhat, A.; Maurin, A.C.; Pierre, P.; Proud, C.G.; et al. GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. 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.* **1993**, *123*, 1939–1951. [[PubMed](#)]
33. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [[CrossRef](#)]
34. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Torres, N.; Torre-Villalvazo, I.; Tovar, A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 365–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bonetti, F.; Brombo, G.; Zuliani, G. The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. *Neurodegener. Dis. Manag.* **2016**, *6*, 133–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Iadevaia, V.; Liu, R.; Proud, C.G. mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *36*, 113–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dodd, K.M.; Tee, A.R. Leucine and mTORC1: A complex relationship. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *302*, E1329–E1342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hernandez, G.; Vazquez-Pianzola, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech. Dev.* **2005**, *122*, 865–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tanphaichitr, V.; Zaklama, M.S.; Broquist, H.P. Dietary lysine and carnitine: Relation to growth and fatty livers in rats. *J. Nutr.* **1976**, *106*, 111–117. [[PubMed](#)]
41. Eberle, D.; Hegarty, B.; Bossard, P.; Ferre, P.; Foufelle, F. Srebp transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **2004**, *86*, 839–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Palii, S.S.; Chen, H.; Kilberg, M.S. Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system a gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3463–3471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tanaka, K.; Yamamoto, A.; Fujita, T. Functional expression and adaptive regulation of Na⁺-dependent neutral amino acid transporter SNAT2/ATA2 in normal human astrocytes under amino acid starved condition. *Neurosci. Lett.* **2005**, *378*, 70–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Norton, L.E.; Layman, D.K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 533S–537S. [[PubMed](#)]
45. Taylor, P.M. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 223S–230S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Ascencio, C.; Torres, N.; Isoard-Acosta, F.; Gomez-Perez, F.J.; Hernandez-Pando, R.; Tovar, A.R. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 522–529. [[PubMed](#)]
47. Blum, A.; Hijazi, I.; Eizenberg, M.M.; Blum, N. Homocysteine (hcy) follow-up study. *Clin. Investg. Med.* **2007**, *30*, 21–25.
48. Richter, C.K.; Skulas-Ray, A.C.; Champagne, C.M.; Kris-Etherton, P.M. Plant protein and animal proteins: Do they differentially affect cardiovascular disease risk? *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 712–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bressani, R. Incap studies of vegetable proteins for human consumption. *Food Nutr. Bull.* **2010**, *31*, 95–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Bar-Peled, L.; Sabatini, D.M. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 400–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Garlick, P.J.; Waterlow, J.C.; Swick, R.W. Measurement of protein turnover in rat liver. Analysis of the complex curve for decay of label in a mixture of proteins. *Biochem. J.* **1976**, *156*, 657–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Millward, D.J.; Garlick, P.J.; Stewart, R.J.; Nnanyelugo, D.O.; Waterlow, J.C. Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochem. J.* **1975**, *150*, 235–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).