



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL CONSUMO DE ESPIRULINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS SNAT2,
EL COMPLEJO-1 mTOR Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP-1c
EN HÍGADO DE RATA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ORTIZ HUIDOBRO ROSA ISELA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. NIMBE TORRES Y TORRES PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
DRA. IRMA BERNAL LUGO FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO DEL CONSUMO DE ESPIRULINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS SNAT2,
EL COMPLEJO-1 mTOR Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SREBP-1c
EN HÍGADO DE RATA.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María Amanda Gálvez Mariscal y con la asesoría científica de la Dra. Nimbe Torres y Torres en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. María Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM.
Dra. Nimbe Torres y Torres	Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.
Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM.

Para la realización de los estudios de maestría de la alumna QA Rosa Isela Ortiz Huidobro se otorgó la beca por CONACYT 345861/240108.

El jurado de examen estuvo integrado por:

PRESIDENTE	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez.
VOCAL	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.
VOCAL	Dra. Marta Menjivar Iraheta.
VOCAL	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.
SECRETARIO	Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Amanda Gálvez Mariscal, Dra. Nimbe Torres y Torres y al Dr. Armando Tovar Palacio por guiar y brindar todo su conocimiento y su valiosa colaboración científica y técnica en la realización de este proyecto.

A los integrantes del Comité Tutoral y del Jurado de examen por la revisión crítica de esta tesis.

A todos los colaboradores del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y a todos los colaboradores del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM por toda la ayuda que brindaron para llevar a cabo esta investigación.

A mis Padres

ÍNDICE

	Página
Resumen	11
1. Antecedentes	13
A. Regulación de la expresión génica por nutrimentos.	13
B. El papel de los aminoácidos en la regulación génica.	16
El transportador de aminoácidos SNAT2 como posible sensor de aminoácidos.	18
El papel determinante de mTOR-C1 en el sensado de aminoácidos.	22
Modificaciones en la composición de aminoácidos dietarios repercuten en el metabolismo de lípidos.	28
C. Proteína dietaria.	32
Espirulina. Morfología, taxonomía y hábitat.	33
Composición química.	34
Uso ancestral y redescubrimiento.	38
2. Justificación	40
3. Objetivos	41
4. Hipótesis	41
5. Metodología	42
Formulación de la dieta.	43
Modelo biológico.	48
Parámetros bioquímicos y hormonales en suero.	49
Histología en hígado y tejido adiposo.	51
Expresión génica.	51
Análisis estadístico.	57
6. Resultados	58
Aminogramas.	58
Crecimiento de ratas alimentadas con tres diferentes fuentes de proteína.	61
Consumo de alimento.	63
Histologías.	65
Cambios metabólicos.	67
Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la vía de señalización de SREBP-1c.	71
Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la vía de señalización de mTOR-C1.	77
Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la expresión génica del transportador SNAT2.	80

7. Discusión	82
8. Conclusiones	95
9. Bibliografía	97

ANEXO I.	Especificaciones para caseína y soya.
ANEXO II.	Certificado de salud y seguridad de las ratas Sprague Dawley.
ANEXO III.	Métodos.
ANEXO IV.	Primers para PCR cuantitativo utilizados en este estudio.
ANEXO V.	Ganancia en peso promedio y consumo de alimento promedio de las ratas que se alimentaron con las tres diferentes fuentes de proteína.
ANEXO VI.	Gráficas de distribución del tamaño de adipocitos.

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding Protein 1
ACC	Acetil CoA Carboxilasa
ADP	Adenosín Difosfato
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
Agua-DEPC	Agua-dietilpirocarbonato
AIN-93G	Instituto Americano de Nutrición de dietas para roedores de laboratorio en etapa de crecimiento
AKT/PKB	Protein Kinase B
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	Association Of Analytical Communities
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP	Adenosín Trifosfato
BAU	Bangladesh Agricultural University
CAP	Proteína Adaptadora
cb 1	protooncoproteína
cDNA	DNA complementario
Células HeLa	Línea celular epitelial humana (carcinoma)
Células HepG2	Línea celular derivada de hepatoblastoma humano
Células L6	Línea celular de mioblasto de rata
CENPALAB	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio en Cuba
CHE	colesterol esterasa
CHO	colesterol oxidasa
ChREBP	Carbohydrate Response Element Binding Protein
CISRI-ISP	Programa Institucional Intergubernamental de Espirulina
CPT-1	Carnitina Palmitoiltransferasa-1
CRE	Cyclic AMP Response Element
Deptor	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Ditiotreitol
eEF2K	eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase
eIF4E	eukaryotic translation Initiation Factor 4E
Familia PI3KK	Familia Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa Cinasa
FAO	Food and Agriculture Organizartion
FAS	Fatty Acid Synthase
FDA	Food and Drug Administration

FOI	French Oil Institute
FPIA	Fluorescence Polarization ImmunoAssay
GAP	GTPase-Activating Protein
GCN2	General Control Nonrepressed 2
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GLUT4	Glucose Transporter Type 4
GPO	glicerol-3-fosfato oxidasa
GRAS	Generally Recognized As Safe
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hVps34	human Vacuolar protein-sorting 34
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Insig	Insulin induced gene
IPGRS	Institute of Post-graduate Studies and Research Laboratory
IRES	Internal Ribosome Entry Sequence
IRS	Insulin Receptor Substrate
LPL	lipoproteína lipasa
LRS	leucil-tRNA sintetasa
LXR	Liver X Receptor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCYST-LR	Microcystin leucine-arginine
MeAIB	Metilamino isobutirato
mLST8	mammalian Lethal with Sec13 protein 8
MMVL	Monoleyl Murine Leukemia Virus
mRNA	RNA mensajero
mSIN1	mammalian Stress-activated protein kinase Interacting protein
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTOR-C1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTOR-C2	Mammalian Target of Rapamycin Complex 2
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPU	Net Protein Utilization
ODA	Oregon Department of Agriculture
oligo dT	oligonucleótido de polideoxitimidina
OMS	Organización Mundial de Salud

P110	Proteína 110
P70S6K (S6K1, S6K)	p70 ribosomal S6 Kinase 1
P85	Proteína 85
PATs	Proton-assisted Aminoacid Transporters
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDCD4	Programmed Cell Death 4
PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isozyme 1
PER	Protein Efficiency Ratio
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa
PKB	Protein Kinase B
POD	peroxidasa
p-P70S6K	phospho-p70 ribosomal S6 Kinase
PPAR- α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRAS40	Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa
Rag	Recombination-activating genes
Protor-1	Protein Observed with Rictor-1
PSB	Protein Solving Buffer
PTI	Protein Technologies International
PVDF	policloruro de vinilideno
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RIA	Radio Inmunno Assay
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonucleic Acid
RNASas	ribonucleasas
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR cuantitativa	(RT-PCR tiempo real) Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real acoplado la reacción de la Transcriptasa Reversa
S1P	Site 1 Protease
S2P	Site 2 Protease
SAC	Siam Algae Co.
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Shc	SH2-containing domain
SKAR	S6K1 aly/REF-like target
SLC	Solute-Linked Carrier
SLC38A2	Solute-Linked Carrier 38 Sistem A 2
SLC38A9	Solute-Linked Carrier 38 Sistem A 9

SLC3A2	Solute-Linked Carrier 3 Sistem A 2
SLC7A5	Solute-Linked Carrier 7 Sistem A 5
SNAT2	Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter 2
SOS	Factor intercambiador de nucleotidos de guanina.
SREBF1	Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 1
SREBF2	Sterol Regulatory Element-Binding Transcription Factor 2
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SREBP-1a	Sterol Regulatory Element Binding Protein-1a
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c
SREBP-2	Sterol Regulatory Element Binding Protein-2
TBS-tween	Tris Buffered Saline-Tween
TOR	Target Of Rapamicyn
tRNA	RNA de transferencia
TSC1	Tuberous Sclerosis Complex 1
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
UNU	United Nation University
USDA	United States Department of Agriculture
UTR	untranslated region
V-ATPasa	Vacuolar-tipe H ⁺ -ATPasa
WFP	World Food Programme

RESUMEN

Uno de los problemas más grandes a los que se enfrenta gran parte de la humanidad es la insuficiente disponibilidad de proteínas de buena calidad, lo que ha hecho volver la vista hacia otras fuentes de proteína que se han usado poco en la alimentación humana. La manera en que la célula responde al tipo de aminoácidos presentes en la dieta se lleva a cabo a través de un sensor y a partir de éste se genera la activación de vías de señalización y procesos metabólicos específicos y necesarios para mantener su función. Sin embargo, el mecanismo por el cual la célula "sensa" la disponibilidad de aminoácidos no se ha dilucidado aún con precisión. En este estudio se propone conocer el efecto del consumo de espirulina, por ser considerada una fuente importante de proteína, sobre la expresión génica del sistema de transporte de aminoácidos SNAT2, el complejo-1 mTOR y el factor de transcripción SREBP-1c en hígado de rata. Para lo cual se administraron tres dietas purificadas en polvo con tres diferentes fuentes de proteína: espirulina, caseína y proteína de soya. Las dietas se ajustaron de acuerdo a la formulación publicada por el Instituto Americano de Nutrición de dietas para roedores de laboratorio en etapa de crecimiento (AIN-93G). Se utilizaron ratas Sprague Dawley de la compañía Harlan-UNAM, machos, con peso entre 200 y 250 g recién destetados. Los primeros cuatro días su alimentación fue *ab libitum* y después de este periodo las ratas fueron condicionadas a consumir la dieta experimental durante un horario restringido (9:00–14:30 horas) durante los últimos 17 días. Al día 21 las ratas de cada grupo, previamente anestesiadas en una cámara saturada de CO₂, fueron sacrificadas por decapitación. Primero se sacrificaron 5 ratas de cada grupo (espirulina, caseína o soya) las cuales se encontraban en ayuno y posteriormente se fueron sacrificando 5 ratas de cada grupo, cada 30 minutos y así se obtuvieron las muestras de tejidos a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de haber consumido su alimento. Se determinó en el suero de las ratas la concentración de hormonas (insulina y glucagon) y los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos). Para el estudio de la expresión génica se llevó a cabo la extracción de RNA (Método Chomczynski y Sachi, 1986) y proteína (Método kurien y Scofield, 2006) del hígado de las ratas. Posteriormente, en los extractos de RNA se llevó a cabo la detección y cuantificación (RT-PCR cuantitativa) de los mRNAs de interés y en los extractos de proteína se identificaron y cuantificaron (Western Blot) las proteínas de interés. La espirulina procedente de Solarium Biotechnology fue deficiente en aminoácidos indispensables y su aminoácido limitante fue la lisina. El consumo de esta proteína generó menor ganancia en peso y desnutrición en las ratas, por lo que se consideró una proteína de baja calidad

nutrimental, en comparación con la caseína y la proteína de soya. El patrón de aminoácidos de la espirulina, caseína y soya generó diferencias significativas en la relación insulina/glucagon a los 30 minutos posprandio lo cual se correlacionó con la expresión génica de SREBP-1c y FAS. La espirulina de Solarium Biotechnology que fue deficiente en lisina y que presentó un contenido más alto de arginina, en comparación con la caseína, favoreció la lipogénesis a través del aumento significativo de SREBP-1c y FAS. La activación de mTOR-C1, evaluada a través de la fosforilación de su blanco, la proteína P70S6K, presentó diferencias significativas de acuerdo con el tipo de aminoácidos presentes en la dieta. La espirulina fue deficiente en aminoácidos como: leucina, isoleucina, valina y glutamina y fue responsable del contenido significativamente bajo de p-P70S6K en el hígado de las ratas que consumieron esta dieta durante 120 minutos posprandio. La expresión génica del transportador SNAT2 respondió al contenido de aminoácidos en la dieta de forma adaptativa. Fue significativamente mayor en el ayuno y durante los primeros minutos posprandio. Sin embargo, el perfil de aminoácidos de la espirulina, caseína o soya, principalmente su contenido de alanina y ácido glutámico, no se relacionó directamente con la expresión de este transportador. En el hígado de las ratas que consumieron espirulina no hubo cambios significativos en la expresión de SNAT2 desde el ayuno y hasta las dos horas posprandio. La respuesta celular al perfil de aminoácidos presente en la espirulina, caseína o soya que se generó a partir de la insulina, SREBP-1c, FAS y mTOR-C1 no es suficiente para asegurar que alguna de estas proteínas sea un sensor de aminoácidos. Lo que sí queda claro es que probablemente no haya un sensor de aminoácidos general, sino que puede haber un sensor para cada aminoácido, dependiendo las condiciones a las que sea sometida la célula.

1. ANTECEDENTES

A. Regulación de la expresión génica por nutrimentos

A principios de los años 80's se empezó a estudiar como los nutrimentos eran capaces de regular la expresión de genes (Hanson *et al.*, 1989). Este concepto ha evolucionado a lo que ahora se conoce como nutrigenómica. Entre los objetivos esenciales de la nutrigenómica está el determinar los efectos y mecanismos a nivel molecular por los cuales los nutrimentos de los alimentos o sus componentes bioactivos regulan los procesos metabólicos dentro de las células y tejidos del organismo (Palou *et al.*, 2004). Si se conocen los mecanismos de acción de los nutrimentos, se podrán utilizar alimentos específicos para poder hacer recomendaciones adecuadas y normalizar alteraciones metabólicas, así como parámetros bioquímicos asociados con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas.

Aunque no se conocen con precisión los mecanismos moleculares de acción de todos los nutrimentos se tiene evidencia de que pueden regular la expresión de genes de manera directa o indirecta (Marti *et al.*, 2005) (Figura 1.1).

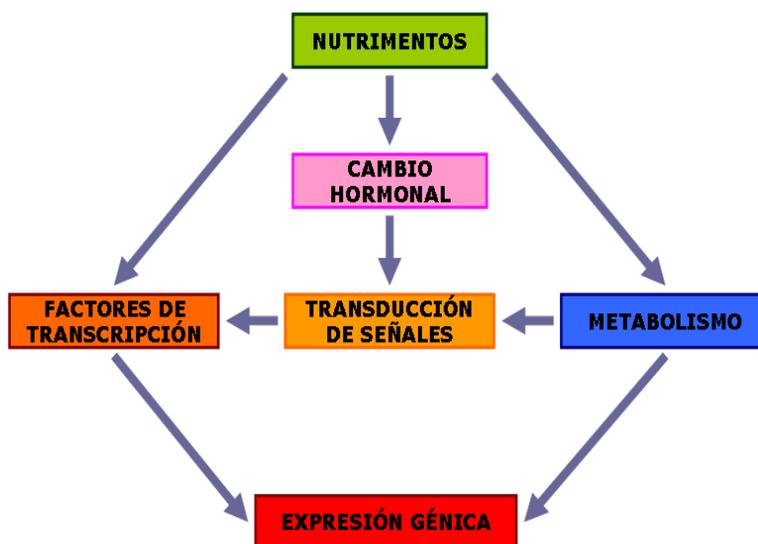


Figura 1.1. Esquema propuesto del efecto de los nutrimentos sobre la expresión génica. Los nutrimentos actúan directamente como ligandos de los factores de transcripción o indirectamente son metabolizados o generan cambios hormonales y están implicados en la transducción de señales para regular la expresión de genes. Fuente: este estudio.

Directamente, a través de la unión de nutrimentos a factores de transcripción en donde los nutrimentos van a servir como “señales” para ser reconocidos por proteínas que se encuentran al interior de la célula, ya sea en el citoplasma o en el núcleo denominados factores de transcripción. Estos factores sirven como “sensores” de los nutrimentos y su función es la de regular la expresión de una variedad de genes, en el momento que se necesite, para sintetizar una proteína específica.

En la actualidad, se sabe que existen varios sensores específicos para nutrimentos, por ejemplo ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) que funciona como sensor de glucosa, LXR (Liver X Receptor) es el sensor de colesterol dietario, PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) es el sensor de ácidos grasos poliinsaturados y es responsable de la oxidación de ácidos grasos durante el ayuno, SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) es sensor de los niveles de insulina (Kaput y Rodríguez, 2004; Kliewer *et al.*, 2001) (Figura 1.2).

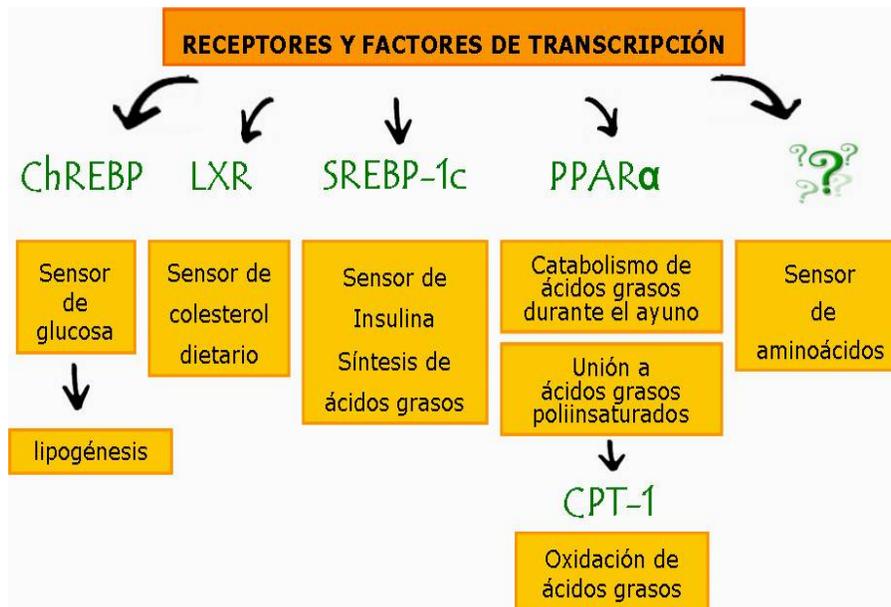


Figura 1.2. Esquema propuesto de receptores y factores de transcripción como sensores para diferentes nutrimentos. Fuente: este estudio.

El mecanismo indirecto para la regulación de la expresión de genes involucra cambios hormonales, principalmente de insulina. Los mecanismos de liberación de insulina en el páncreas son diferentes dependiendo del tipo de nutrimentos consumidos en la dieta (Ascencio *et al.*, 2004).

Después de que la insulina se libera del páncreas, esta hormona va a tener diversas funciones. Al unirse la insulina con su receptor se activan diferentes vías de señalización. Como resultado la insulina estimula la translocación de transportadores de glucosa a la membrana para que pueda entrar la glucosa a las células, la activación de la formación de glucógeno, el incremento en la síntesis de proteínas así como también la estimulación de factores de transcripción, involucrados en la regulación de la expresión de genes de enzimas para la oxidación de la glucosa y la síntesis de ácidos grasos (Torres *et al.*, 2009) (Figura 1.3).

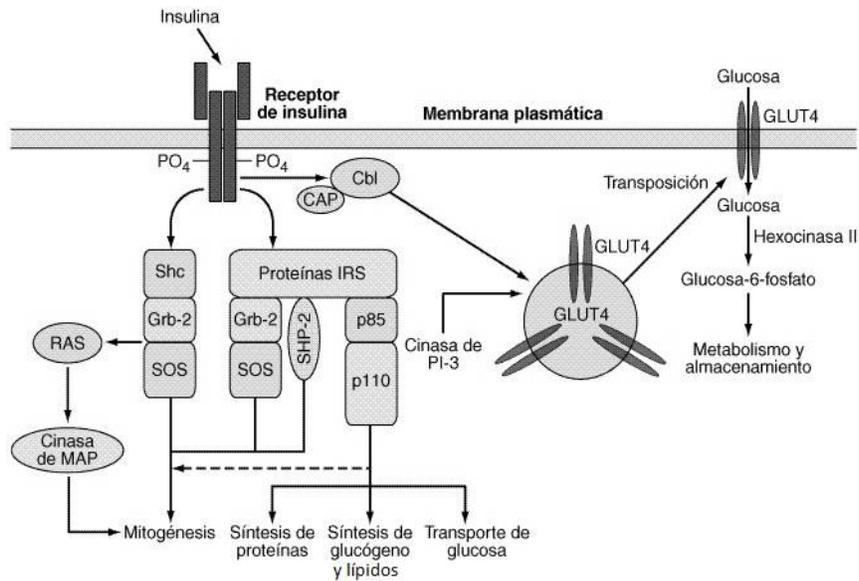


Figura 1.3. Funciones de la insulina en la señalización celular. Fuente: <http://articulosdemedicina.com/insulina/>.

B. El papel de los aminoácidos en la regulación génica.

Entre los nutrimentos implicados en la regulación de la expresión génica se encuentran los aminoácidos, los cuales son fundamentales para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Es ampliamente aceptado que cambios en la disponibilidad de aminoácidos tienen efectos profundos en algunos aspectos de la función celular incluyendo la regulación de la señalización y la expresión génica, así como el transporte y el metabolismo de los propios aminoácidos (Fafournoux *et al.*, 2000; Kilberg *et al.*, 2005; Van Sluijters *et al.*, 2000; Brasse-Lagnel *et al.*, 2009).

Los transportadores de aminoácidos en la superficie de las células están en una localización ideal para transmitir información nutrimental, así como para transportar los mismos nutrimentos, al interior de la célula (Hyde *et al.*, 2003). La capacidad para monitorear y distinguir entre el tipo y la cantidad de aminoácidos extracelulares e intracelulares permite a la célula responder apropiadamente a cambios en el estado nutrimental (Hundal y Taylor, 2009).

Una forma en que los aminoácidos desencadenan una respuesta celular específica es a través de la proteína mTOR-C1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1) la cual ocupa una posición central en la regulación del crecimiento celular por lo que su ruta de señalización se ha relacionado con enfermedades humanas como cáncer, diabetes y tejido hipertrófico. Aunque los aminoácidos son los activadores más potentes de mTOR-C1 el mecanismo molecular de acción por el cual esto ocurre aún no se conoce por completo y en parte se debe a la diversidad estructural y metabólica de los diferentes aminoácidos (Kim, 2009).

Por otro lado, en los últimos años, se ha asumido que el patrón de aminoácidos de cada proteína puede estimular de manera diferente la liberación de insulina por el páncreas y por consiguiente la respuesta celular, debido a la activación de la vía de señalización de SREBP-1c la cual desencadena a su vez procesos lipogénicos (Ascencio *et al.*, 2004).

Por todo lo anterior, se puede decir que la manera en que la célula responde al tipo de aminoácidos presentes en la dieta se lleva a cabo a través de un sensor y a partir de esto se genera la activación de vías de señalización y procesos metabólicos específicos y necesarios para mantener su función. Sin embargo, el

mecanismo por el cual la célula "sensa" la disponibilidad de aminoácidos no se ha dilucidado aún con precisión.

Algunos de los posibles sensores de aminoácidos propuestos en este estudio son: el transportador de aminoácidos SNAT2 (Sodium-coupled Neutral Amino acid Transporter 2), la ruta de señalización de mTOR-C1 y la expresión de SREBP-1c como consecuencia del nivel de secreción de insulina generada por el perfil de aminoácidos presente en la proteína dietaria (Figura 1.4). De cada uno de estos mecanismos se profundizará a continuación.

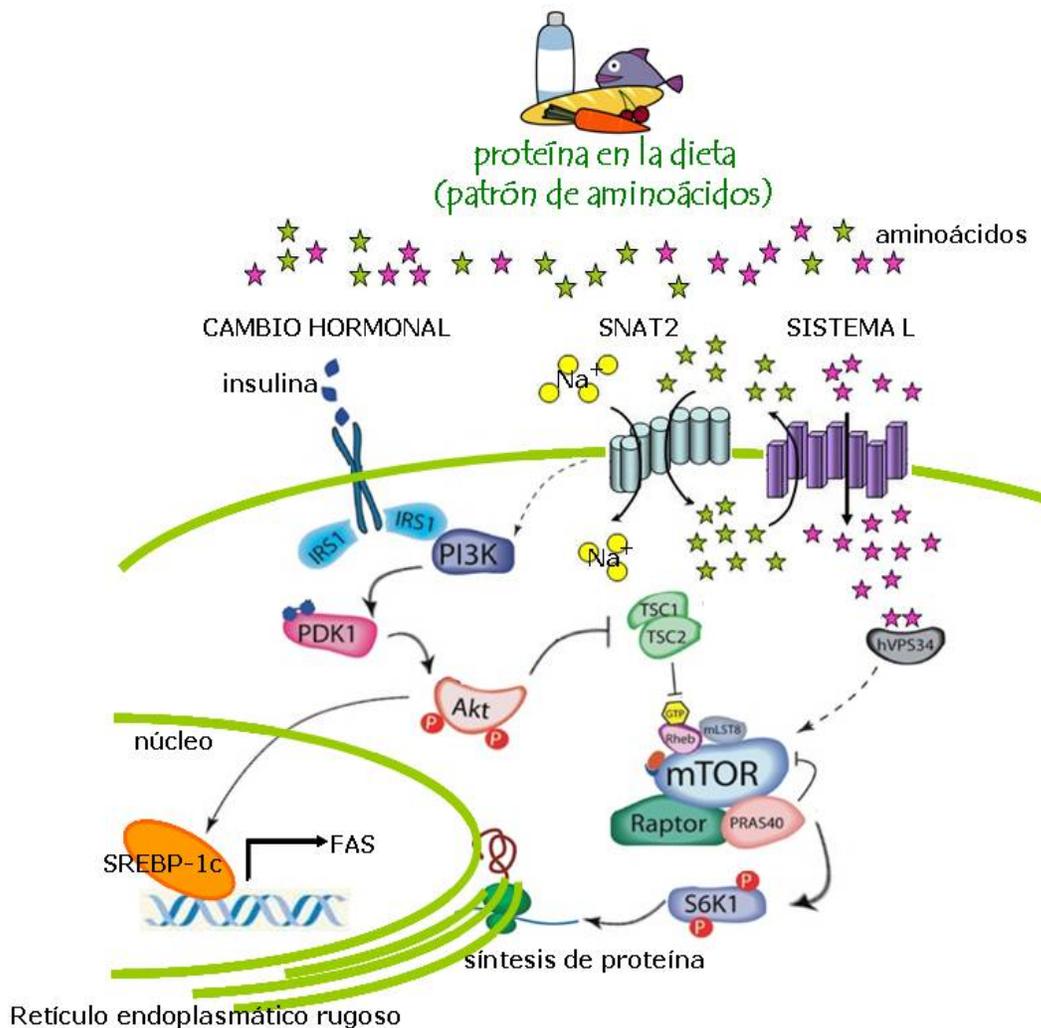


Figura 1.4. Posible respuesta celular al patrón de aminoácidos de la proteína dietaria. SNAT2, mTOR-C1 o SREBP-1c a través de la señalización de insulina, pueden responder a los cambios en la disponibilidad de aminoácidos y ser considerados como sensores de aminoácidos. Fuente: este estudio.

El “transceptor” de aminoácidos SNAT2 como posible sensor de aminoácidos

Algunos transportadores de aminoácidos exhiben una función dual, como transportadores y receptores (“transceptores”) y hay evidencia, en mamíferos, que sugiere que pueden regular la señalización de nutrimentos no sólo por su capacidad de modular la cantidad de aminoácidos libres intracelulares sino también a través de detectar los cambios en la disponibilidad de aminoácidos extracelulares (Hyde *et al.*, 2007).

Varios de los transportadores de aminoácidos, incluyendo miembros de la familia SLC (Solute-Linked Carrier), particularmente la familia SLC38 que está formada por el Sistema A y el Sistema N, funcionan como transportadores activos secundarios, acoplando la movilización de aminoácidos bajo un gradiente electroquímico de Na^+ . Estos transportadores promueven la acumulación intracelular de aminoácidos y de esta manera repercuten sobre las vías de señalización moduladas por receptores de estos nutrimentos. El ciclo de transporte de algunos de estos transportadores es reogénico (genera un flujo iónico) y puede producir cambios en el voltaje a través de la membrana celular de suficiente magnitud para disparar la activación de mecanismos de señalización sensibles a voltaje. Otra consecuencia potencialmente importante de la despolarización en la membrana es que puede inducir un incremento de Ca^{2+} intracelular. Gulati y colaboradores en 2008, han demostrado que la suplementación con aminoácidos incrementa el Ca^{2+} intracelular en células HeLa y que esto es necesario para la activación, inducida por nutrimentos, de la ruta de mTOR-C1 vía la modulación de otra proteína llamada hVps34 (human Vacuolar protein-sorting 34). Sin embargo el grado en que los cambios en el Ca^{2+} citosólico son dependientes del flujo de aminoácidos a través de la membrana plasmática permanece aún por ser explorado en detalle (Gulati *et al.*, 2008).

El Sistema A es una familia de transportadores de aminoácidos que se encarga de transportar aminoácidos neutros de cadena corta como son: alanina, glicina, serina, prolina, cisteína y glutamina. Dentro de esta familia se encuentra el transportador SLC38A2, también conocido como SNAT2, del que se ha reportado que participa activamente en procesos como la duplicación celular y la regulación del volumen celular (Gazzda *et al.*, 1999). En el hígado SNAT2 transporta principalmente alanina y glutamina. La alanina provee átomos de carbono para la gluconeogénesis y nitrógeno para la producción de urea y se ha considerado que el transporte de alanina a través de este sistema es el paso limitante para su utilización como sustrato en la gluconeogénesis (Macedo *et al.*, 2008).

El nivel de actividad de este transportador repercute de manera importante en la concentración de la poza de aminoácidos intracelulares. La glutamina y la alanina representan una porción significativa de la poza total de aminoácidos tanto *in vivo* como *in vitro*; además la glutamina también puede interactuar con otros sistemas intercambiadores como el Sistema L, estimulando la entrada de leucina, isoleucina y valina a las células (Palii *et al.*, 2004).

En células que exhiben un crecimiento rápido y recambio, predominan transportadores de aminoácidos que funcionan como intercambiadores activos terciarios por ejemplo el Sistema L, que como se ha mencionado antes, regula el consumo celular de aminoácidos indispensables, principalmente aminoácidos de cadena ramificada (Figura 1.5), los cuales ejercen una fuerte influencia sobre la ruta de mTOR-C1. Esto sugiere fuertemente que el Sistema L funciona esencialmente como un conducto para la liberación de leucina hacia un receptor intracelular localizado probablemente río arriba de mTOR-C1 (Avruch *et al.*, 2009; Christie *et al.*, 2002).

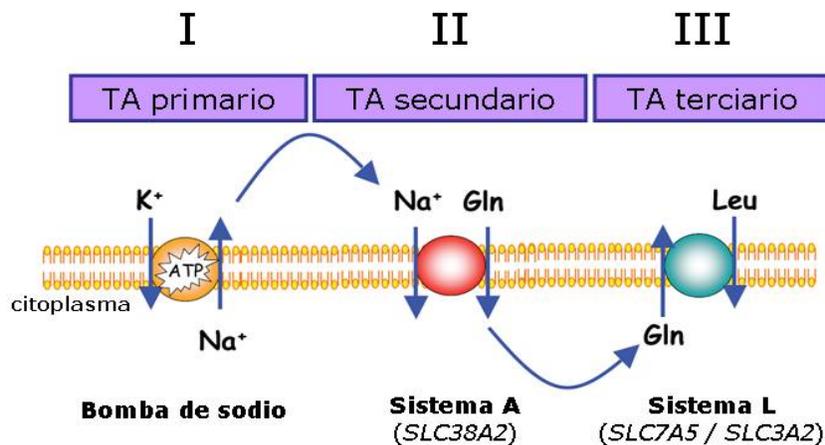


Figura 1.5. La integración de mecanismos de Transporte Activo (TA) primario (I), secundario (II) y terciario (III) puede afectar la distribución transmembranal de aminoácidos particulares. Los transportadores activos secundarios generan un movimiento neto de aminoácidos del exterior al interior, mientras el transporte activo terciario permite la redistribución de aminoácidos individuales sin afectar la cantidad intracelular o extracelular de aminoácidos. Fuente: Hundal y Taylor, 2009.

Aunque una reducción en la cantidad intracelular de aminoácidos tiene un profundo efecto represivo sobre la señalización de mTOR-C1, una caída en la disponibilidad de aminoácidos incrementa la cantidad de tRNAs no cargados lo cual induce la ruta de GCN2 (General Control Nonrepressed 2). La activación de esta ruta en última instancia, sirve para reprimir la síntesis global de proteína permitiendo solamente la síntesis de un conjunto de proteínas específicas, por ejemplo el factor de

transcripción ATF4 (Activating Transcription Factor 4), que mantienen la adaptación celular en un estado nutricional alterado (Kilberg *et al.*, 2005). La importancia de GCN2 y ATF4 con respecto a la detección intracelular de aminoácidos y la adaptación celular es subrayada en estudios en los cuales silenciando su expresión con RNA de interferencia se atenúa la regulación de genes que codifican enzimas biosintéticas de aminoácidos y transportadores de aminoácidos como SNAT2 (Malberg y Adams, 2008; Pali *et al.*, 2006).

Se ha encontrado que la región 5'UTR del mRNA SNAT2 contiene una secuencia IRES (Internal Ribosome Entry Sequence) que sugiere que el mRNA SNAT2 se traduce eficientemente vía un mecanismo independiente de cap a pesar de la reducción global de la síntesis de proteína asociada con la carencia de aminoácidos (Gaccioli *et al.*, 2006).

Una de las respuestas mejor documentadas a la caída global de aminoácidos en células de mamíferos, es la regulación de la actividad de transporte del Sistema A, una respuesta conocida como "regulación adaptativa". El incremento en la actividad del Sistema A ante la disminución de aminoácidos está asociado con el incremento en la expresión y la localización en la superficie celular de SNAT2 (Ling *et al.*, 2001).

Por otro lado, hay evidencia que señala que la interacción entre SNAT2 y sus sustratos es importante en la regulación adaptativa. La noción de que el Sistema A puede sentir la disponibilidad de sus sustratos se basa en experimentos en los cuales la inducción de la síntesis de proteína de SNAT2 en células de músculo L6 privadas de aminoácidos, puede ser atenuada con el reabastecimiento de un solo aminoácido, sustrato de SNAT2, mientras se mantiene la deficiencia de los demás aminoácidos. Se ha sugerido que la ocupación del sitio de unión al sustrato en SNAT2, en el estado de suficiencia de aminoácidos, evoca una señal represiva que mitiga la respuesta adaptativa. Sin embargo, cómo la ocupación de SNAT2 es detectada y cómo esto es traducido a la regulación de eventos transcripcionales continúa siendo desconocido. De cualquier manera es posible que SNAT2 pueda, dependiendo de la unión al sustrato, adoptar una conformación que permita señalar otras moléculas reguladoras de su expresión (Hyde *et al.*, 2007).

Los trabajos publicados de Hyde y colaboradores en 2007, sugieren que el dominio citoplasmático amino-terminal puede ser importante en la estabilización de la expresión de SNAT2 durante la deficiencia de aminoácidos lo cual ocurre como

resultado de la interacción de proteínas que promueven la fosforilación o ubiquitinación y que interactúan con esta parte de los transportadores de aminoácidos (Hyde *et al.*, 2007; Hatanaka *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que proteínas del citoesqueleto y dímeros de integrinas- $\alpha3/\beta1$ interactúan con el Sistema A y pueden ser importantes en la regulación, la localización y la actividad de este acarreador (McCormick y Johnstone, 1995), pero si tales interacciones están mediadas por la región amino-terminal del transportador y tienen un rol en el sensado de aminoácidos y en la transducción de señales, aún no ha sido abordado.

Hay evidencia adicional que indica un papel potencial de SNAT2 en la señalización de aminoácidos. Bevington y colaboradores en 2008 reportaron que la incubación de células musculares con una dosis saturante de un aminoácido N-metilado no metabolizable, el metilamino isobutirato (Me-AIB) que es sustrato modelo para SNAT2, ejerce un efecto estimulador sobre la actividad de la PI3-cinasa activada por insulina y la fosforilación de PKB/Akt. Por el contrario, el silenciamiento de la expresión de SNAT2 con RNA de interferencia tuvo efecto supresor sobre la actividad de PI3-cinasa. Aún es poco claro como SNAT2 puede modular la señalización a PI3-cinasa/PKB pero tal respuesta puede actuar para sinergizar los efectos de la insulina sobre la ruta de mTOR (Evans *et al.*, 2008).

El papel determinante de mTOR-C1 en el sensado de aminoácidos.

Como un proceso biosintético integral, la síntesis de proteínas consume una cantidad sustancial de material celular y energía (Shimizu *et al.*, 2001). Para crecer y proliferar, la célula debe asegurar que suficientes recursos están disponibles para manejar la producción de proteína. Cuando la energía o los aminoácidos llegan a ser limitantes, la producción de proteína necesita ser controlada y así la célula puede usar sus recursos limitados para sobrevivir. Por ello, las células de mamíferos a través de la evolución elaboraron mecanismos de control traduccional, la mayoría de los cuales son sensibles a la disponibilidad de nutrientes (Ma y Blenis, 2009).

En el centro de estos procesos se encuentra la vía de señalización de mTOR, que integra señales tanto intracelulares como extracelulares y sirve como regulador del metabolismo celular, crecimiento, proliferación y supervivencia. Un considerable número de descubrimientos realizados en la última década muestran que cambios en la regulación de la señalización de mTOR están fuertemente implicados en enfermedades humanas como cáncer y diabetes tipo 2 (Laplante y Sabatini, 2009).

TOR es una proteína cinasa serina/treonina miembro de la familia PI3KK (Fosfatidil-Inositol 3 Cinasa Cinasa), altamente conservada desde levadura hasta humano (Cutler *et al.*, 1999). En mamíferos, TOR interactúa con algunas proteínas para formar al menos dos complejos multiproteínicos distintos: mTOR-C1 y mTOR-C2 (Zoncu *et al.*, 2011) (Figura 1.6).

mTOR-C1 tiene cinco componentes: mTOR, el cual es la subunidad catalítica del complejo; Raptor (Regulatory-associated protein of mTOR); mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8); PRAS40 (Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa) y Deptor (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) (Peterson *et al.*, 2009). La función exacta de la mayoría de las proteínas que interactúan con mTOR permanece aún sin ser conocida en detalle. Se ha propuesto que Raptor puede afectar la actividad de mTOR-C1 mediante la regulación en el ensamblaje del complejo y por el reclutamiento de sustratos para mTOR (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). El rol de mLST8 en la función de mTOR-C1 es poco claro, ya que la delección de esta proteína no afecta la actividad de mTOR-C1 *in vivo* (Guertin *et al.*, 2006). PRAS40 y Deptor se han caracterizado como reguladores negativos de mTOR-C1 (Peterson *et al.*, 2009; Sancak *et al.*, 2007; Vander Haar *et al.*, 2007). Cuando la actividad de mTOR-C1 se reduce, PRAS40 y Deptor son reclutados por el

complejo y promueven la inhibición de mTOR-C1. Se ha señalado que PRAS40 regula la actividad cinasa de mTOR-C1 por funcionar como un competidor directo de la unión de sustratos (Wang *et al.*, 2007). Durante la activación, mTOR-C1 directamente fosforila a PRAS40 y Deptor, los cuales reducen su interacción física con el resto del complejo e inicia la señalización de mTOR-C1 (Peterson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007)

En la regulación de la actividad de mTOR-C1 se involucran proteínas como TSC (Tuberous Sclerosis Complex), el cual es un heterodimero que comprende TSC1, también conocido como hamartina, y TSC2 conocido como tuberina. TSC1/2 funciona como una GAP (GTPase-Activating Protein) de una GTPasa pequeña conocida como Rheb (Ras homolog enriched in brain). La forma activa de Rheb, cuando está unida a GTP, interactúa directamente con mTOR-C1 para estimular su actividad (Long *et al.*, 2005; Sancak *et al.*, 2007). El mecanismo exacto por el cual Rheb activa a mTOR-C1 aún no ha sido determinado. Por la actividad GAP específica a Rheb, TSC1/2 regula negativamente la señalización de mTOR-C1, por convertir a Rheb a su forma inactiva cuando esta unida a GDP (Inoki *et al.*, 2003).

mTOR-C2 comprende seis proteínas diferentes: mTOR, Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian Stress-activated protein kinase Interacting protein), Protor-1 (Protein Observed with Rictor-1), mLST8 y Deptor. Existe evidencia de que Rictor y mSIN1 se estabilizan mutuamente y conforman la base estructural de mTOR-C2 (Frias *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). Rictor también interactúa con Protor-1 pero la función fisiológica de esta interacción no es clara (Thedieck *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007). Similar a su rol en mTOR-C1, Deptor regula negativamente la actividad de mTOR-C2 (Peterson *et al.*, 2009). Finalmente, mLST8 es esencial para la función de mTOR-C2: un knockout de esta proteína reduce severamente la estabilidad y la actividad del complejo (Guertin *et al.*, 2006).

En contraste con mTOR-C1, se sabe relativamente poco acerca de la biología de mTOR-C2. La temprana letalidad causada por la delección de los componentes de mTOR-C2 en ratones así como la ausencia de inhibidores han complicado el estudio de este complejo proteínico.

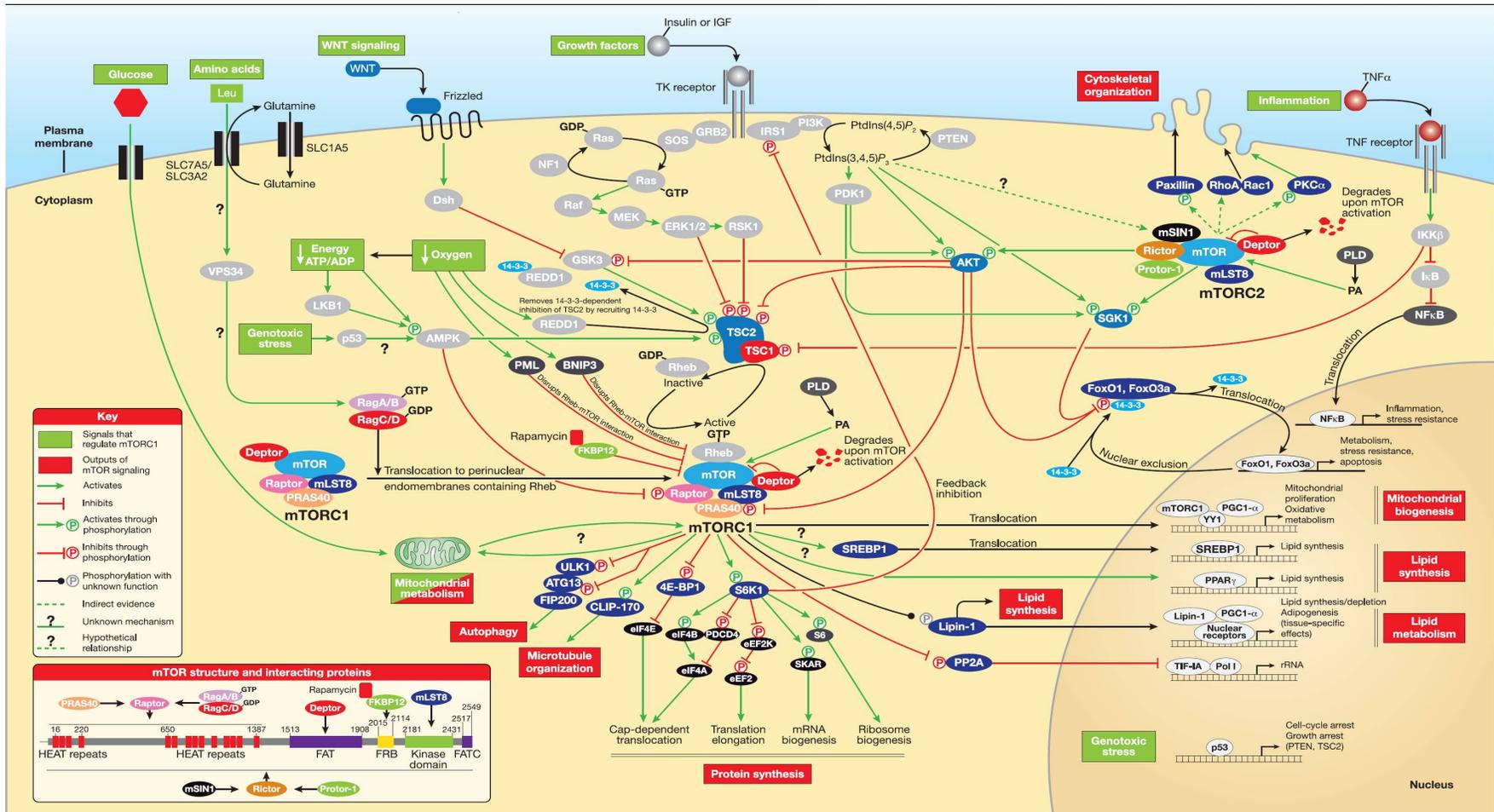


Figura 1.6. Vías de señalización de mTOR. Los complejos mTOR tienen diferencias importantes en cuanto a las señales río arriba que en ellos se integran y en los procesos biológicos que controlan, además de su sensibilidad a un macrólido antifúngico con propiedades inmunosupresoras, la rapamicina, característica de la cual toma su nombre este complejo. Fuente: Laplante y Sabatini, 2009.

mTOR-C1 promueve la síntesis de proteína por fosforilación de 4E-BP1 (eukaryotic Initiation Factor 4E-Binding Protein 1) y S6K1 (p70 ribosomal S6 Kinase 1). La fosforilación de 4E-BP1 previene su unión a eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E), promoviendo así el inicio del proceso de traducción dependiente de cap (Richter y Sonenberg, 2005). La estimulación de la actividad de S6K1 por mTOR-C1 resulta en el incremento de la biogénesis de mRNA, traducción dependiente de cap y elongación además de la traducción de proteínas ribosomales a través de la regulación de la actividad de algunas proteínas como SKAR (S6K1 aly/REF-like target), PDCD4 (Programmed Cell Death 4), eEF2K (eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase) y la proteína ribosomal S6 (Ma y Blenis, 2009). El paso limitante de la síntesis de proteínas es el inicio de la traducción y es allí precisamente donde mTOR activado señala a varios componentes de la maquinaria traduccional de un modo coordinado a través de eventos de fosforilación directos e indirectos.

La respuesta anabólica del organismo después de la ingestión de proteína está estrechamente relacionada con la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 en ratones, ratas y humanos (Balage *et al*, 2001; Long *et al*, 2000). La activación de S6K1 inhibe la ruta de señalización de PI3K lo cual favorece la disminución de la sensibilidad a la insulina y desencadena enfermedades como diabetes. La sobreexpresión de la ruta de señalización de mTOR-C1 se encuentra frecuentemente en varios tipos de cáncer así como en hipertrofia de tejidos u órganos (Lee *et al*, 2007).

Aunque se ha usado a la rapamicina para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, la supresión de la fosforilación de S6K1 puede resultar en la activación de PI3K exacerbando el estado de enfermedad, ya que PI3K vía AKT puede activar mTOR-C1, porque inactiva los reguladores negativos de mTOR-C1 que son: TSC1/2 y PRAS40. Esto reactiva la señalización de mTOR-C1 que sobreexpresa S6K1 e inhibe PI3K y genera pérdida de sensibilidad a la insulina o lo que es lo mismo diabetes en el paciente con cáncer. Esto hace evidente que mTOR-C1 es un complejo que no esta regulado unicamente por un mecanismo.

Desde hace tiempo se sabe que la señalización de mTOR-C1 se inhibe fuertemente en cultivos celulares, bajo condiciones de carencia de nutrimentos y que la reconstitución de estos medios con aminoácidos, puede dramáticamente estimular la actividad de mTOR-C1 (Jacinto y Hall, 2003; Hay y Sonenberg, 2004).

Los aminoácidos representan una fuerte señal que regula positivamente mTOR-C1 (Guertin y Sabatini, 2007). Recientemente se demostró que la leucina, un aminoácido indispensable requerido para la activación de mTOR-C1, se transporta

dentro de las células en un modo dependiente de glutamina (Nicklin *et al.*, 2009), como se señaló anteriormente. Sin embargo, análisis *in vivo* han destacado también el papel de otros aminoácidos fuera de la célula, por ejemplo alanina (Mortimore *et al.*, 1991; Bohe *et al.*, 2003).

La activación de mTOR-C1 por aminoácidos es conocida por ser independiente de TSC1/2, debido a que la vía de mTOR permanece sensible a la falta de aminoácidos en células donde no se reprime la expresión de TSC1 o TSC2 (Nobukuni *et al.*, 2005). Algunos estudios han implicado a la proteína hVPS34 en el sensado de nutrimentos, sin embargo la influencia precisa de hVPS34 en este proceso aún falta por ser establecida, como se discutió anteriormente.

Varios estudios han sugerido que mTOR-C1 se encuentra asociado con membranas intracelulares dentro del citoplasma incluyendo el retículo endoplasmático, Golgi, endosomas y membranas mitocondriales, de igual manera la localización de Rheb en endomembranas se cree que es crítica para ejercer su función (Liu y Zheng, 2007; Buerger *et al.*, 2006). Inmersos en estas endomembranas también se encuentran transportadores de aminoácidos neutros cortos como glicina, alanina y prolina, conocidos como PATs (Proton-assisted Amino acid Transporters), los cuales han mostrado interacción con los componentes que posiblemente activen mTOR-C1 a partir de aminoácidos (Goberdhan *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2007). Los PATs se identificaron inicialmente sobre la superficie de los lisosomas en mamíferos y ahora se sabe que también se localizan en la membrana plasmática y en compartimentos endosomales, sin embargo los detalles de su función no se conocen del todo (Boll *et al.*, 2009; Rubio-Aliaga *et al.*, 2004).

En los últimos años, dos equipos independientes, han demostrado que las proteínas Rag, una familia de cuatro GTPasas pequeñas, interactúan con mTOR-C1 de forma sensible a aminoácidos y son necesarias para la activación de mTOR-C1 por aminoácidos (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). En presencia de aminoácidos, las proteínas Rag se unen a Raptor y promueven la relocalización de mTOR-C1 a través del citoplasma, de una posición discreta a una región perinuclear donde se cree que reside su activador Rheb (Sancak *et al.*, 2009) y posiblemente otros complejos traduccionales asociados a membrana (Figura 1.7). Estos primeros hallazgos generan preguntas como: ¿Cómo hacen los aminoácidos para regular la actividad GTPasa y la distribución celular de las proteínas Rag a nivel molecular? Profundizar en la caracterización de esta vía puede ayudar a esclarecer estas cuestiones.

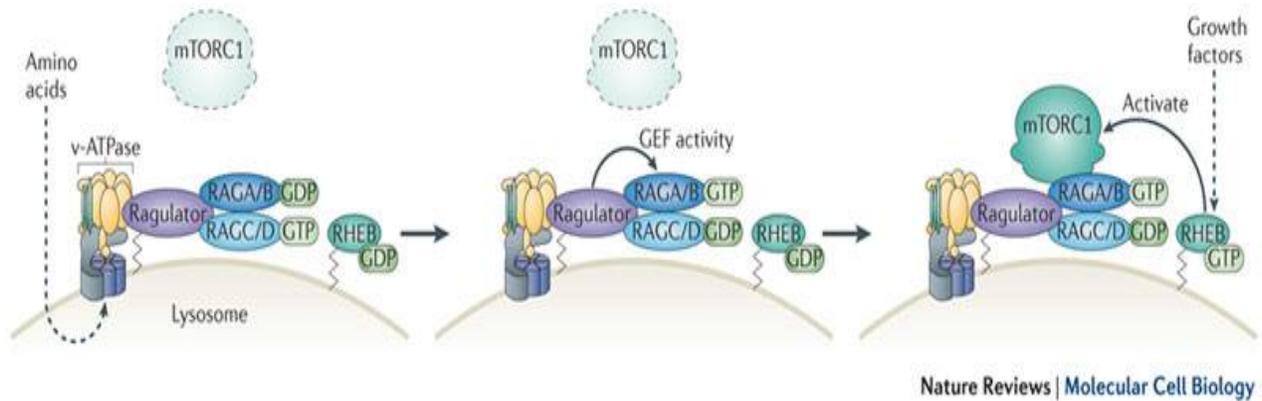


Figura 1.7. Modelo propuesto para la activación de mTOR-C1 a través de las proteínas Rag-GTPasas. Recientemente ha surgido un modelo mediante el cual se produce la activación de mTOR-C1 en el lisosoma y promueve la relocalización del complejo a través del citoplasma hacia Rheb. Fuente: Jewell et al., 2013.

En mamíferos, las proteínas Rag forman heterodímeros de RagA con RagB y RagC con RagD y parece ser que ambos heterodímeros son necesarios y suficientes para mediar la señalización de aminoácidos a mTOR-C1. Una mutante de RagB constitutivamente activa, la cual se une exclusivamente a GTP, interactúa fuertemente con mTOR-C1 y su expresión hace que la vía de mTOR resista a la caída de aminoácidos. Además, una forma dominante negativa de RagB que se une sólo a GDP previene la estimulación de mTOR-C1 por aminoácidos (Sancak *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008).

Los descubrimientos recientes en cuanto a que los aminoácidos promueven el ir y venir de mTOR-C1 hacia endosomas que contienen Rheb, vía mecanismos dependientes de Rags, han propuesto que las Rags son responsables de transmitir una señal, dependiente de aminoácidos, de un sensor en la superficie celular a estos compartimentos intracelulares. Por otro lado, la disociación física de mTOR y Rheb con la caída de aminoácidos puede explicar por qué activadores de Rheb, como son factores de crecimiento, no pueden estimular la señalización de mTOR-C1 en ausencia de aminoácidos (Goberdham *et al.*, 2009).

Si bien es claro que los aminoácidos pueden afectar la vía de señalización de mTOR-C1, el cómo estas moléculas son sensadas por mTOR-C1 sigue siendo controversial, quizás debido a que las células usan diferentes mecanismos para las diferentes condiciones ambientales a las que son expuestas. Incluso la cuestión de que si el efecto de los aminoácidos es detectado dentro de la célula o en su superficie no ha sido resuelta.

Modificaciones en la composición de aminoácidos dietarios repercuten en el metabolismo de lípidos.

Se ha observado que los mecanismos que detectan cambios en el nivel de aminoácidos indispensables de la dieta tienen efectos reguladores en el metabolismo lipídico (Morrison *et al.*, 2012).

El metabolismo lipídico está controlado, en parte por los factores de transcripción SREBPs (Horton *et al.*, 2002). Hay tres isoformas de SREBPs que están unidas a la membrana del retículo endoplasmático y a la envoltura nuclear. Estas son: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. En humanos SREBP-1a y SREBP-1c son producto de un gen común SREBF1 y SREBP-2 está codificada por el gen SREBF2 (Eberlé *et al.*, 2004).

El dominio carboxilo terminal de SREBP interacciona con el extremo carboxilo terminal de la proteína SCAP (SREBP cleavage-activating protein). Cuando hay bajas concentraciones de insulina en sangre, el complejo SCAP-SREBP1 interacciona con proteínas de la familia Insig (Insulin induced gene) y es retenido en el retículo endoplasmático pero cuando se detectan altas concentraciones de insulina en sangre este complejo migra al aparato de Golgi (Vernia-Miralles, 2007). El dominio amino terminal de las formas maduras de estos factores de transcripción se libera después de dos cortes proteolíticos, en el aparato de Golgi, por dos proteasas específicas, S1P y S2P. El amino terminal de SREBP viaja al núcleo y se une al elemento de respuesta en la región promotora de los genes para la síntesis de ácidos grasos o colesterol. SREBP-2 estimula preferentemente la transcripción de los genes para la síntesis de colesterol, mientras que SREBP-1c, más predominante que SREBP-1a en hígado y tejido adiposo de mamíferos (Felder *et al.*, 2005), estimula la transcripción de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos, como son la enzima Acetil CoA Carboxilasa (ACC) y la sintasa de los ácidos grasos (FAS). SREBP-2 se activa por un bajo contenido de colesterol en la célula y SREBP-1c por insulina (Ascencio *et al.*, 2004) (Figura 1.8).

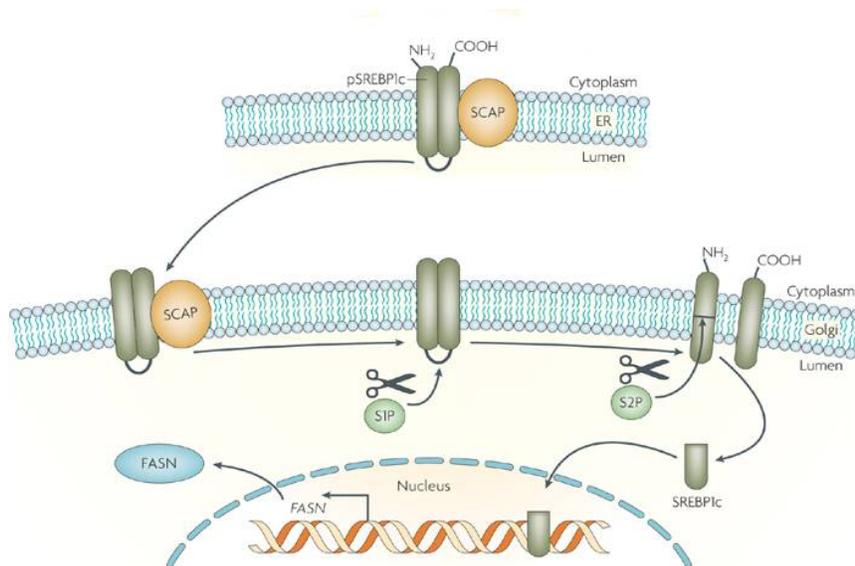


Figura 1.8. Transformación de SREBP-1c de precursor inactivo en el retículo endoplásmico a su forma madura y activa en el núcleo. Fuente: Menéndez y Lupu, 2007.

En un estudio publicado en 2004 por Tovar y colaboradores, se observó el efecto de la proteína de soya sobre el nivel de insulina sérica, en ratas alimentadas por 10 días con dietas cuya fuente de proteína fue soya o caseína. Las ratas alimentadas con proteína de soya tuvieron concentraciones de insulina sérica significativamente más bajas que las ratas alimentadas con caseína y esta respuesta estuvo acompañada por una disminución en la expresión de SREBP-1c, que fue 53% menor en ratas alimentadas con soya en comparación a las ratas alimentadas con caseína. El incremento de la expresión de SREBP-1c ocurrió 30 minutos después del consumo de caseína, principalmente, y se mantuvo de manera sostenida por las siguientes 2 horas (Figura 1.9).

Posteriormente, este mismo grupo probó el efecto del consumo de proteína de soya a largo plazo (130 días), encontrando que el consumo de esta proteína mantiene niveles normales de insulina sérica, en comparación con las ratas que consumieron caseína, las cuales resultaron hiperinsulinémicas. Las ratas alimentadas con proteína de soya tuvieron significativamente niveles menores de expresión para SREBP-1c y de su gen blanco, la enzima FAS, en comparación con las ratas alimentadas con caseína (Ascencio *et al.*, 2004).

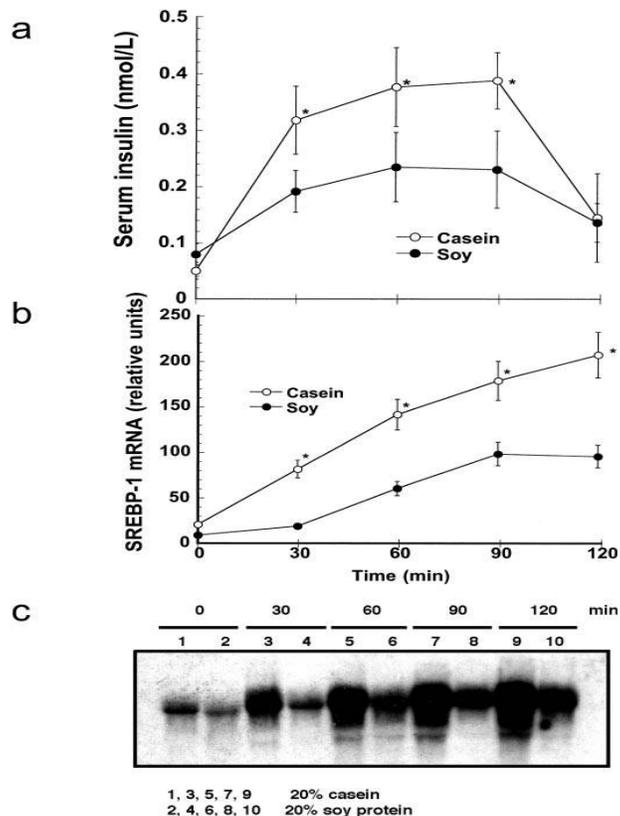


Figura 1.9. Concentración de insulina sérica (a), abundancia relativa mRNA (b) y expresión hepática de SREBP-1c (c) en ratas alimentadas con caseína o proteína de soja a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de que iniciaron el consumo de alimento. Los valores son medias \pm SEM, $n=5$, $P < 0.05$. Fuente: Ascencio et al., 2004.

Otros estudios han reportado que la producción de insulina en células β -pancreáticas se incrementa por la estimulación *in vitro* con aminoácidos de cadena ramificada principalmente (May y Buse, 1989).

Las proteínas en la dieta promueven la liberación de insulina o la liberación de glucagon. En general, las proteínas de origen animal generan mayor liberación de insulina y las proteínas de origen vegetal promueven mayor secreción de glucagon. Los islotes pancreáticos, responsables de la secreción de estas hormonas no identifican el tipo de proteína, sino que detectan el incremento de aminoácidos en la circulación sanguínea de manera posprandial. Se ha reportado que a largo plazo, el consumo de proteína de soja incrementa la liberación de glucagon, mientras que los niveles de insulina se mantienen en rangos normales lo que genera una baja relación insulina/glucagon en comparación con animales alimentados con dietas a

base de caseína. La baja relación de insulina/glucagon es detectada por SREBP-1c produciendo así un estímulo bajo de lipogénesis (Torres y Tovar, 2007). Los resultados en este estudio muestran que la regulación de la insulina sérica y la expresión de SREBP-1c dependen del tipo de proteína consumida. La relación insulina/glucagon fue más alta en ratas alimentadas con caseína que en ratas alimentadas con soya, lo que indica que probablemente el patrón de aminoácidos de cada proteína puede estimular de manera diferente la secreción de insulina pancreática activando su vía de señalización.

En otro estudio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington se observaron efectos transcripcionales de la restricción de aminoácidos indispensables sobre genes lipogénicos, estos efectos fueron identificados en células humanas HepG2 las cuales se incubaron en medios que carecían de un solo aminoácido y se observó que las células rápidamente disminuyeron el inicio de la transcripción y la expresión de FAS. Se reportó que FAS está particularmente reducida en células deprivadas de cisteína y glutamato, pero este efecto no se observa con la ausencia de algún otro aminoácido no indispensable (Dudek y Semenkovich, 1995).

C. Proteína dietaria

Las fuentes de proteína en la dieta de los organismos superiores, incluyendo al humano, son de origen animal o vegetal. Generalmente las proteínas de origen vegetal tienen mayor cantidad de aminoácidos dispensables como: arginina, glicina y alanina, mientras que las proteínas de origen animal tienen mayor cantidad de aminoácidos indispensables: cisteína, metionina, isoleucina, leucina, treonina, triptófano, tirosina, fenilalanina, valina, en algunos casos histidina y sobre todo lisina. Se ha demostrado en animales de experimentación, que los cambios metabólicos que genera el consumo de una proteína animal son diferentes a los observados cuando se alimentan animales con ciertas proteínas de origen vegetal (Kritchevsky, 1976). En general las proteínas de origen vegetal son ricas en arginina y deficientes en lisina. Cuanto más elevada sea la relación lisina:arginina (≥ 2), es decir cuanta más cantidad de lisina sea aportada por las proteínas dietarias, como en el caso de las proteínas de origen animal, más aumentará el riesgo de desarrollar hipercolesterolemia y aterosclerosis ya que si la relación entre estos dos aminoácidos es baja, se correlaciona con altas concentraciones de glucagon en suero. El efecto benéfico de la arginina se debe a que este aminoácido es precursor de óxido nítrico, un vasodilatador endógeno (Torres y Tovar, 2007).

Uno de los problemas más grandes a los que se enfrenta gran parte de la humanidad es la insuficiente disponibilidad de proteínas de buena calidad. Esta situación ha hecho volver la vista hacia otras fuentes de proteínas que se han usado poco en la alimentación humana. Se han estudiado muchos recursos y los que parecen tener mayores posibilidades son las harinas de las semillas oleaginosas, como las de soya, cacahuete o algodón; el concentrado proteínico de pescado y las llamadas "proteínas unicelulares" que son aquellas que provienen de algas microscópicas, de bacterias, hongos o levaduras. De este tipo de proteínas las que parecen tener buen futuro son aquellas que provienen de algas por su alto contenido de proteína, buena digestibilidad y ausencia de toxicidad. Además es importante que su cultivo no presente grandes problemas y tenga buen rendimiento. La espirulina es una cianobacteria que hace ya algunos años se consume ampliamente debido a que algunos países como Francia y Chile han profundizado en el análisis de sus propiedades nutrimentales y han señalado el importante aporte de proteína respecto a su calidad y cantidad lo cual ha motivado su producción industrial como fuente de proteína rentable.

Espirulina

Morfología, taxonomía y hábitat

La espirulina es una microalga verdeazulada (cianobacteria), con forma helicoidal y filamentos septados, es un microorganismo unicelular 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, que tiene una pared celular con heteropolímeros sensibles a lisozima y otros sistemas enzimáticos simples (Abo-Shady *et al*, 1992).

Su posición sistemática como cianobacteria ha sido materia de discusión ya que este organismo fue primero considerado como alga. Stanier y Van Neil, en los años 60's, incorporaron "alga verdeazulada" dentro del reino de los procariotas y propusieron llamar a este microorganismo cianobacteria (Guglielmi *et al*, 1993). Este microorganismo se clasifica en 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 *Spirulina* indistintamente (Tomaselli, 1996).

La espirulina crece de forma natural y es fácilmente cultivable en lagos alcalinos donde es difícil o imposible que otros organismos sobrevivan. En lagos naturales la disponibilidad de nutrimentos regula sus ciclos de crecimiento, los cuales se favorecen en regiones tropicales (Sasson, 1997). El productor más importante en América Latina de espirulina es la compañía "Solarium, Grupo de Biotecnología destinado al Desarrollo del Desierto". La espirulina de Solarium se cultiva en grandes reactores semejantes a piscinas rectangulares de gran superficie y poca profundidad, que se llenan con un medio de cultivo específico, preparado con agua y sales minerales seleccionadas. Los nitratos y los carbonos naturales son fundamentales para el medio de cultivo alcalino en el que se desarrolla la espirulina (pH entre 9 y 10). El líquido dentro de los reactores se mantiene en movimiento permanente mediante un sistema de agitación que permite la uniformidad del cultivo.

La sopa verde oscura en que se transforma el cultivo, pasa a una sala especial de cosecha a través de tuberías subterráneas. Allí se le separa del medio de cultivo, y la crema verde que se obtiene, después de varios procesos, se reduce a un polvo de color verde oscuro muy fino.

Composición química

Esta cianobacteria que se cultiva y se comercializa en diferentes países tiene un contenido significativamente alto de macro y micronutrientes.

Proteínas: Su contenido de proteína (59-65%) (Tabla 1.1), es más alto que en otros alimentos de origen vegetal por ejemplo: la soya (35%), el cacahuete (25%) o algunos granos en general (8-10%). Una característica especial de la espirulina es la facilidad de su digestión debido a la ausencia de celulosa en su pared celular. Se ha determinado experimentalmente la digestibilidad de esta proteína en roedores a través del valor de NPU (Net Protein Utilization), el cual se refiere al porcentaje de nitrógeno retenido, cuando la fuente de proteína en estudio es el único factor nutrimental limitante y se observó que después de 18 horas de consumo más del 85% de su proteína se digiere y asimila (Sasson, 1997).

Tabla 1.1. Resultado de algunos análisis proximales de *Espirulina (Arthrospira maxima)* en diferentes países.

Componente (% materia seca)	FOI, Francia	SAC, Tailandia	IPGRS, Malasia	BAU, Bangladesh
Proteína cruda	65	55-70	61	60
Carbohidratos solubles	19		14	
Lípidos	4	5-7	6	7
Fibra cruda	3	5-7		
Cenizas	3	3-6	9	11
Humedad		4-6	6	9
Extracto Libre de Nitrógeno		15-20	4	17

FOI=French Oil Institute; SAC=Siam Algae Co. Ltd; IPGRS=Institute of Post-graduate Studies and Research Laboratory; BAU=Bangladesh Agricultural University.

La proteína de *Espirulina* tiene una composición balanceada de aminoácidos. En ella están presentes todos los aminoácidos indispensables formando un 47% de la proteína total aunque con cantidades reducidas de metionina, cisteína y lisina (Tabla 1.2) debido al secado por calor que comúnmente se aplica en su procesamiento.

En 1971 se publicó un estudio en México sobre el valor nutrimental de la *espirulina* procedente de la compañía Sosa-Textcoco, es este estudio se concluye que la *espirulina* es una buena fuente de proteína por su contenido alto y por su balanceada composición de aminoácidos indispensables (Mendoza *et al.*, 1971).

Tabla 1.2. Composición de aminoácidos de espirulina (*Arthrospira maxima*).

Aminoácido (g/100g)	FAO Proteína estándar	Solarium Biotech. Chile	IPGRS, Malasia	Sosa Texcoco México	SAC, Tailandia
Lisina	5.5	4.5	4.63±0.07	3.58	2.60-3.30
Fenilalanina	6.0	5.4	4.10±0.08	5.16	2.60-3.30
Tirosina			3.42±0.10		2.60-3.30
Leucina	7.0	10.4	8.37±0.13	6.82	5.90-6.50
Metionina	5.5	2.2	2.75±0.05	2.06	1.30-2.00
Ácido glutámico			7.04±0.14		7.30-9.50
Ácido aspártico			5.37±0.11		5.20-6.00
Triptófano	1.0	1.5	1.98±0.05	1.13	1.00-1.60
Cisteína			0.6±0.03		0.50-0.70
Serina			3.84±0.06		
Arginina			4.94±0.07		
Histidina			2.81±0.06		
Treonina	4.0	5.4	3.35±0.06	4.95	
Prolina			4.11±0.05		
Valina	5.0	7.5	4.02±0.06	5.09	7.5
Isoleucina	4.0	6.4	3.85±0.10	5.42	6.8
Alanina			10.81±0.14		
Glicina			6.66±0.10		

FAO=Food and Agriculture Organization; IPGRS=Institute of Post-graduate Studies and Research Laboratory; SAC=Siam Algae Co. Ltd. Modificado por Cohen, 1997; Sasson, 1997; Sánchez *et al*, 2003.

En otro estudio procedente de Francia se indica que el perfil de aminoácidos presente en la proteína de la espirulina es de un valor biológico muy alto (Falquet, 2008). La calidad de su proteína se ha comparado con estándares como carne, huevo o leche (Habib *et al*, 2008).

Otro parámetro de importancia es el PER (Protein Efficiency Ratio) que relaciona el peso ganado por un individuo dividido entre el peso de proteína ingerida. El valor de PER de espirulina determinado para ratas en crecimiento está estimado entre 1.8 y 2.6 contra un valor de PER para caseína de 2.5. Estos datos indican un uso metabólico eficiente de los aminoácidos de espirulina, lo cual se confirmó por los niveles de aminoácidos libres encontrados en sangre y músculo en pruebas con animales (Voltarelli *et al*, 2008).

Carbohidratos: los azúcares presentes en la espirulina son azúcares simples principalmente glucosa, ramnosa, ribosa y galactosa y en muy pequeñas cantidades se encuentran glicerol y D-glucosamina.

Lípidos: Algunas investigaciones señalan que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) pueden representar del 25-60% del total de ácidos grasos de la espirulina (Borowitzka, 1994; Li y Qi, 1997), principalmente contiene ácido γ -linolénico (30-

35% del total de lípidos), un ácido graso raramente disponible en la dieta, otros ácidos grasos predominantes son ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico.

Minerales: Todos los minerales esenciales están disponibles en la espirulina con cantidades alrededor del 7% del peso total de espirulina seca, es una fuente de potasio, calcio, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio, sodio y zinc. La espirulina tiene la propiedad de quelatar minerales tóxicos, una característica que no se ha demostrado en otras microalgas (Okamura y Aoyama, 1994). En la Universidad de Beijing se han extraído de esta alga algunas moléculas bioactivas que pueden neutralizar los efectos tóxicos de algunos metales mostrando actividad antitumoral (Li y Qi, 1997).

Vitaminas: el contenido de vitaminas en 100 g de espirulina seca es: 2.38 mg de vitamina B₁ (Tiamina), 3.67 mg de vitamina B₂ (Riboflavina), 0.014 mg de vitamina B₃ (Nicotinamida), 0.364 mg de vitamina B₆ (Piridoxina), 10.1 mg de vitamina C, 29 µg de vitamina A y 5 mg de vitamina E.

Pigmentos fotosintéticos: Su principal pigmento es la ficocianina que le otorga color azul. También contiene clorofila A, xantofilas, betacarotenos, zeaxantina entre otros.

En condiciones naturales la composición química varía de acuerdo a la salinidad del medio. Vonshak y colaboradores, en 1996, reportaron que en condiciones de alta salinidad se reduce el contenido de proteína y clorofila e incrementa el contenido de carbohidratos.

Estudios toxicológicos

Estudios a corto, mediano y largo plazo en animales de laboratorio han demostrado que la espirulina es inocua lo que representa una ventaja en relación con otras algas (Chamorro, 1996). Algunas especies de algas verdeazules son conocidas por la producción de toxinas como microcistinas, en particular MCYST-LR causante de alteraciones gastrointestinales, reacciones alérgicas e irritación. Algunas especies destinadas para consumo humano pueden contaminarse con otras cianobacterias y esto es particularmente importante en países donde no existe regulación de este tipo de productos. Aunque no ha sido concluyente la presencia o ausencia de microcistinas en espirulina las autoridades de salud pública en EEUU y Canadá vigilan su consumo. Un estudio canadiense encontró que no fueron detectadas

microcistinas en espirulina (Health Canada, 1999), mientras que otro estudio dirigido por el Departamento de Agricultura de Oregón (ODA) publicado en 2000, encontró MCYST-LR en 15 muestras de espirulina (Gilroy *et al*, 2000). Sin embargo, los niveles de MCYST-LR contenidos en las muestras de espirulina estuvieron por debajo de los niveles establecidos por la ODA (1µg/g).

El contenido de ácidos nucleicos (DNA y RNA) es relevante desde el punto de vista nutricional porque los productos de la degradación bioquímica de sus componentes (purinas: adenina y guanina) producen acumulación de ácido úrico. Un aumento de ácido úrico en plasma puede producir litosis y gota a largo plazo. Generalmente se considera que un consumo máximo aceptable a largo plazo de ácidos nucleicos es alrededor de 4 g/d para un adulto. Además se debe considerar que el RNA produce tres veces más acumulación de ácido úrico que el DNA. Entre los organismos en los que se ha reportado una cantidad considerablemente alta de ácidos nucleicos sobre materia seca se encuentran las levaduras con 23%, otras algas como chlorella 10% y otros alimentos como hígado de res con 7% (Ciferri y Tiboni, 1983).

El nivel de ácidos nucleicos totales en *Spirulina maxima* que se ha reportado es de 4.2–6% en materia seca. El límite diario de 4 g representa el contenido de ácidos nucleicos en 80 g de espirulina seca. Esta cantidad está ocho veces por arriba de la cantidad de espirulina que se usa como suplemento alimenticio (Santillan, 2004).

Algunos estudios han revelado que la espirulina cosechada en ambientes naturales puede contener niveles relativamente altos de arsénico, mercurio y plomo, aunque esto es el resultado de ambientes geológicamente contaminados aún no se sabe con certeza qué factores contribuyen a la acumulación de estos contaminantes. En experimentos con ratas alimentadas con espirulina natural de orígenes diferentes incluyendo espirulina de origen mexicano, como única fuente de proteína, se mostró la ausencia de efectos tóxicos por estos minerales (Falquet, 2008).

El 3,4-benzopireno se ha determinado en espirulina porque sirve como indicador de la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos contaminantes, los cuales son poderosos mutagénicos y carcinogénicos. Las cantidades observadas (2–3 ppm) están muy por debajo de los encontrados en algunos vegetales y no representan riesgo en su consumo (Chamorro, 1996).

Se reconoce a la espirulina como GRAS (Generally Recognized As Safe) para su uso como ingrediente en alimentos de consumo humano en niveles de 0.5 a 3.0 g por porción (FDA, 2003).

Uso ancestral y redescubrimiento

La espirulina ha sido usada como alimento desde hace cientos de años por diferentes poblaciones y actualmente se sigue cultivando con propósitos de generar un ingrediente para alimentación. Desde 1967 la espirulina fue nombrada como “Alimento del futuro” por la Asociación Internacional de Microbiología Aplicada.

De acuerdo con la crónica de Francisco Hernández, en cierta época del año, los aztecas colectaban con redes una especie de lodo muy fino de color azul que proliferaba sobre el agua, al cual le daban el nombre de “Tecuitlatl”, nombre náhuatl que significa: excremento de piedra, y sobre la arena de las cercanías lo ponían a secar al sol, una vez seco le daban forma de tortas pequeñas y lo ponían sobre hierbas frescas. El tecuitlatl tiene un sabor a queso y cierto olor a cieno. Los aztecas lo comían en cantidades pequeñas con tortillas y también lo utilizaban para condimentar el maíz en lugar de sal. A causa del contenido cuantitativamente importante de proteína, el Tecuitlatl jugó un papel decisivo para asegurar una alimentación suficiente y equilibrada en la nación azteca. El Tecuitlatl fue nombrado por los naturalistas hasta finales del siglo XVI y probablemente el desarrollo urbano y la agricultura provocaron la pérdida de este cultivo en los lagos mexicanos (Paniagua-Michel *et al*, 2004).

En 1967 cuando en los tanques de evaporación de la Industria Sosa-Textcoco S.A. se observó que esta cianobacteria crecía en grandes cantidades, el Instituto Francés del Petróleo llevó a cabo experimentos encaminados al aprovechamiento industrial del Tecuitlatl, el cual se identificó como *Spirulina maxima*. Se instaló una planta de procesamiento a las orillas del Caracol del Lago de Texcoco, con una producción cercana a las 500 toneladas de espirulina seca al año; desafortunadamente, la empresa Sosa-Textcoco cerró sus puertas y la producción fue abandonada (Sasson, 1997).

En África también se usa como alimento para consumo humano en comunidades que habitan cerca de lagos alcalinos, como en la región de Karem junto al lago de Chad, en la cual se han reportado niveles cada vez más bajos de desnutrición infantil gracias al consumo de “dihé” como ellos nombran a este cultivo. El dihé es mezclado con salsa de tomates, arroz o trigo y es la base de su alimentación (Simpore *et al*, 2006).

Hoy en día existen esfuerzos de diversos gobiernos nacionales y organizaciones intergubernamentales para reevaluar el potencial de la espirulina con ayuda de guías claras en el aspecto de seguridad alimentaria y riesgos a la salud por su consumo y como una alternativa a la crisis de alimentos nutritivos en comunidades donde la alimentación es escasa e inadecuada. El Programa Institucional Intergubernamental de Espirulina (CISRI-ISP) trabaja en promover su uso contra la malnutrición severa. El CISRI-ISP está vinculado con la FAO, la OMS y el WFP (World Food Programme) y también mantiene comunicación con las entidades líderes en la producción de Espirulina alrededor del mundo entre las que destacan: Antenna-Technologies (Suiza), Earthrise Farms (Estados Unidos), Chinese Farms (China), Solarium Biotechnology (Chile) y Centre for Science for Villages (India).

En el transcurso de los últimos años, los cultivos experimentales e intensivos con técnicas de biotecnología moderna han permitido obtener un producto de alta calidad con hasta un 70% en peso de proteína, convirtiéndose en un recurso importante para contribuir a mejorar la calidad de vida de los países más pobres con problemas de desnutrición proteínica (Habib *et al.*, 2008).

El principal uso de la espirulina es como suplemento alimenticio, se adiciona a pastas, bebidas instantáneas, granolas, dulces, huevo en polvo así como a alimentos fermentados por ejemplo yogurt, quesos, tofu entre otros (Vonshak, 1990). Sin embargo, en los últimos años se le han atribuido diversas propiedades farmacológicas. Así se ha comprobado a nivel experimental su efectividad en algunos tipos de alergias, anemia, cáncer, hepatotoxicidad, enfermedades virales y cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipidemia, inmunodeficiencia y procesos inflamatorios, entre otros (Chamorro *et al.*, 2002).

La actividad hipolipidémica de la espirulina ha sido estudiada principalmente en rata, Torres-Durán y colaboradores reportaron que el alga, exenta de grasa, proporcionada a ratas durante cinco días a concentraciones del 5% en la dieta produjo decremento en los lípidos hepáticos totales y triglicéridos séricos. Además no se observó aumento en el colesterol hepático, provocado por la inducción con tetracloruro de carbono (Torres-Durán *et al.*, 1998). De un estudio de suplementación con espirulina sobre el nivel de glucosa, hemoglobina glucosilada y el perfil lipídico en la sangre de pacientes diabéticos se concluye que la espirulina tiene efectos hipoglicémicos e hipocolesterolémicos los cuales favorecen el control de glucosa sanguínea y ayuda a prevenir las complicaciones de la diabetes (Anhita y Chandralekha, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Por mucho tiempo se ha pensado que la espirulina contiene proteína de buena calidad ya que se ha reportado que su contenido de aminoácidos es alto y balanceado comparado con proteínas de origen vegetal. Sin embargo hace falta profundizar el estudio de este tipo de proteínas a nivel celular ya que es de suma importancia conocer cuál es la respuesta de la célula ante diferentes perfiles de aminoácidos y así aportar datos que permitan dilucidar un posible sensor de aminoácidos.

En esta investigación se analizan tres mecanismos por los cuales la célula puede regular la respuesta a los aminoácidos presentes en la dieta y son: a nivel de membrana el transportador SNAT2, como eje central del metabolismo de proteínas, el complejo 1 mTOR y el factor de transcripción SREBP-1c como consecuencia de la secreción de insulina y glucagon derivada de la proteína en la dieta. El efecto que pueda tener el perfil de aminoácidos de la dieta sobre estas vías de señalización ayudara a profundizar el conocimiento de la respuesta celular ante condiciones que comprometen su desarrollo óptimo. La importancia de entender la señalización que generan los aminoácidos en la célula tiene implicaciones fisiológicas y patológicas.

Por otro lado se requiere conocer a profundidad el efecto de las proteínas vegetales en la salud e incentivar el consumo de estos alimentos que han perdido terreno en los patrones de alimentación actuales y que sin lugar a duda ofrecen una alternativa nutricional. En el caso específico de la espirulina parece importante revalorar este cultivo ancestral mexicano.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Conocer el efecto del consumo de espirulina sobre la expresión génica del sistema de transporte de aminoácidos SNAT2, el complejo-1 mTOR y el factor de transcripción SREBP-1c en hígado de rata.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar el patrón de aminoácidos de la espirulina.

- ✓ Determinar el efecto del consumo de espirulina en ratas Sprague Dawley sobre:
 - Ganancia de peso y consumo de alimento.

 - Análisis histomorfológico de tejido hepático.

 - Concentraciones de glucosa, insulina, glucagon, colesterol y triglicéridos en suero.

 - Concentración de homocisteína en suero.

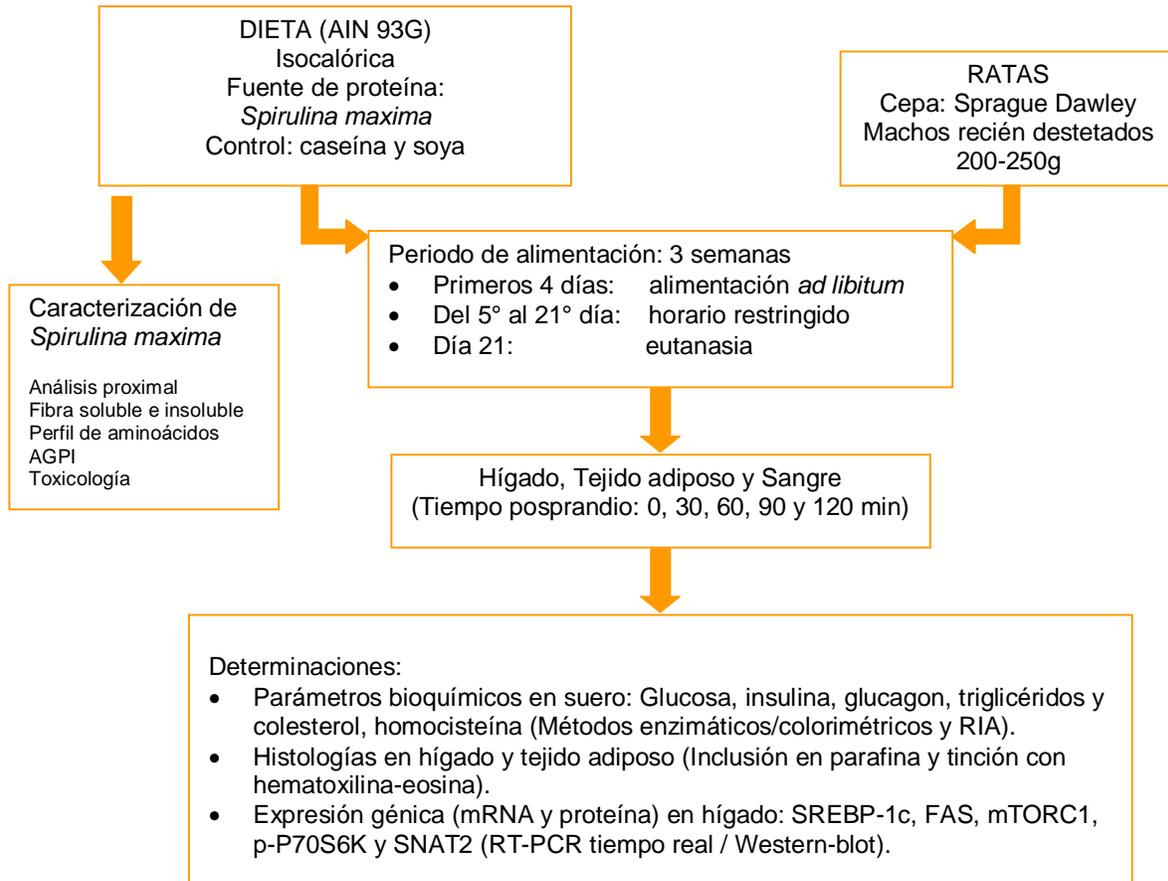
 - La expresión génica (mRNA y proteína) en hígado de SREBP-1c, FAS, SNAT2 y así como el mRNA mTOR-C1 y la fosforilación de la proteína P70S6K como indicador de la activación de mTOR-C1.

4. HIPÓTESIS

Una dieta con espirulina disminuirá la expresión de SREBP-1c, debido a que su baja relación lisina:arginina favorecerá la secreción de glucagon por encima de la secreción de insulina, mostrando efectos similares a los de la proteína de soya. La expresión de SNAT2 aumentará mientras transporta sus sustratos y disminuirá una vez que haya suficiencia de aminoácidos y por el contrario es posible que esta dieta aumente la expresión de mTOR-C1 favoreciendo procesos de traducción, ya que se ha reportado un perfil de aminoácidos muy completo para la espirulina comparable con proteínas como la caseína.

5. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un diagrama general de la estrategia propuesta para el desarrollo del experimento:



Formulación de la dieta

Las tres fuentes de proteína para cada una de las dietas son:

- Espirulina (*Arthrospira maxima*) marca AEH-Solarium Biotechnology, lote SDW-9714.
- Caseína marca Harlan Teklad "Vitamin Free" Test Catalog No. 160040, Batch No. 892475.
- Soya marca Protein Technologies International SUPRO® 710 Proteína Aislada de Soya.

Se determinó el análisis químico proximal (Método AOAC Químico Proximal, 1990) para la muestra de espirulina por el Laboratorio Certificado de Análisis Químico para Alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y se hizo un ajuste respecto a la fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble (Método AOAC cap. 32 (991.43)17th Ed. 2002) presente en la espirulina por Laboratorios Silliker de México, debido a que en ensayos previos se observó distensión abdominal en las ratas por exceso en el consumo de fibra.

Tabla 5.1. Análisis químico proximal de espirulina de Solarium Biotechnology.

Componente	Espirulina Solarium B. (%)
Materia seca	93.42
Humedad	6.58
Proteína cruda	46.67
Extracto etéreo	6.89
Cenizas	3.08
Fibra dietética insoluble	3.48
Fibra dietética soluble	0.64
Extracto libre de nitrógeno	32.66

Se cuantificó la proteína por el Método de Kjeldhal (AOAC 1990, 976.05) y se usó el valor de 6.25 como el factor de conversión en este método. Para la determinación de humedad (Método AOAC 1991, 934.01) se colocaron las muestras húmedas previamente pesadas en una estufa a 60°C hasta llegar a peso constante. Se realizó la determinación de extracto etéreo por el método de Soxhlet (AOAC 1990, 920.39) y la cantidad de cenizas (Método AOAC 1990, 942.05) se obtuvo por diferencia de pesos después de calcinar la muestra en una mufla. Finalmente, por diferencia se calcula el extracto libre de nitrógeno.

El análisis químico proximal de la caseína y el aislado de soya fueron proporcionados por el proveedor y las especificaciones completas se muestran en el ANEXO I.

Tabla 5.2. Análisis químico proximal de caseína de Harlan y aislado de soya de Protein Technologies International.

Componente	Caseína Harlan (%)	Aislado de Soya PTI SUPRO (%)
Materia seca	93.7	94.5
Humedad	6.3	5.5
Proteína cruda	90.6	90.0
Extracto etéreo	0.1	0.5
Cenizas	1.9	4.5
Fibra dietética	0	0
Extracto libre de nitrógeno	0.06	0

PTI: Protein Technologies International.

Se administraron dietas purificadas en polvo, los ajustes para la formulación de estas dietas parten de la revisión publicada por el Instituto Americano de Nutrición de dietas para roedores de laboratorio en etapa de crecimiento (AIN-93G, Reeves *et al.*, 1993) (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Formulación de dietas con espirulina, caseína y soya como fuentes de proteína.

Componente	Dieta AIN 93G (g/100g)	Espirulina 46.67% proteína Aporte en 42.85 g (g/100g)	Ajuste para Espirulina (g/100g)	Ajuste para Caseína (g/100g)	Ajuste para Soya (g/100g)
Proteína	20	20	-	22.08 (20)*	22.2 (20)*
Almidón	39.75	4.66	35.09	39.75	39.75
Maltodextrina	13.2	4.66	8.61	12.16	13.2
Sacarosa	10	4.66	5.29	8.96	10
Aceite de soya	7	2.95	4.05	7	6.8
Fibra	5	1.77	3.23	5	5
Mezcla de minerales	3.5	<0.05	3.5	3.5	3.5
Mezcla de vitaminas	1	<0.05	1	1	1
L-cistina	0.3	-	-	-	-
Citrato de colina	0.25	-	0.25	0.25	0.25
Ter-butilhidroquinona	0.0014	-	0.0014	0.0014	0.0014

* La cantidad de proteína agregada a cada dieta depende de su pureza y se ajustó a 20% en todas las dietas. AIN: American Institute of Nutrition.

En los correspondientes análisis proximales no se especifican los hidratos de carbono presentes en las muestras (espirulina, caseína o soya), por lo que el ajuste de hidratos de carbono, según el Instituto Americano de Nutrición, se hizo proporcional entre las tres fuentes necesarias: almidón, maltodextrina (Harlan #cat: 160175) y sacarosa, es decir, la cantidad de extracto libre de nitrógeno presente en cada muestra se dividió entre tres y este valor se restó de cada uno de los requerimientos de hidratos de carbono señalados en la dieta establecida por la AIN-93G. Para el ajuste de lípidos se restó el valor de extracto etéreo, del análisis proximal correspondiente, de la cantidad de lípidos señalada como aceite de soya por la dieta AIN-93G. Para ajustar los minerales en la dieta se tomó en cuenta el valor dado en cenizas de cada análisis proximal y al no estar especificado en todos los casos y ser un contenido que representa menos del 1% del contenido de minerales necesarios en la dieta, se agregó el total (3.5 g / 100 g) de Mezcla de Minerales (Harlan #cat: TD 94046) en todas las dietas y lo mismo ocurrió con la Mezcla de Vitaminas (Harlan #cat: TD 94047), se agregó el 100% de lo recomendado por la dieta AIN-93G considerando también que se trató de un estudio a corto plazo en animales sanos.

La dieta y todos los componentes de la dieta cumplieron con las especificaciones de proveedores y condiciones de manipulación y almacenamiento señaladas por el Instituto Americano de Nutrición (AIN-93G, Reeves *et al.*, 1993).

Para los fines de este estudio fue necesario conocer el perfil de aminoácidos presentes (aminograma) en las fuentes de proteína que se usaron en cada dieta. Para esto se solicitó este análisis a los Laboratorios Silliker de México. Se obtuvieron los aminogramas (Método PNTQ 1339, HPLC) para espirulina, caseína y el aislado de proteína de soya y los resultados se presentan en la sección de Resultados del presente trabajo.

Se realizaron otros análisis en la muestra de espirulina de Solarium para verificar algunos componentes que pudieran interferir con los resultados o que causaran efectos dañinos en los animales de laboratorio, estos análisis fueron: Determinación de ácidos grasos, arsénico, plomo y mercurio.

Se determinó el perfil de ácidos grasos en espirulina en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se realizó la extracción de lípidos totales por el método de Folch (Método AOAC 2002, 341.08), se usó la mezcla de disolventes

(1:1) de cloroformo:etanol y se agitó por dos horas a 170 rpm, después se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a sequedad los solventes con atmósfera de nitrógeno en baño metabólico a 60°C (Marca BUCHI, modelo B-481). Posteriormente se llevó a cabo la saponificación y esterificación de lípidos (Método AOAC 1998, 969.33) con metilato sódico al 2% para generar la liberación de ácidos grasos del ion glicerato, los ácidos grasos se separaron con heptano grado HPLC formando una fase orgánica que se evaporó a sequedad en baño metabólico a 60°C en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se resuspendieron estos ésteres en hexano grado HPLC y se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención en un Cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6850 Series II Network GC System, columna HP-Innowax al 5% de polaridad). Se usó un estándar interno de ácido miristoleico como control.

Los ácidos grasos presentes en la grasa de esta muestra de espirulina son los que se muestran en la tabla 5.4 y se comparan con los que se encuentran en el aceite de soya.

Tabla 5.4. Contenido de ácidos grasos presentes en la muestra de espirulina de *Solarium* y en el aceite de soya adicionado a la dieta AIN-93G.

Ácidos grasos		Aceite de soya (g/100g aceite)	Espirulina (g/100g grasa)
C14:0	mirístico	0.12	0.15
C14:1	miristoleico	0.10	ND
C16:0	palmitico	10.61	26.58
C16:1	palmitoléico	0.08	1.85
C18:0	esteárico	3.90	0.61
C18:1n9c	oleico	20.06	1.74
C18:2n6c	linoleico	56.80	13.58
C20:0	araquídico	0.24	ND
C18:3n6	γ-linolénico	0.54	0.04
C18:3n3	linolénico	6.93	1.02
C20:5n6	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	0.01	0.32
C22:1n9	erúxico	0.10	ND
C20:4n6	araquidónico	0.02	ND
C24:0	lignocérico	0.06	ND
C22:6n3	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	0.15	ND
Suma de ácidos saturados		15.19	54.68
Suma de ácidos monoinsaturados		27.29	7.18
Suma de ácidos poliinsaturados		57.52	29.08

ND= no detectado

Se determinó en la muestra de espirulina la cantidad de arsénico (Método de generación de hidruros/Espectrofotometría de absorción atómica, MTA/MA-035/A96) en el Laboratorio Certificado de Análisis Químico para Alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Una dilución de la muestra se hizo pasar a través de un filtro de celulosa y después se hizo una digestión del filtro con una mezcla de ácidos, se tomó una alícuota y se hizo reaccionar con ácido sulfúrico diluido, ácido clorhídrico concentrado y solución de yoduro de potasio para liberar arsenamina que es conducida por un gas inerte hasta la celda de medida del espectrofotómetro. Las medidas de absorción producidas por la presencia de arsénico en la celda se detectaron a 197.2 nm y la cuantificación se efectuó por interpolación en una curva de calibración.

También se determinó la presencia de plomo y mercurio (NOM-117-SSA1-1994) a través de la técnica de espectrometría de absorción atómica en el Laboratorio Certificado de Análisis Químico para Alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porcentaje de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento. La cuantificación de plomo se hizo con una longitud de onda de 520 nm y la concentración de mercurio se observó con una longitud de onda de 253.6 nm.

El contenido de arsénico, plomo y mercurio presente en espirulina de Solarium se compara con el Límite Superior de Consumo establecido por la FAO, USDA (United States Department of Agriculture) y FDA (Food and Drug Administration) para estos minerales respectivamente (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Elementos tóxicos presentes en Espirulina.

Contaminante	Espirulina Solarium	Límite Superior de Consumo
Arsénico (ppm)	0.921	2 (FAO, 1992)
Plomo (µg/g)	24	100 (USDA, 2009)
Mercurio (mg/g)	0.00032	0.001 (FDA, 2004)

FAO: Food and Agriculture Organization, USDA: United States Department of Agriculture, FDA: Food and Drug Administration.

Modelo biológico

Se utilizaron 75 ratas Sprague Dawley, machos, con peso entre 200 y 250 g recién destetados, se eligió esta cepa porque son ratas sanas, dóciles y en periodo de crecimiento que es cuando se pueden observar más claramente los efectos de la alimentación. Estas ratas fueron obtenidas de la compañía Harlan-UNAM con certificado de salud y seguridad aprobado para laboratorio experimental de especies animales (ANEXO II).

En el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran cada rata fue alojada en jaulas individuales a 22°C con un ciclo de 12h de luz-oscuridad y con libre acceso a agua. Se utilizaron 25 ratas por dieta, las dietas variaron según la fuente de proteína que contenían: espirulina, caseína o soya como se detalló anteriormente. Para recuperar y homogeneizar el peso de las ratas al inicio del experimento los primeros cuatro días su alimentación fue *ab libitum*, en comederos de acero. Después de este periodo las ratas fueron condicionadas a consumir la dieta experimental durante un periodo restringido de 5.5 horas (9:00–14:30 horas) diarias durante los últimos 17 días que duró el experimento, con esto se logró sincronizar el consumo de alimento en este horario y se favorecieron las observaciones de su metabolismo cuando se aislaron sus tejidos. Se registró diariamente el peso del alimento consumido y el peso de cada rata cada dos días.

Al día 21 las ratas de cada grupo, previamente anestesiadas en una cámara saturada de CO₂, fueron sacrificadas por decapitación. Primero se sacrificaron 5 ratas de cada grupo (espirulina, caseína o soya) las cuales se encontraban en ayuno y posteriormente se fueron sacrificando 5 ratas de cada grupo cada 30 minutos y así se obtuvieron las muestras de tejidos a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de haber consumido su alimento.

Se recolectó la sangre de cada rata en tubos con gel separador (BD Vacutainer®, REF 368159, BD Franklin Lakes NJ, USA) para la determinación de parámetros bioquímicos. A los animales se les realizó necropsia para obtener el hígado y el tejido adiposo abdominal. Los tejidos se colocaron en tubos para microcentrífuga Eppendorf (Microtube, REF 311-08-051, Axigen, Union City, USA) y se almacenaron a -70°C en ultracongelador (Ultracongelador ULT-1685-A Revco, Rielsa; México). También se tomaron muestras de hígado y tejido adiposo de tamaño aproximado a 1 cm² y se colocaron en cassetes para histología (Shandon Cassete, REF 1000957

Thermo Fisher Scientific, Runcorn Cheshire, UK). Los cassetes con los tejidos se conservaron en formalina al 10% con el propósito de prevenir la autólisis del tejido.

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal del INCMNSZ.

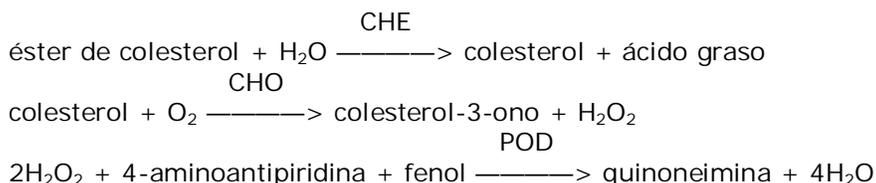
Parámetros bioquímicos y hormonales en suero

Se determinó en el suero de las ratas la concentración de hormonas (insulina y glucagón) así como parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos) y el derivado de un aminoácido: homocisteína, para evaluar el efecto de la proteína dietaria sobre el metabolismo. Los métodos para cada determinación se describen a continuación.

Para cuantificar la concentración de insulina sérica (Millipore Rat Insulin RIA KIT, #cat: RI-13K, Millipore, St Charles, Missouri, USA) y glucagón sérico (Millipore Glucagon RIA KIT, #cat: GL-32K, St Charles, Missouri, USA) se usó la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Esta prueba se basa en la competencia existente entre un antígeno no marcado (Ag) y una cantidad conocida del antígeno marcado (Ag*) para formar los complejos con una cantidad conocida de anticuerpo (Ac): AgAc o Ag*Ac. Con estos tres componentes (Ag, Ag* y Ac) puede realizarse el ensayo en el que manteniendo constante la cantidad de Ag* y Ac se observará que a mayor cantidad de Ag menos Ag* queda unido a la cantidad fija de Ac (por tanto menos radiactividad), lo que permitirá relacionar la radiactividad con la concentración de Ag (insulina o glucagón en la muestra problema). La radiactividad emitida se detecta en un contador de gamas (Quantum D5002, Packard, Lumant, USA) y los resultados se extrapolan en una curva de calibración que relaciona la medida de radiactividad contra la concentración de antígeno no marcado. Para más detalles ver el ANEXO III.

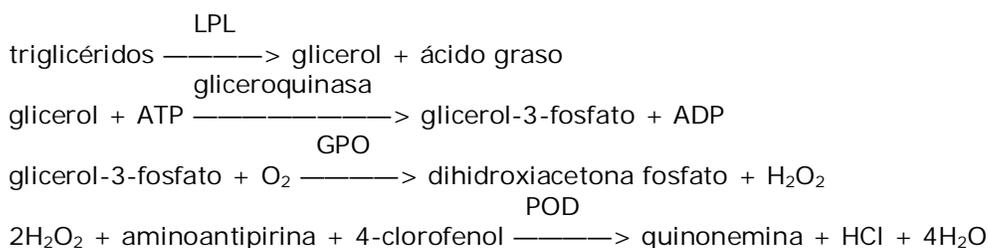
Las concentraciones de glucosa sérica se determinaron por el método de glucosa oxidasa con el analizador YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI Life Science, Ohio, USA). La glucosa se oxidó por acción de la glucosa oxidasa y se produjo D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno, el cual pasa a través de una membrana de celulosa a un electrodo de platino. La cantidad de peróxido de hidrógeno es proporcional a la cantidad de glucosa. Para más detalles ver el ANEXO III.

Las concentraciones de colesterol sérico se determinaron con la prueba enzimática fotométrica "CHOD-PAP" (Cholesterol FS, Diagnostic System International, Alemania). El principio de esta prueba es la determinación del colesterol después de la hidrólisis enzimática con colesterol esterasa (CHE) y la oxidación con colesterol oxidasa (CHO). El indicador colorimétrico es el quinoneimino que se genera de 4-aminoantipirina y fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de peroxidasa (POD) (Reacción de Trinder) (Artiss y Zak, 1997).



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol y se midió espectrofotométricamente a 500nm. Para más detalles ver ANEXO III.

Las concentraciones de triglicéridos séricos se determinaron por medio de un ensayo colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) (Triglicerides FS, Diagnostic System International, Alemania). El principio de esta prueba es la determinación de los triglicéridos después de la división enzimática con lipoproteína lipasa (LPL). 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 (POD) (Artiss y Zak, 1997). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos y se midió espectrofotométricamente a 500 nm. Para más detalles ver el ANEXO III.



La homocisteína en suero se cuantificó con el Homocysteine Kit con el equipo AxSYM System del laboratorio Abbott, Illinois, USA. Se trata de un inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA) que emplea a la homocisteína en su forma oxidada para reducirla con ditioneitol (DTT), la homocisteína libre es convertida enzimáticamente con adenosil-L-homocisteína hidrolasa a S-adenosil-L-homocisteína. Para más detalles ver ANEXO III.

Histología en hígado y tejido adiposo.

Las muestras de hígado y tejido adiposo que se encontraban en los cassetes conservados en formalina al 10% se embebieron en parafina (Paraplast Plus, #cat: 23-021-400, Fisher Scientific Company, Houston Tx). Este proceso se inició con la deshidratación del tejido mediante lavados de alcohol, posteriormente se removió el agente deshidratante con xilol que es miscible en la parafina que se utiliza al final para embeber el tejido. Después de la inclusión se realizaron cortes de las placas (parafina-tejido) con un micrótopo (Leica RM 2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). Los cortes para tejido adiposo fueron de 10 μm y para hígado de 4 μm , los cuales se colocaron en portaobjetos y se fijaron con calor. Para la tinción se revirtió el proceso de inclusión, se eliminó la parafina del tejido, a 60°C por 10 minutos, lo que permitió que los tintes penetraran en la muestra. El tejido se tiñó con el método de hematoxilina-eosina. Para más detalles ver ANEXO III. Después de la tinción las laminas se cubrieron con resina y con cubreobjetos para proteger los tejidos y para su revisión al microscopio (Leica DM LS Bx40, Objetivo 10x, Software RSIimage) en el Departamento de Patología del INCMNSZ.

Se realizó el análisis de cada fotografía del tejido adiposo empleando el programa *ImageJ* (NIH) 1.44 que permite delinear cada célula del campo elegido y tomando en cuenta 100 células, el programa calcula el área de cada célula en micras² teniendo así el tamaño representativo de los adipocitos.

Expresión génica

Estrictamente, el término expresión génica abarca desde la activación de un gen hasta que la proteína madura se ha localizado en el lugar adecuado y realiza su función, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. Este hecho puede ser abordado por técnicas de análisis de proteínas como lo es el Western blot. Sin embargo, es generalmente aceptado que la abundancia de un RNA mensajero (mRNA) y el número de moléculas por célula de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente. Por esta razón, en la práctica, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado con gran aproximación mediante detección y/o cuantificación de los mRNAs funcionales del citoplasma con métodos de estudio como el RT-PCR cuantitativa (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real acoplado la reacción de la Transcriptasa Reversa) (Hernández *et al.*, 1995).

Para el estudio de la expresión génica se llevó a cabo la extracción de RNA (Método de Tiocianato de Guanidinio con gradientes de Cloruro de Cesio de Chomczynski y Sachi, 1986) y proteína (Método de extracción con buffer de lisis RIPA; kurien y Scofield, 2006) del hígado de las ratas alimentadas con las diferentes dietas. Posteriormente, en los extractos de RNA se llevó a cabo la detección y cuantificación (RT-PCR cuantitativa) de los mRNAs de interés, los cuales son: SREBP-1c y FAS, para medir el efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la regulación de esta vía lipogénica; mTOR-C1 y SNAT2, para determinar cambios en su expresión a partir del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria. En los extractos de proteína se identificaron y cuantificaron (Western Blot; kurien y Scofield, 2006) las siguientes proteínas: SREBP-1c y FAS, la proteína transportadora SNAT2 y la proteína P70S6K en su forma fosforilada que indica la activación del complejo mTOR-C1. Cada uno de estos métodos se detalla a continuación.

Extracción, cuantificación e integridad de RNA de hígado

La posibilidad de aislar RNA lo más intacto posible es esencial para el análisis de la expresión génica. Una célula típica de mamífero contiene aproximadamente 10^{-5} μg de RNA total del que tan sólo 1–5% corresponde a mRNA.

El RNA total de hígado se aisló por el método de Tiocianato de Guanidinio con gradiente de Cloruro de Cesio de Chomczynski y Sachi, 1986. A diferencia del DNA, el RNA es muy inestable una vez obtenido el tejido, por la presencia de las ribonucleasas (RNAsas) tanto endógenas como exógenas. Por ello resulta crítica la congelación del tejido. Para eliminar la degradación de RNA, durante la extracción se desnaturalizaron todas las proteínas celulares, con potentes agentes caotrópicos, como las sales de guanidinio. En este procedimiento se mezclaron 500 mg de tejido congelado con 8 mL de solución de tiocianato de guanidinio/ β -mercaptoetanol y se homogeneizaron con un politrón a máxima velocidad (Polytron MOD. PT2000, USA). Se agregaron 400 μL de N-laurilsarcosina 10% y se centrifugó por 15 minutos a 18°C y 14000 rpm (23 665 x g) (Centrífuga Beckman J2-MC, USA. Rotor: JA-20). El sobrenadante se transfirió a un tubo de polialómero con 4 mL de cloruro de cesio (CICs) 5.7 M (1.1–1.2 g/mL) y se sometió a ultracentrifugación por 18 horas a 18°C y 29000 rpm (149 309 x g) (Ultracentrífuga Beckman XL-90, USA. Rotor: SW-40T1). El RNA se sedimentó tras la centrifugación a alta velocidad en el gradiente de cloruro de cesio formado. La densidad del RNA (>1.8 g/mL) es mayor que la del resto de los componentes celulares y mayor también que la del CICs. El resultado

es que durante la sedimentación los distintos componentes celulares van quedando a distintas alturas en el tubo, mientras que el RNA forma un pellet en el fondo. Después de 18 horas se eliminó el sobrenadante y se disolvió la pastilla de RNA con 300 μ L de agua-DEPC (dietilpirocarbonato), el DEPC es un agente quelatante que reacciona covalentemente y de modo inespecífico con las proteínas, pero es muy reactivo con los sitios activos de las RNAsas inactivándolas. Posteriormente se agregaron 30 μ L de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 750 μ L de etanol al 100% frío para precipitar el RNA y purificarlo. De esta manera se almacenaron por un mínimo de 24 horas en ultracongelador a -70°C (Ultracongelador ULT-1685-A Revco, Rielsa; México).

Posteriormente se descongelaron las muestras en hielo y se centrifugaron por 30 minutos a 4°C y 14000 rpm (20 817 x g) (Eppendorf Centrifuge 5804R, USA. Rotor: F45-13-11). Se desechó el sobrenadante y se dejó escurrir por inversión. Se añadió 1 mL de etanol al 70% frío y se mezcló hasta que se desprendiera la pastilla. Se centrifugó por 15 minutos a 4°C y 14000 rpm, se tiró el sobrenadante y se suspendió la pastilla en 500 μ L de agua-DEPC y se almacenó en ultracongelador a -70°C . Para más detalles ver el ANEXO III.

Fue necesario cuantificar las muestras de RNA, para posteriormente comprobar su integridad y llevar a cabo la reacción de RT-PCR cuantitativa. Para la cuantificación de RNA total extraído de hígado, se descongelaron las muestras en hielo y después se calentaron a 65°C por 5 minutos, pues el agua-DEPC hace que el RNA vuelva a su estructura secundaria. Se cuantificaron las muestras de RNA midiendo su absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) empleando como blanco de la cuantificación agua sigma. La pureza de la muestra se relaciona tomando otra lectura de absorbancia a 280nm para obtener la relación 260nm/280nm que debe ser de 1.9-2.2, si el valor de la lectura no se encontrara en este intervalo se puede decir que el RNA se encuentra contaminado con proteínas. Para más detalles ver el ANEXO III.

Para evaluar la integridad de RNA total de hígado se analizaron 15 μ g de RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (ANEXO III). Posteriormente se visualizó el gel en un transiluminador y se tomó una fotografía del gel (Kodak Digital Imaging) en donde se observaron dos bandas que corresponden al RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S, la banda rRNA 28S se mostró dos veces más brillante que la banda rRNA 18S, esto indica que el RNA total no se encontraba degradado. La presencia de bandas muy cercanas a los pozos indica la presencia de DNA.

RT-PCR cuantitativa

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar, utilizada para amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de DNA mediante Taq DNA polimerasa. Sin embargo, la Taq DNA polimerasa sólo es capaz de sintetizar DNA a partir de un molde de DNA por lo que es necesario generar primero una cadena de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA mediante una DNA polimerasa dependiente de RNA, enzima conocida como transcriptasa reversa o RT. La síntesis de cDNA se realizó con ayuda de un Termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9600 USA) y se programó para las siguientes condiciones: 1 hora a 42°C, 5 minutos a 94°C y 30 minutos a 4°C. Para la síntesis de una cadena de cDNA a partir de mRNA se aprovechó la presencia de la secuencia de poli-adenosina en el extremo 3' (*cola poli(A)*) de los mRNAs y se utilizó como cebador, o primer, un oligonucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo(dT)) de 15 nucleótidos de longitud (Invitrogen #cat: Y01212, Carlsbad, CA, USA) que se alineó a las *colas de poli(A)*. La Transcriptasa Reversa que se utilizó es la del retrovirus Monocytic Murine Leukemia Virus (MMV L) (Invitrogen #cat: 28025-013, Carlsbad, CA, USA) que funciona *in Vitro*. Para más detalles ver el ANEXO III.

El cDNA sintetizado se sometió a una reacción de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa usando Ensayos Fluorogénicos Taqman® de Applied Biosystems para los siguientes genes: SREBP-1c (No. de ensayo: Rn01495769-m1), FAS (No. de ensayo: Rn00569117-m1), mTOR-C1 (No. de ensayo: Rn00693900-m1) y SNAT2 (No. de ensayo: Rn0071042-m1). Se determinó la expresión de estos genes mediante una cuantificación relativa a un gen control, abundante en la célula y relativamente invariable, en este caso beta-actina (No. de ensayo: Rn0067869-m1). Las sondas TaqMan® permiten medir los productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluorocromo en su extremo 3' y una molécula en el extremo 5' (denominada en inglés «quencher») que bloquea su emisión de fluorescencia; esta sonda marcada híbrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de primers específicos), la sonda híbrida en la secuencia diana, pero debido a la cercanía entre el fluorocromo y el «quencher» no se emite fluorescencia; cuando la *Taq DNA polimerasa* termorresistente se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del «quencher» y el fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia.

Se utilizó el Termociclador ABI Prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, USA) y se programó para las siguientes condiciones: 45 ciclos de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 60°C, siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, User Bulletin no. 2, 2001). 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. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de mRNA iniciales. Para más detalles ver el ANEXO III y ANEXO IV.

Extracción y cuantificación de Proteína de hígado

Como parte del estudio de la expresión génica fue necesario extraer la proteína total de las muestras de hígado, esto se llevo a cabo a través del Método de extracción con buffer de lisis RIPA (kurien y Scofield, 2006). En este método se homogeneizó cada tejido con el buffer de lisis RIPA (PSB, NP-40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5%, SDS al 0.1% y azida de sodio), pastillas de inhibidores de proteasas (Complete mini #cat: 11836153001, Roche, Alemania), ortovanadato de sodio 100 mM y NaF 100 mM durante 20 minutos a 4°C, con ayuda de politrón a máxima velocidad (Polytron MOD. PT2000, USA). El homogeneizado se centrifugó (Centrifuga Beckman J2-MC, USA. Rotor: JA-20) a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La porción del sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteína en ellos, por el Método de Lowry (DC, Protein Assay, #cat: 5000116 Bio-Rad), se utilizó albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia, se determinó la concentración de proteína a 750 nm en espectrofotómetro (Beckman DU 640). Para más detalles ver ANEXO III.

Western blot

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguida de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. El método más potente es el denominado 'Western blot' (kurien y Scofield, 2006) en el que las proteínas fueron separadas en primer lugar mediante electroforesis (alineación: 75 volts por 30 minutos y separación 100 volts por 2 horas) en un gel desnaturizante concentrador al 4% de poliacrilamida y un gel desnaturizante separador al 8% de poliacrilamida con un grosor de 1.5 mm, las muestras de proteína (40 µg) se corrieron junto con un marcador de pesos moleculares Rainbow (Precision plus

Protein Kaleidoscope Standards #cat: 161-0375, Bio-Rad), en la cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris base, glicina y SDS 10%, pH 8.3).

Posteriormente se transfirieron las proteínas en una cámara de transferencia mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel (15 volts, 30 minutos) sobre una membrana de policloruro de vinilideno (PVDF), se corroboró la transferencia tiñendo la membrana con reactivo de Ponceau S. Se realizó la saturación de todos los lugares no ocupados de unión a proteínas, de la membrana, con solución de bloqueo (leche descremada Bio-Rad al 5%) para evitar la unión no específica de anticuerpo. Se incubó la membrana con anticuerpo primario contra la proteína de interés (Tabla 5.6) durante toda la noche, a 4°C y con agitación lenta de 120 rpm, se lavó la membrana con TBS-tween y se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 5.6) por 2.5 horas a temperatura ambiente con agitación lenta de 120 rpm, se lavó nuevamente la membrana. Las bandas de proteínas se hicieron visibles por incubación con reactivos quimioluminiscentes (ECL Inmobilon Western #cat: WBKLS0100, Millipore) en cuarto oscuro y con película autoradiográfica (Kodak MIN R-2000), el tiempo de exposición depende de cada proteína. La cuantificación de cada proteína de interés se hizo por densitometría óptica con el software *ImageJ* (NIH) 1.44, los valores obtenidos se normalizaron con la concentración de actina, proteína constitutiva que se usó como control.

Tabla 5.6. Anticuerpos: especificaciones y condiciones

ANTICUERPO PRIMARIO	Marca	Peso molecular	Dilución	ANTICUERPO SECUNDARIO	Dilución
SERBP-1c (C20) cat: Sc-366	Santa Cruz Technology	Precursor: 125 kDa Maduro: 68KDa	1:1000	Anti-RABBIT	1:3500
FAS (H300) cat: Sc-20140	Santa Cruz Technology	270 KDa	1:2000	Anti-RABBIT	1:3500
P70S6K cat: 9202	Cell Signalling Technology	70 KDa	1:1000	Anti-RABBIT	1:3000
p-P70S6K (Thr 389) cat: 9205	Cell Signalling Technology	70 KDa	1:500	Anti-GOAT	1:3000
SNAT2 (H60) cat: Sc-67081	Santa Cruz Technology	60KDa	1:800	Anti-RABBIT	1:3500
ACTINA (I-19) (constitutiva) cat: Sc-1616	Santa Cruz Technology	43 KDa	1:1000	Anti-GOAT	1:3000

Análisis Estadístico

Los resultados de cada experimento se expresaron como el valor promedio \pm el error estándar (EE). Para cada tiempo de ayuno y posprandio durante la eutanasia de los animales de laboratorio se tuvo una $n=5$, cada determinación de RT-PCR cuantitativa y Western blot se hizo por triplicado y cada determinación de parámetros bioquímicos se hizo por duplicado. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, consumo de alimento, así como comparación entre los valores obtenidos de cada experimento se evaluaron por Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para determinar si existe diferencia significativa entre las tres dietas consumidas y entre los tiempos de consumo. Se utilizó la prueba de Cuadrados Mínimos de Fisher para determinar en qué grupo crecieron más las ratas y consumieron más alimento. Estos análisis se hicieron con un nivel de significancia de $p<0.05$. Se utilizó el software GraphPad Prism5 para todos los cálculos estadísticos y se usó el Procesador de Imagen Digital *ImageJ* (NIH) 1.44 para el análisis de imágenes (densitometría e histología).

6. RESULTADOS

Para determinar el valor nutrimental de la fuente de proteína presente en cada dieta fue necesario conocer su perfil de aminoácidos y evaluar el efecto que tiene sobre la ganancia en peso y el consumo de alimento de las ratas durante 21 días.

Aminogramas

Se determinó el perfil de aminoácidos para cada fuente de proteína (Tabla 6.1). Los valores indicados para los aminoácidos indispensables se compararon con los valores recomendados por la FAO/OMS/UNU en 1985 para niños en crecimiento de 2 a 5 años de edad (Gráfica 6.1). La arginina y la histidina se consideran indispensables durante la etapa de crecimiento.

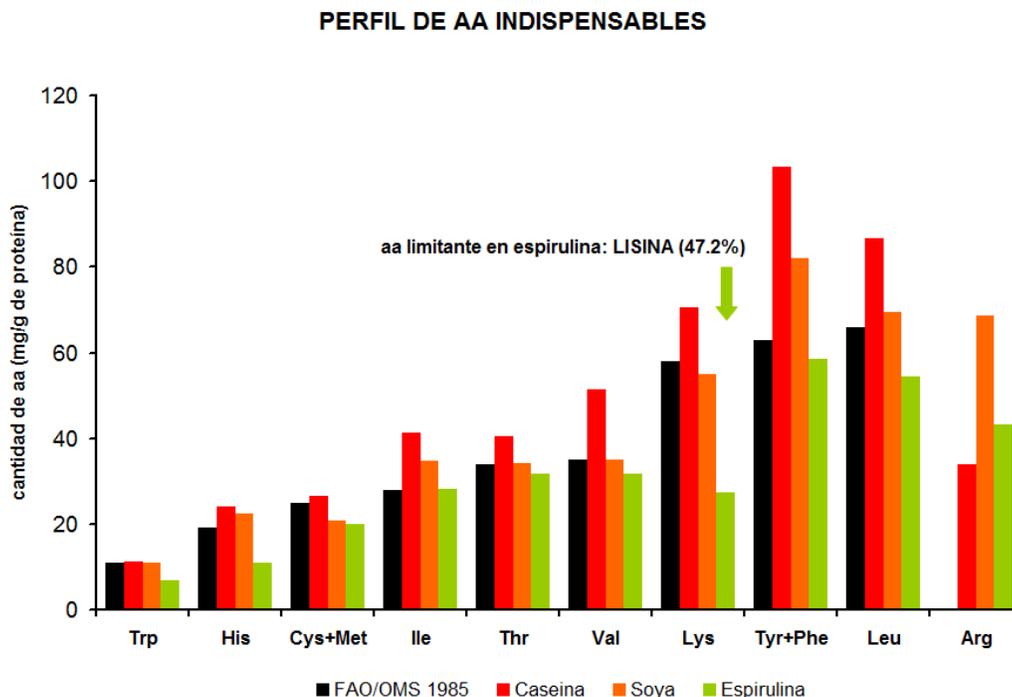
Tabla 6.1. Aminograma para caseína, soya y espirulina.

AMINOÁCIDO	FAO/OMS/UNU 1985	CASEÍNA Harlan	SOYA SUPRO	ESPIRULINA Solarium B.
	(mg/g de proteína)			
cistina+metionina	25	26.6	20.9	19.9
isoleucina	28	41.2	34.6	28.1
leucina	66	86.6	69.3	54.3
lisina	58	70.4	55.0	27.4
treonina	34	40.5	34.3	31.8
triptófano	11	11.2	10.8	6.9
tirosina+fenilalanina	63	103.4	82.0	58.4
valina	35	51.5	35.1	31.7
ácido aspártico		67.0	104.1	62.0
ácido glutámico		203.6	169.0	91.8
serina		53.4	50.0	32.9
glicina		17.5	36.9	31.1
arginina		33.8	68.7	43.2
alanina		29.0	38.9	49.0
histidina	19	24.1	22.3	10.8
hidroxiprolina		<0.5	<0.5	<0.5
prolina		105.5	48.7	24.4
lisina / arginina		2.1	0.8	0.6

Realizado por Laboratorios Silliker de México (Método PNTQ1339 HPLC).

En estos resultados se confirma que las proteínas de origen vegetal generalmente tienen una mayor cantidad de aminoácidos dispensables como: glicina, arginina y alanina. Mientras que las proteínas de origen animal tienen mayor cantidad de aminoácidos indispensables.

Gráfica 6.1. Comparación de aminoácidos indispensables de las diferentes fuentes de proteína.



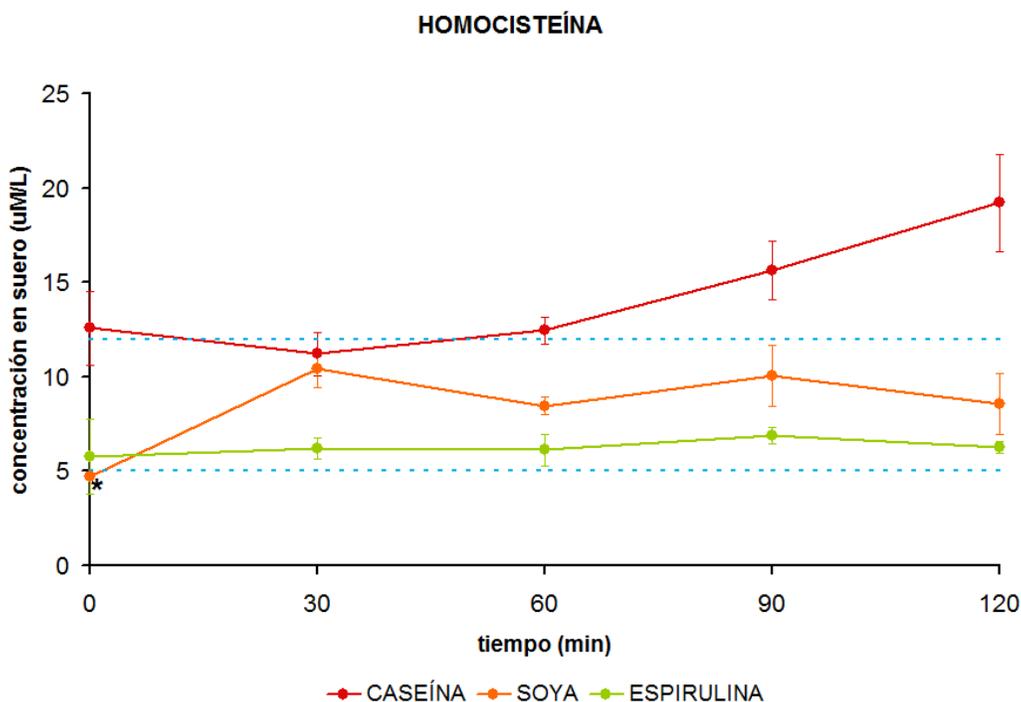
Los aminoácidos presentes en la caseína cubrieron los requerimientos de aminoácidos indispensables establecidos por la FAO/OMS/UNU en 1985 para niños en crecimiento de 2 a 5 años de edad. En el concentrado de proteína de soya los aminoácidos azufrados (cistina+metionina), la lisina y el triptófano se encontraron en cantidades por debajo de lo establecido en dichas recomendaciones, cubriendo solamente el 83.6%, 94.8% y 98.2% respectivamente. Se consideró por lo tanto que los aminoácidos azufrados fueron limitantes en la proteína de soya (Tabla 6.2). La proteína de espirulina fue deficiente principalmente en lisina, que resultó ser el aminoácido limitante, ya que representó sólo el 47.2% de lo recomendado para un crecimiento óptimo según los datos de la FAO/OMS/UNU antes mencionados (Tabla 6.2). Todos los aminoácidos indispensables en la espirulina se encontraron por debajo de estos requerimientos, estos aminoácidos fueron: triptófano (62.72%), aminoácidos azufrados (79.6%), leucina (82.2%), valina (90.57%), treonina (93.52%) y aminoácidos aromáticos como tirosina y fenilalanina (92.69%). Cabe destacar que por lo anterior la relación lisina/arginina fue menor para la espirulina.

Tabla 6.2. Aminoácidos limitantes y deficientes de las diferentes fuentes de proteína.

aa	aa indispensables									aa dispensables						
	Trp	His	Cys+Met	Ile	Thr	Val	Lys	Tyr+Phe	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Pro
CAS																
SOY																
ESP																
	■ limitante ■ deficiente									■ valor más alto						

Dos aminoácidos de interés son la cisteína y la metionina ya que se ha reportado que contribuyen al desarrollo de hipercolesterolemia en modelos animales (Blachier *et al.*, 2010). En particular la homocisteína, un derivado de la cisteína, se encuentra presente en sangre y en niveles elevados representa un factor de riesgo cardiovascular. Las concentraciones normales en mamíferos que ha reportado la American Heart Association en 2005 son de 5 a 12 $\mu\text{M/L}$ (Sánchez *et al.*, 2009). Por lo anterior se determinó el contenido de homocisteína en el suero de las ratas alimentadas con caseína, soya o espirulina como fuente de proteína (Gráfica 6.2).

Gráfica 6.2. Homocisteína en suero de ratas en ayuno y durante dos horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



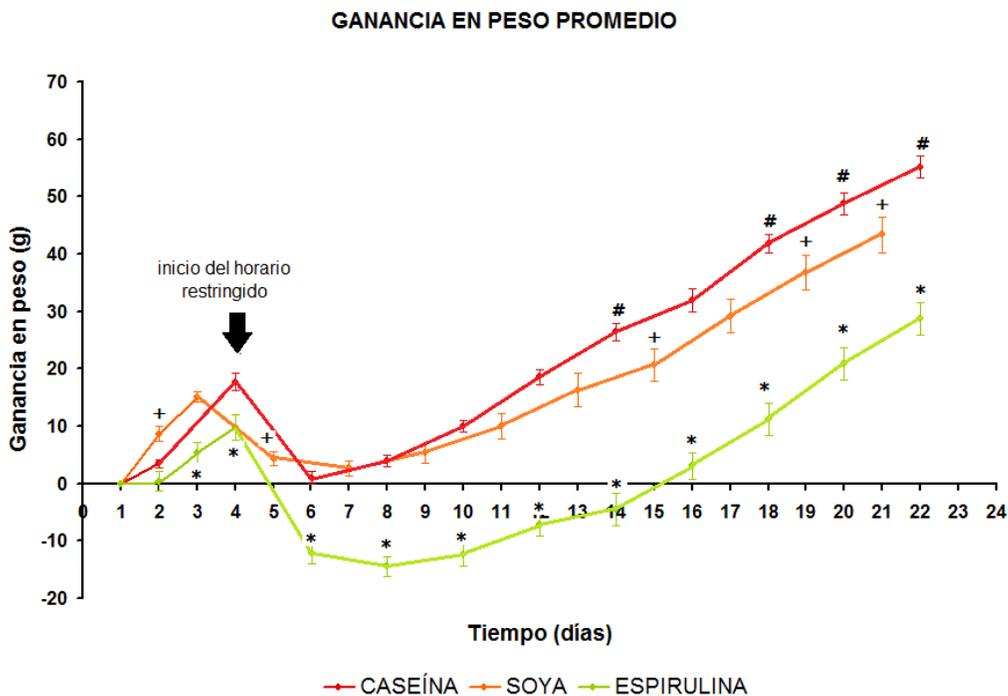
----- Indica el rango normal en mamíferos que ha reportado la American Heart Association en 2005.

En la gráfica de homocisteína se observó que las ratas alimentadas con caseína concentraron mayor cantidad de este derivado en su sangre y esto se relacionó con el hecho de que es la proteína con mayor nivel de cisteína. A pesar de que las diferencias no fueron significativas, en el minuto 90 y 120 después de que fueron alimentadas, los valores que se observaron son más altos que lo establecido por la American Heart Association para mantener un estado de salud adecuado, como se mencionó antes. Las ratas que consumieron espirulina y soya mantuvieron niveles constantes durante dos horas posprandio y dentro del rango que no implica riesgo para la salud.

Crecimiento de ratas alimentadas con tres diferentes fuentes de proteína.

A continuación se muestra la ganancia en peso promedio por día para cada grupo de ratas que se alimentó con caseína, soya o espirulina como fuente de proteína (Gráfica 6.3). Para más detalles ver ANEXO V.

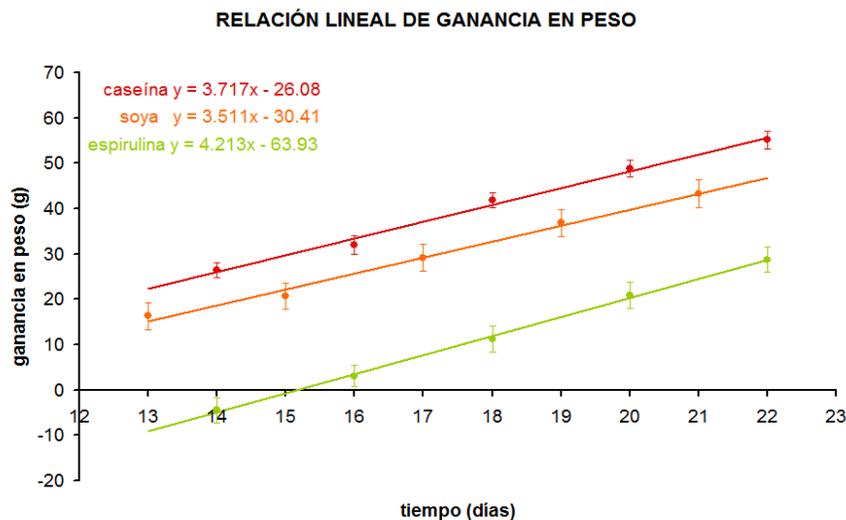
Gráfica 6.3. Ganancia en peso a lo largo de 22 días para las ratas alimentadas con diferente fuente de proteína (promedio \pm EE, $n=25$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



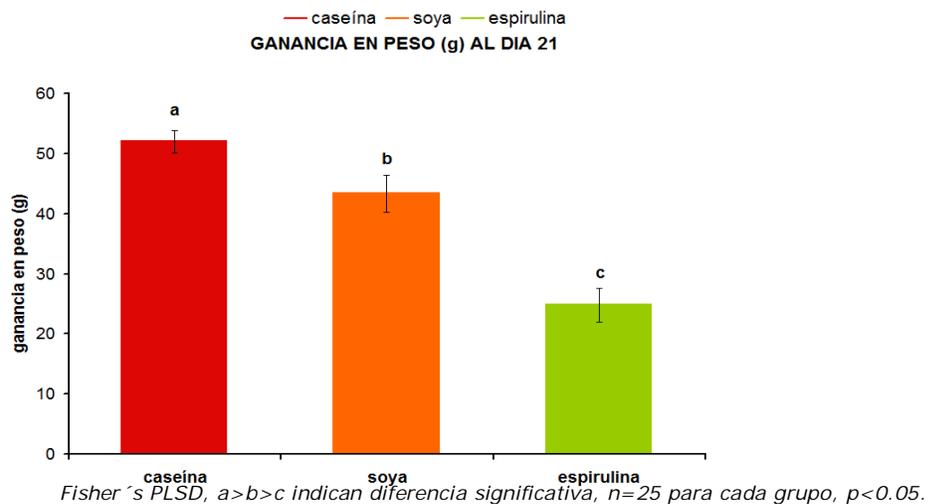
Se observó que las ratas alimentadas con espirulina como fuente de proteína tuvieron un decremento significativo en su ganancia de peso y este decremento se prolongó por más tiempo que en las ratas alimentadas con las dietas de caseína o soya, después del inicio del horario restringido. Alrededor del día 14 se observó que las ratas empezaron a ganar peso de forma lineal, el grupo de ratas alimentadas con espirulina tuvo una velocidad de crecimiento mayor (4.2 g/d) que las ratas alimentadas con caseína (3.7 g/d) o las ratas alimentadas con soya (3.5 g/d). Al día 21 las ratas que consumieron caseína tuvieron significativamente mayor ganancia en peso 19.2% más que las ratas que consumieron soya y 53.8% más que las ratas que consumieron espirulina (Gráfica 6.4).

Gráfica 6.4. Relación lineal de ganancia en peso a partir del día catorce después del inicio del experimento (a) y comparación de ganancia en peso al día 21 (b) de las ratas alimentadas con diferente fuente de proteína (promedio \pm EE, $n=25$, $P<0.05$).

(a)



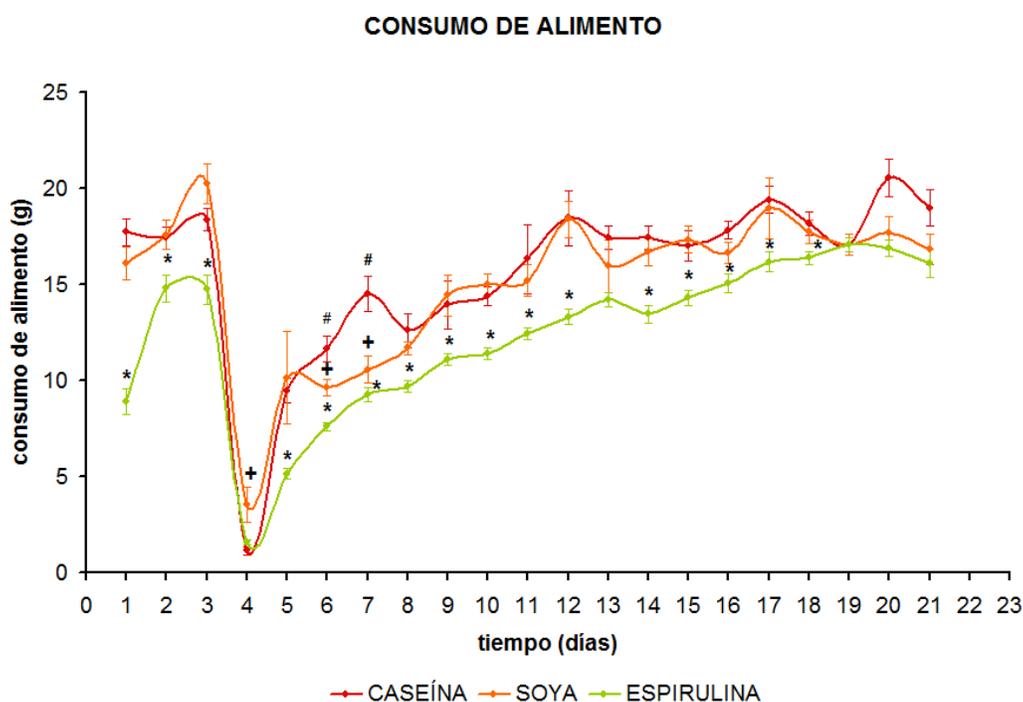
(b)



Consumo de alimento

Los siguientes datos muestran el consumo de alimento promedio en cada grupo de ratas a lo largo de los 21 días que duró el experimento (Gráfica 6.5). Para más detalles ver ANEXO V.

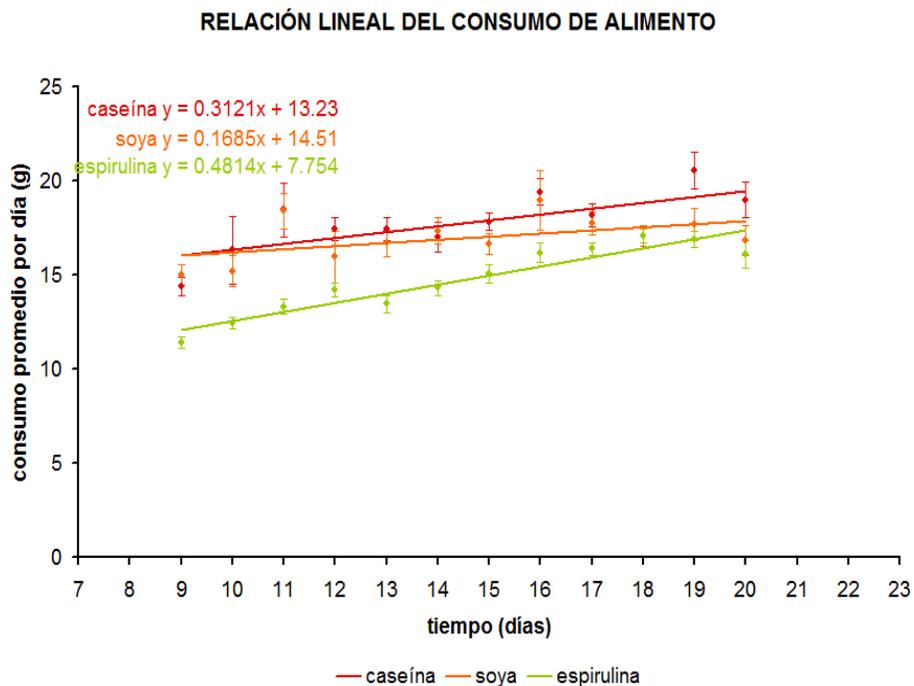
Gráfica 6.5. Consumo de alimento promedio a lo largo de 21 días para las ratas alimentadas con diferente fuente de proteína (promedio \pm EE, $n=25$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



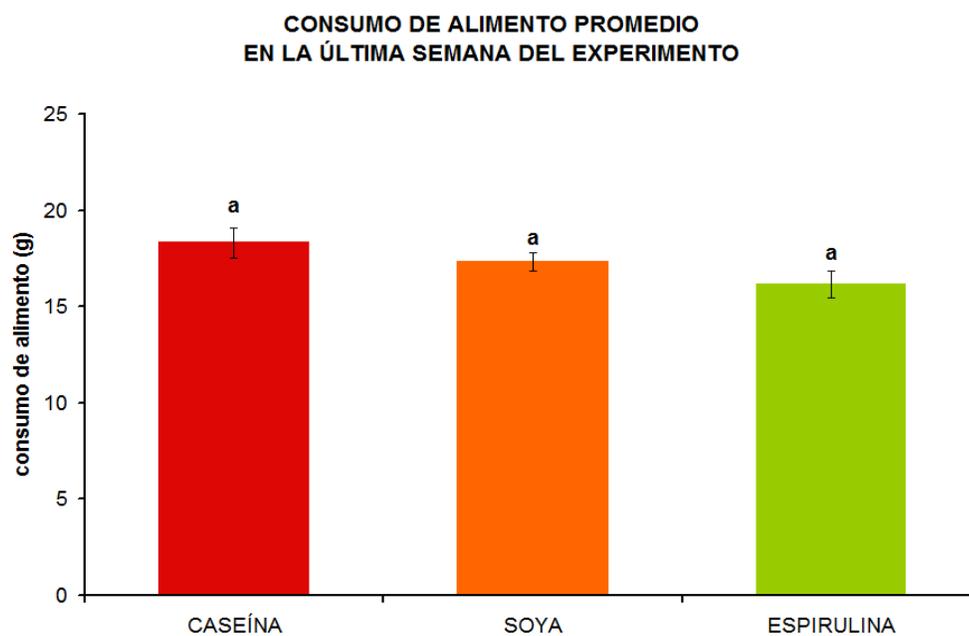
En el inicio del experimento, se observó que el grupo de ratas alimentadas con espirulina consumieron significativamente menor cantidad de alimento (8.9 ± 0.6 g) comparado con los grupos que se alimentaron con caseína o soya (16.9 ± 0.6 g). Después de que iniciaron el horario restringido, el consumo de alimento de los grupos se mantuvo en ascenso y durante la última semana de alimentación, las ratas con dieta de espirulina, aumentaron su consumo de alimento por día (15.99 ± 0.7 g), al igual que las ratas que consumieron caseína o soya (18.42 ± 0.7 g), de esta manera al final del experimento no existió diferencia significativa en el consumo de alimento entre los tres grupos (Gráfica 6.6).

Gráfica 6.6. Relación lineal de consumo de alimento a partir del día nueve después del inicio del experimento (a) y comparación de consumo de alimento en la última semana (b) de las ratas alimentadas con diferente fuente de proteína.

(a)



(b)



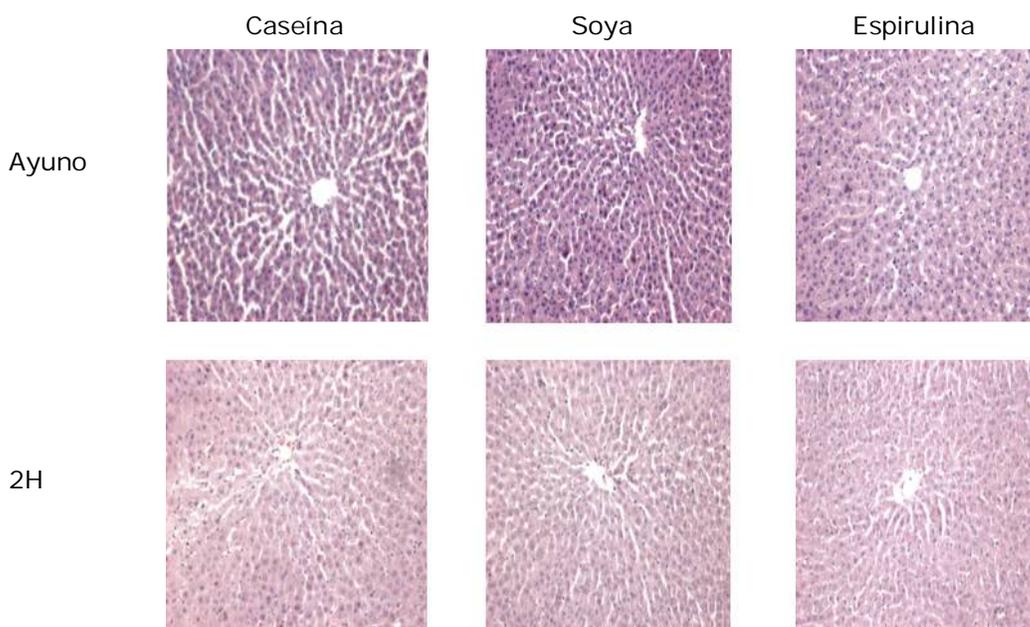
Fisher's PLSD, $a > b > c$ indican diferencia significativa, $n=5$ para cada grupo, $p < 0.05$.

Histologías

Se realizó un estudio histomorfológico para analizar la estructura microscópica del hígado y tejido adiposo, ya que como se ha mencionado con anterioridad las proteínas en la dieta generan cambios en el metabolismo de lípidos favoreciendo la acumulación de grasa en hígado (hígado graso) o el aumento en el tamaño de adipocitos (hipertrofia del tejido) (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008).

A continuación se presentan los resultados de las histologías del hígado de las ratas que se alimentaron con las dietas de caseína, soya o espirulina, en el periodo de ayuno y a las 2 horas posprandio (Figura 6.1). Se eligieron estos tiempos porque fueron el punto inicial y final del experimento.

Figura 6.1. Cortes histológicos de hígado de ratas en ayuno y dos horas después de consumir dietas con diferente fuente de proteína.



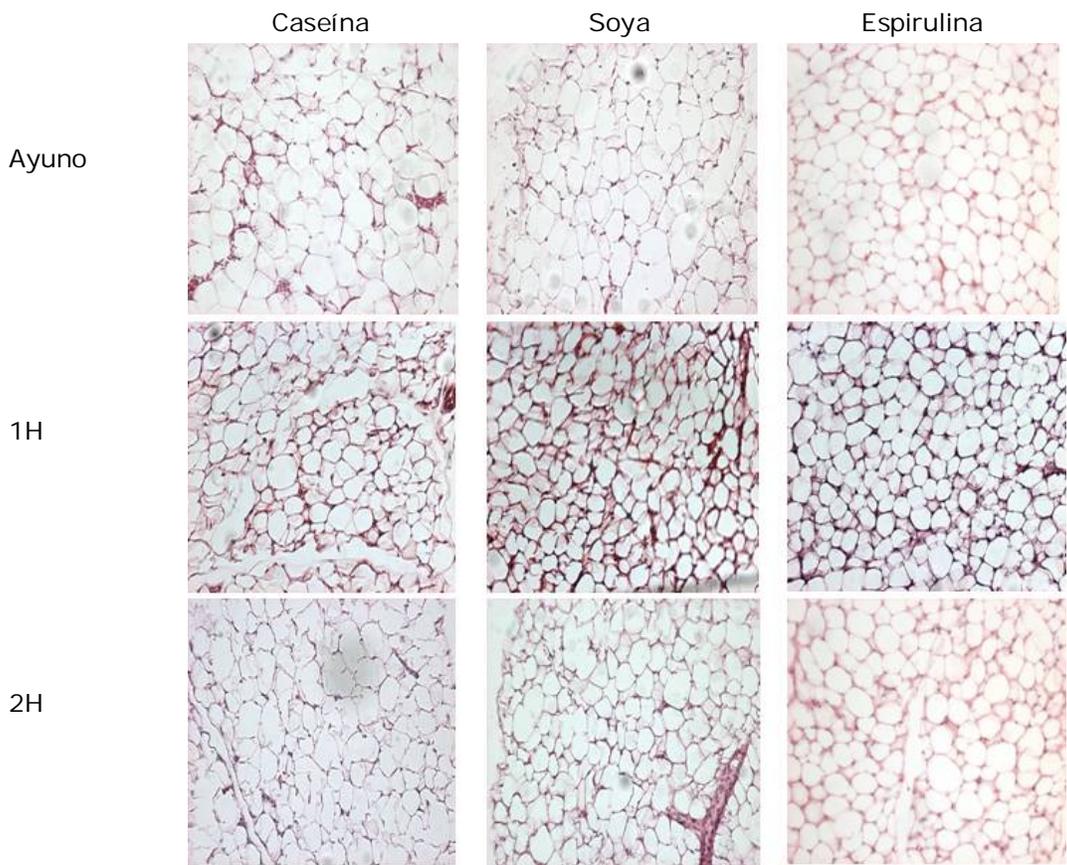
Tinción hematoxilina-eosina, aumento 10x

Un hígado sano en mamíferos se caracteriza por la disposición radial de los hepatocitos en torno a un espacio abierto, que es una vena central, formando pequeñas unidades histológicas o lobulillos hepáticos. Los lobulillos pueden estar separados unos de otros por tejido conjuntivo. En las fotografías de los cortes histológicos de hígado que aquí se presentan, se observó que el tejido fue propio de un animal sano, la morfología fue típica y no hubo presencia de daño por acumulación de grasa, para ningún grupo de ratas en ayuno o después de consumir las dietas con caseína, soya o espirulina.

Se realizó el análisis histomorfológico de tejido adiposo blanco, para corroborar que no hubo cambios en el tamaño de estas células, debido al consumo de diferentes tipos de proteína dietaria, como ya se ha reportado en estudios previos del grupo de Tovar y colaboradores en 2008.

A continuación se presentan las fotografías del tejido adiposo blanco para las ratas que se alimentaron con las tres diferentes dietas, durante el periodo de ayuno y después de 1 hora y 2 horas posprandio (Figura 6.2).

Figura 6.2. Cortes histológicos de tejido adiposo blanco de ratas en ayuno y después de 1 hora y 2 horas de ser alimentadas con diferente fuente de proteína.



Tinción hematoxilina-eosina, aumento 10x

Se ha probado en modelos de obesidad, el efecto que tienen dietas a base de proteína de soya y caseína sobre el tejido adiposo y se ha observado que las ratas alimentadas con proteína de soya presentan adipocitos más pequeños, lo que implica que son más funcionales (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008). En las fotografías del tejido adiposo que aquí se presentan, se observaron células de tamaño y forma típica de animales sanos.

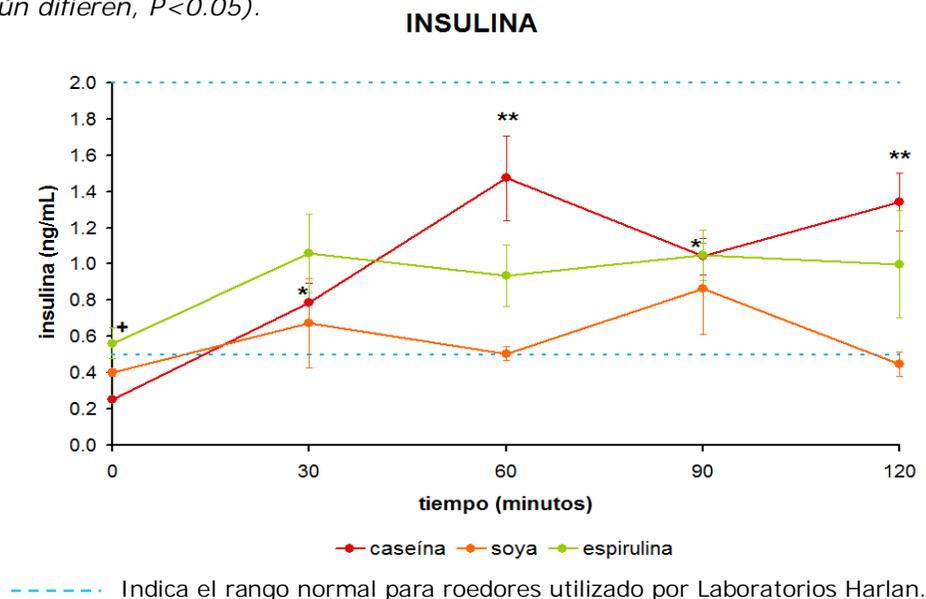
Se realizó el análisis de cada fotografía para determinar el tamaño de los adipocitos empleando el programa ImageJ (NIH) 1.44. La mayor cantidad de adipocitos se encontró en el intervalo de 500 a 1000 μm^2 , un rango que indica adipocitos de tamaño pequeño, esta tendencia fue similar en los tres grupos, caseína, soya y espirulina y en los periodos de ayuno y alimentación que se determinaron para cada dieta. Cabe mencionar que la proteína de soya generó mayor acumulación de adipocitos pequeños, para más detalles ver Anexo VI.

Cambios metabólicos.

Se determinaron los parámetros bioquímicos en suero de las ratas alimentadas con caseína, soya o espirulina, en cinco tiempos diferentes, las primeras cinco ratas de cada grupo correspondieron al estado de ayuno (tiempo cero) y posteriormente se dividieron en grupos de cinco ratas con 30, 60, 90 y 120 minutos de alimentación posprandial para cada una de las dietas.

Uno de los parámetros bioquímicos más determinantes es la concentración de insulina, ya que en el hígado la transcripción de la mayoría de los genes que sintetizan enzimas metabólicas son inducidos por esta hormona (Foufelle y Ferré, 2002). A continuación se muestra la concentración de insulina sérica en ratas que consumieron dietas con diferente fuente de proteína, cada una de las cuales presentó un perfil de aminoácidos específico.

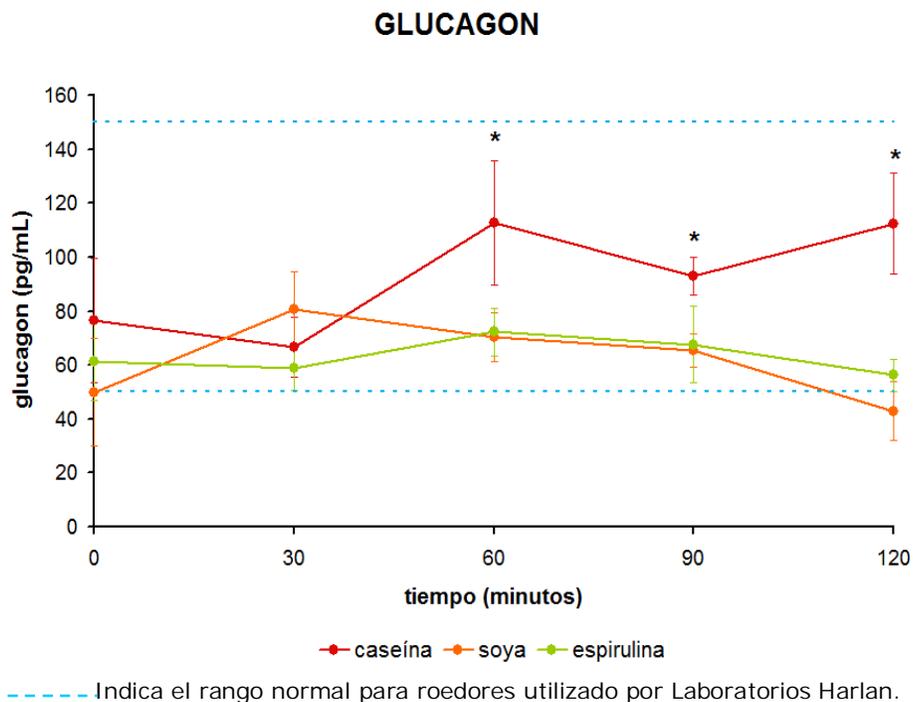
Gráfica 6.7. Insulina sérica en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



En la gráfica anterior se observa que en las ratas que consumieron espirulina hubo un aumento significativo en la concentración de insulina sérica del ayuno a los 30 minutos posprandio y después se mantuvo constante. Para las ratas que consumieron soya la concentración de insulina se mantuvo constante desde el ayuno hasta 2 horas posprandio, mientras que en las ratas que se alimentaron con caseína se observó un aumento significativo desde el ayuno hasta los 60 minutos posprandio. La caseína generó una secreción de insulina 33.4% mayor de lo que lo hizo la espirulina y 66.7% mayor de lo que se generó con la proteína de soya, estas diferencias fueron significativas a los 60 minutos posprandio. A excepción de las ratas con dietas de caseína y soya en el tiempo de ayuno, la concentración de insulina serica se mantuvo dentro de los rangos normales para roedores indicados por los Laboratorios Harlan (0.5-2 ng/mL).

Junto con la insulina, el glucagon es otra hormona clave en la regulación del metabolismo de lípidos. Produce efectos opuestos a los de la insulina en las rutas biosintéticas y catabólicas del hígado (Saltiel y Kahn, 2001). Se determinó la concentración de glucagon sérico (Gráfica 6.8) con el fin de relacionar estos datos con los que se encontraron para insulina y verificar si existe una respuesta al perfil de aminoácidos que consumió cada grupo de ratas.

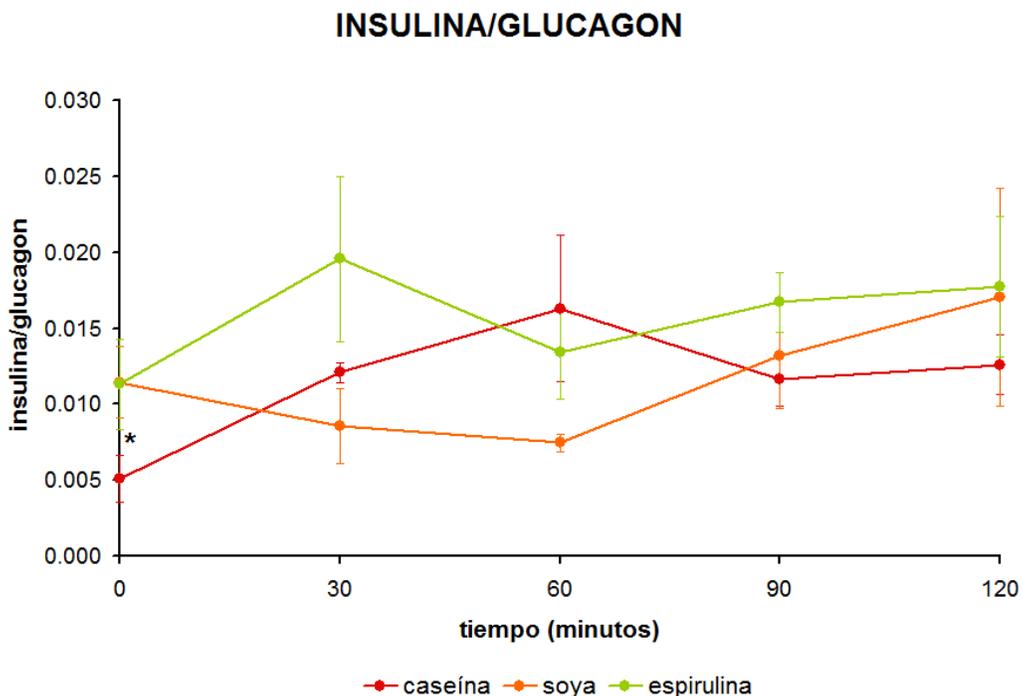
Gráfica 6.8. Glucagon sérico en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



El glucagon sérico se mantuvo dentro de los valores fisiológicos normales para roedores utilizado por los Laboratorios Harlan (50-150pg/mL) en todos los grupos. Las ratas que consumieron espirulina y soya mantuvieron concentraciones de glucagon sérico sin cambios significativos desde el ayuno y hasta las dos horas posprandio, mientras que las ratas con dieta a base de caseína mostraron un aumento significativo desde el ayuno hasta los 60 minutos posprandio, después de este periodo, este grupo de ratas presentó la concentración significativamente mayor de glucagon en su sangre, 36.4% más que las ratas que consumieron espirulina o soya.

Como se ha mencionado antes, generalmente las proteínas de origen vegetal tienden a favorecer la secreción de glucagon sobre la secreción de insulina, esto repercute directamente en el metabolismo lipídico en el hígado de mamíferos (Saltiel y Kahn, 2001). A continuación se muestra la gráfica de la relación insulina/glucagon (Gráfica 6.9) que ayuda a correlacionar el efecto de la proteína dietaria sobre la concentración de estas hormonas en la sangre.

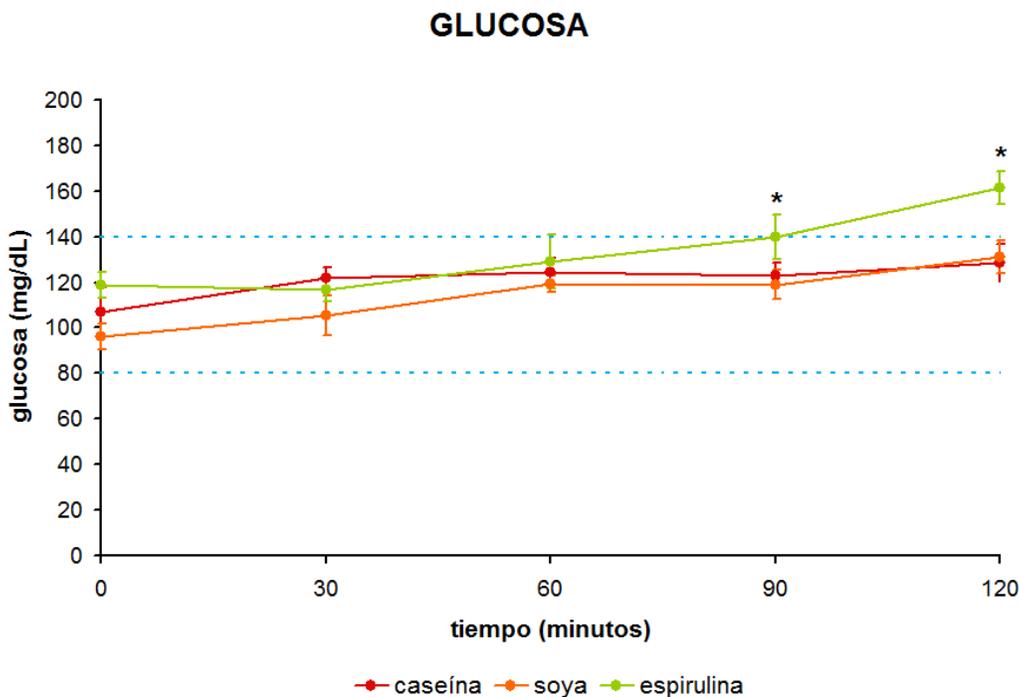
Gráfica 6.9. Relación insulina/glucagon en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



La relación insulina/glucagon se mantuvo sin cambios significativos desde el ayuno hasta dos horas posprandio en todos los grupos, a excepción de las ratas con la dieta de caseína durante el ayuno, las cuales mostraron una relación insulina/glucagon significativamente más baja. En el minuto 30 después de consumir las dietas las diferencias fueron significativas entre los tres grupo, las ratas que consumieron espirulina presentaron una relación insulina/glucagon 40% mayor que las ratas que consumieron caseína y 60% mayor que las ratas que consumieron soya.

Cuando la glucosa llega desde el intestino hasta el torrente sanguíneo, el aumento de glucosa en la sangre provoca la secreción de insulina y una disminución en la secreción de glucagon. Debido a la captación acelerada de glucosa sanguínea, la concentración de glucosa en sangre disminuye hasta niveles normales y también disminuye la liberación de insulina por las células β del páncreas. Por lo tanto hay una estrecha relación retroactiva entre la velocidad de secreción de insulina y la concentración de glucosa en sangre (Nelson et al., 2000 y Benyon, 2003). En la siguiente gráfica se observa la concentración de glucosa en sangre (Gráfica 6.10) de las ratas que fueron alimentadas con los tres diferentes tipos de proteína.

Gráfica 6.10. Glucosa sérica en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).

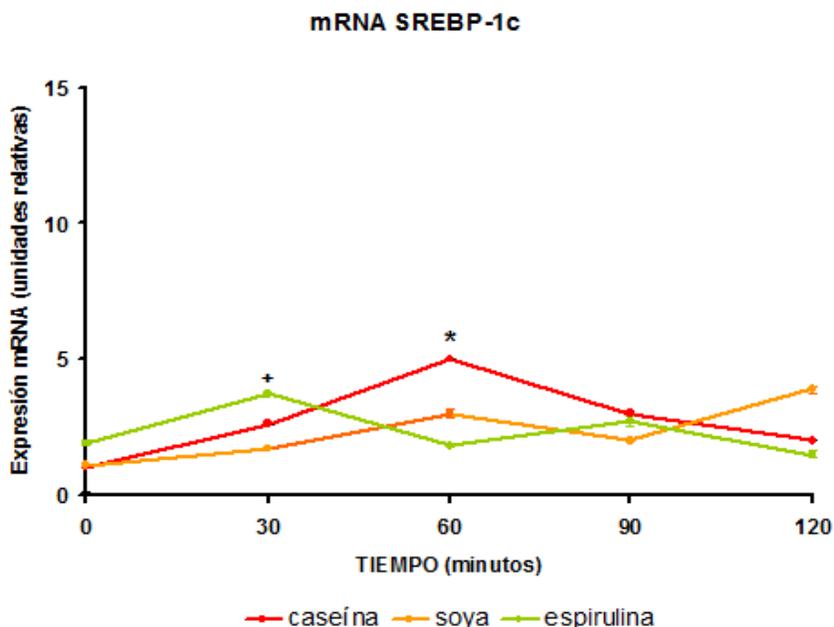


El grupo de ratas que consumió espirulina como fuente de proteína presentó un aumento significativo de glucosa sérica después de los 90 minutos posprandio. A los 120 minutos posprandio el contenido de glucosa sérica es 21% mayor que el de las ratas que consumieron caseína o soya. Este contenido de glucosa sérica se encuentra por arriba del contenido de glucosa sérica normal considerado para esta cepa de roedores por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio en Cuba (León *et al.*, 2011). Las ratas que consumieron caseína o soya mantuvieron niveles constantes de glucosa sérica durante las dos horas posprandio y se mantuvieron dentro del rango normal.

Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la vía de señalización de SREBP-1c.

Como se ha mencionado a lo largo de este estudio, el metabolismo de lípidos está asociado entre otros múltiples factores con el nivel de insulina en la sangre. La vía de señalización del factor de transcripción SREBP-1c es sensible a los cambios hormonales, ya que se ha observado que una baja relación insulina/glucagon produce un estímulo bajo en la lipogénesis (Torres y Tovar, 2007). Por lo anterior, se determinó cómo el perfil de aminoácidos que consumió cada grupo de ratas en este experimento fue capaz de modificar la respuesta en esta vía de señalización a nivel transcripcional y traduccional. Se determinó la expresión de mRNA SREBP-1c en hígado de los tres grupos de ratas en ayuno y a los 30, 60, 90 y 120 minutos posprandio (Gráfica 6.11).

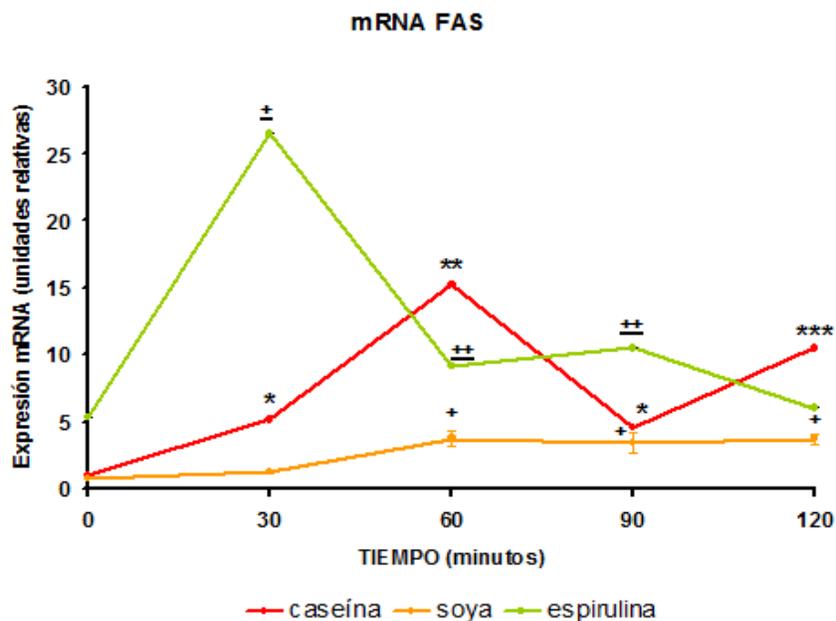
Gráfica 6.11. Expresión de mRNA SREBP-1c en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



Los resultados mostraron significativamente mayor expresión de mRNA SREBP-1c a los 60 minutos posprandio en las ratas que se alimentaron con caseína, 40% más que en las ratas con soya y 60% más que en las ratas con espirulina, mientras que en las ratas que se alimentaron con espirulina la mayor expresión de este gen se observó a los 30 minutos posprandio, 29.7% más que en las ratas con caseína y 54% más que en las ratas con soya. En las ratas alimentadas con soya no hubieron cambios significativos a lo largo del tiempo, aunque se observó la tendencia de acumular mayor cantidad de este mensajero a los 60 y 120 minutos posprandio.

Finalmente en esta vía de señalización se cuantificó el mRNA FAS. La expresión de mRNA FAS se observa en la siguiente gráfica (Gráfica 6.12).

Gráfica 6.12. Expresión de mRNA FAS en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).

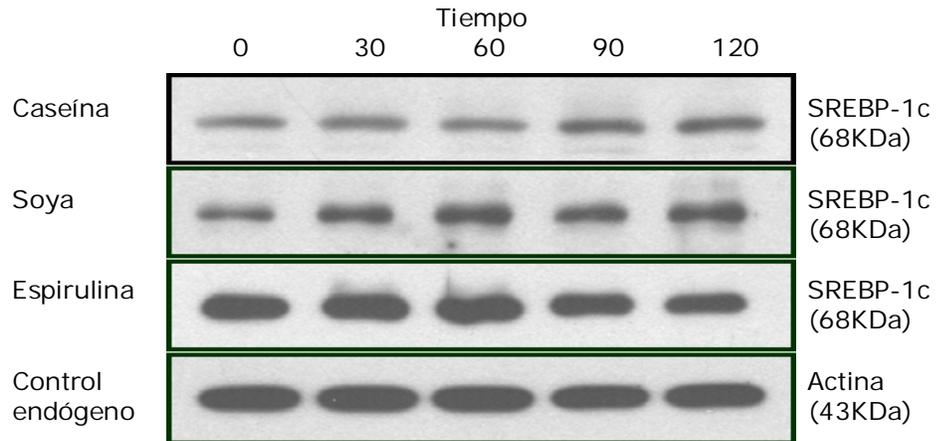


En las ratas que se alimentaron con espirulina se observó un aumento significativo de mRNA FAS desde los 30 minutos posprandio. En las ratas que consumieron caseína también se observó que la concentración de mRNA FAS aumentó significativamente a los 60 minutos posprandio. Para las ratas que consumieron soya se observó que a partir de los 60 minutos posprandio hubo significativamente mayor concentración de mRNA FAS en hígado. La diferencia significativa más grande entre los tres grupos de ratas fue a los 30 minutos posprandio en donde la espirulina genera una concentración de mRNA FAS 80.5% mayor que la caseína y 95.3% mayor que la proteína de soya.

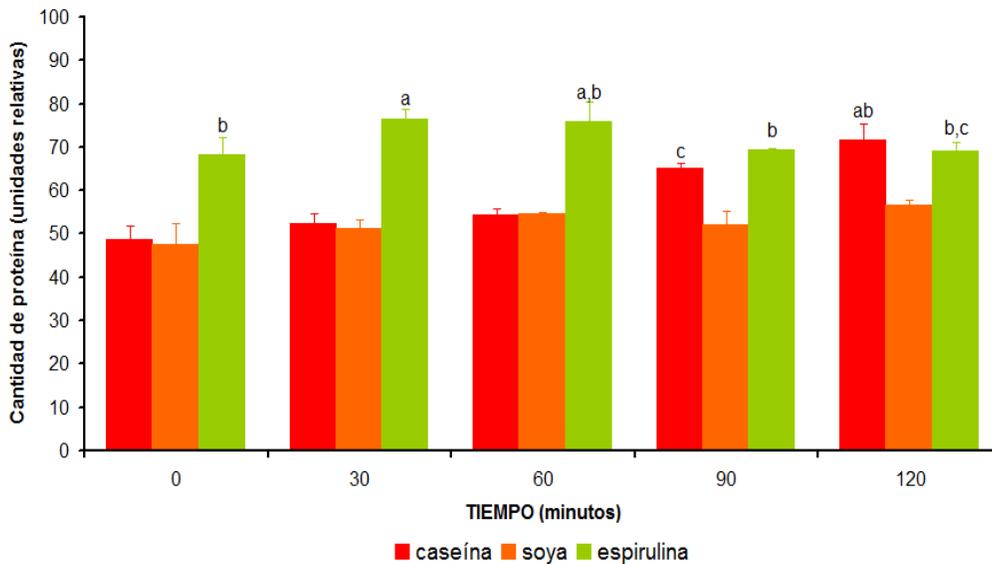
En cuanto a la cantidad de proteína producida de SREBP-1c y FAS en el hígado de estos animales se tuvieron los siguientes resultados.

Gráfica 6.13. Cantidad relativa de proteína SREBP-1c (a) y proteína FAS (b) en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con caseína, soya o espirulina (promedio \pm EE, n=5, sin signo común difieren, $P < 0.05$).

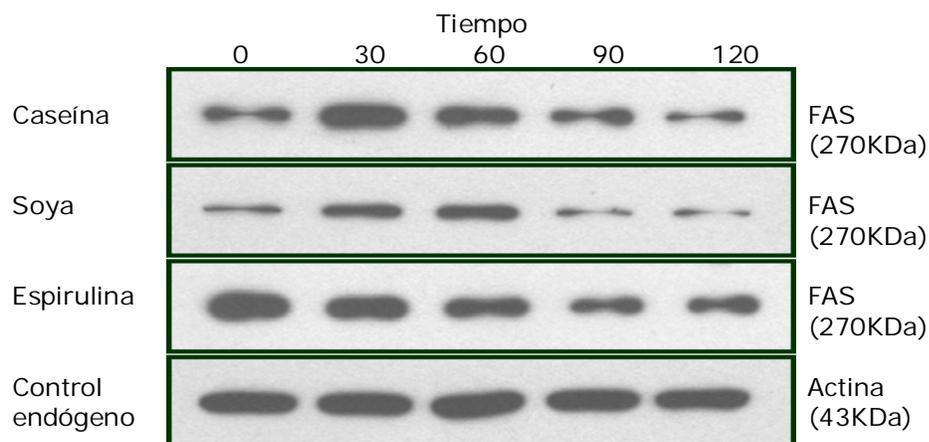
(a) SREBP-1c



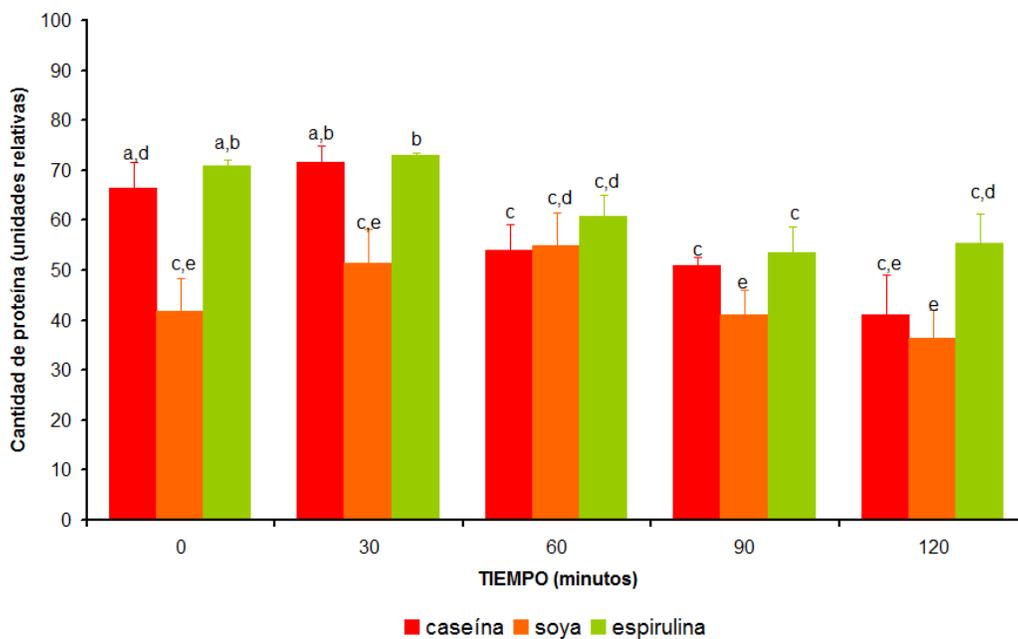
SREBP-1c



(b) FAS



FAS



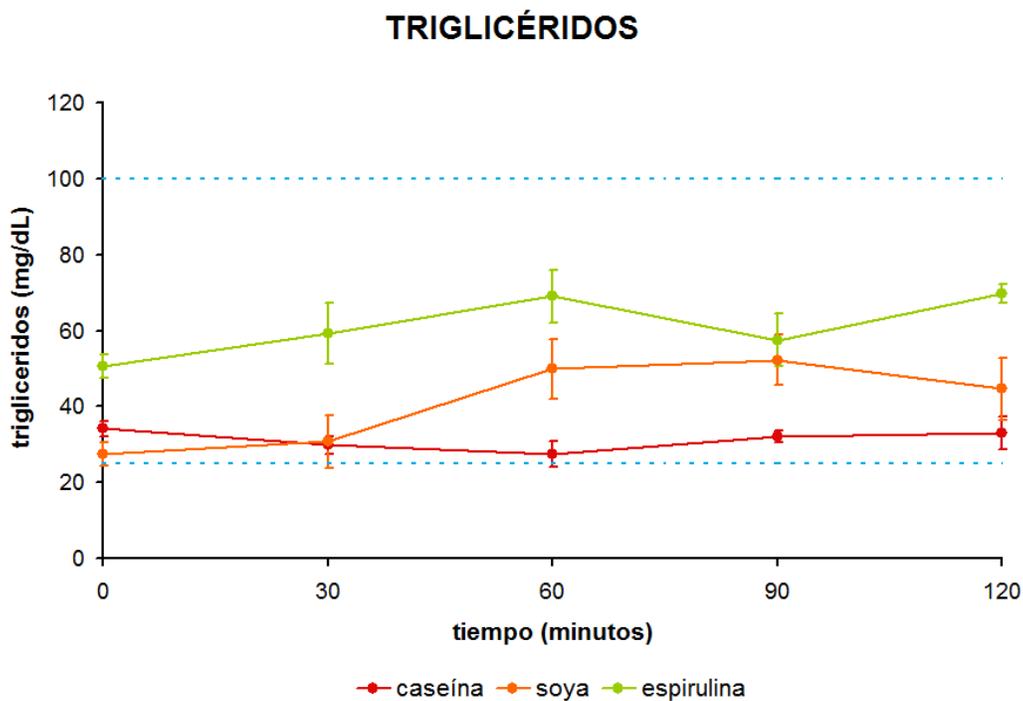
La mayor concentración significativamente de proteína SREBP-1c se observó en las ratas que consumieron espirulina a los 60 y 90 minutos posprandio y en las ratas que consumieron la dieta con caseína a los 120 minutos posprandio, mientras que en las ratas que consumieron proteína de soya no hubo cambios significativos en la concentración de SREBP-1c en el ayuno y durante todo el tiempo de alimentación. A los 30 minutos poprandio la proteína de espirulina genera significativamente 32.9% más cantidad de enzima FAS que las ratas alimentadas con caseína o soya.

Se observó que significativamente la mayor acumulación de la enzima FAS se dio en el ayuno y a los 30 minutos posprandio en las ratas que consumieron espirulina y caseína. En las ratas que consumieron soya también hubo significativamente mayor concentración de FAS durante los primeros 60 minutos posprandio. Sin embargo, la diferencia entre las ratas con espirulina y caseína es 28.5% mayor que las ratas con soya a los 30 minutos posprandio.

Finalmente, para el análisis de la vía lipogénica se determinó la concentración de triglicéridos y colesterol en suero, ya que en algunos estudios se ha observado cómo el consumo de proteína dietaria tiene efectos benéficos en la concentración de lípidos circulantes (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008 y Wang *et al.*, 2003).

A continuación se presenta una gráfica con los resultados obtenidos de triglicéridos en el suero de las ratas que fueron alimentadas con las tres diferentes fuentes de proteína:

Gráfica 6.14. Triglicéridos séricos en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).

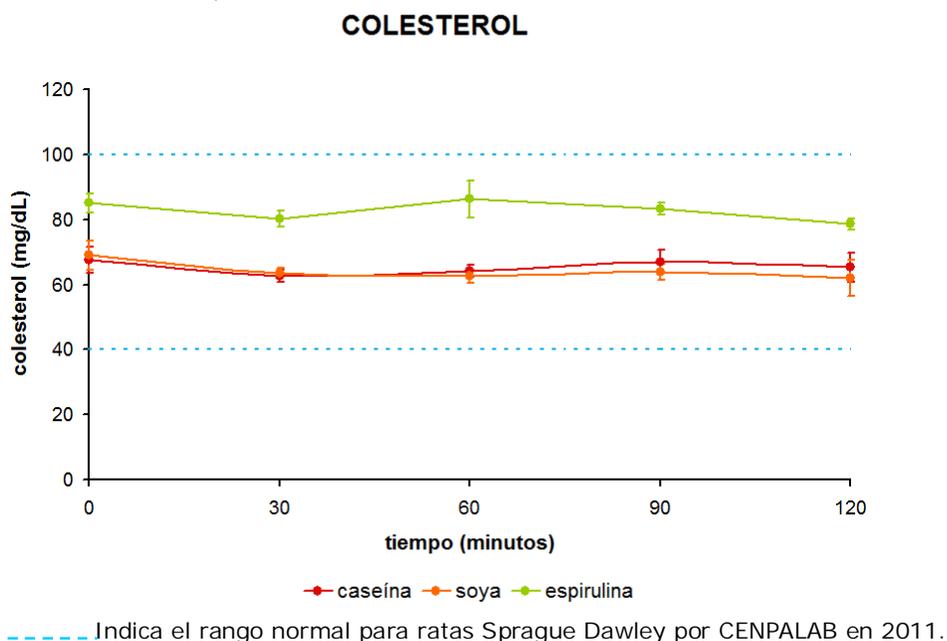


----- Indica el rango normal para ratas Sprague Dawley por CENPALAB en 2011.

Los triglicéridos en el suero de las ratas de todos los grupos se mantuvieron sin cambios significativos desde el ayuno y durante las dos horas posprandio. Las ratas que consumieron espirulina tuvieron significativamente mayor acumulación de triglicéridos en suero al minuto 30, 60 y 120 después de su alimentación en relación con las ratas con caseína o soya. Existe diferencia significativa entre los tres grupos de ratas al minuto 60 posprandio, en el cual las ratas que consumieron espirulina presentan 27.7% más contenido de triglicéridos séricos que las ratas que consumieron soya y 60.2% más que las ratas que consumieron caseína. Sin embargo, todos los valores de concentración se situaron dentro del rango normal considerado para esta cepa de roedores por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio en Cuba (León *et al.*, 2011).

Por otro lado se determinaron los niveles de colesterol en suero para estos grupos (Gráfica 6.15).

Gráfica 6.15. Colesterol sérico en ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).

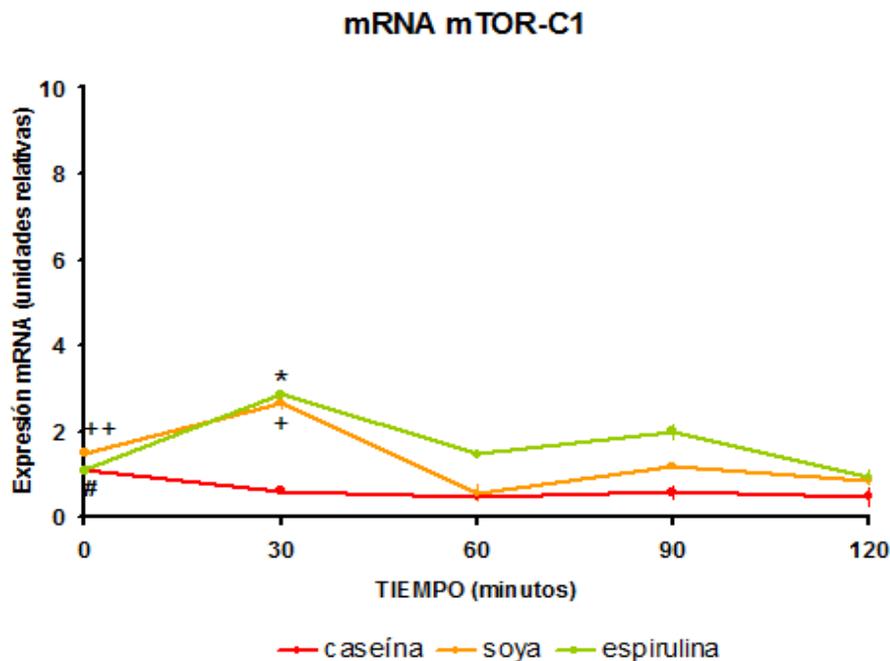


El colesterol en el suero de las ratas de todos los grupos se mantuvo sin cambios significativos desde el ayuno hasta las dos horas posprandio. Las ratas que consumieron espirulina concentraron significativamente 27.3% más cantidad de colesterol en la sangre que las ratas que consumieron soya o caseína. Todos los valores de concentración están dentro del rango normal considerado para esta cepa de roedores (León *et al.*, 2011).

Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la vía de señalización de mTOR-C1.

A continuación se presentan los resultados de la expresión de mRNA mTOR-C1 en el hígado de las ratas que fueron alimentadas con las tres diferentes fuentes de proteína (Gráfica 6.16). Como se ha mencionado con anterioridad, el complejo 1 mTOR se regula por diferentes mecanismos, los cuales aún no se conocen con profundidad ya que en ellos se integran señales tanto intracelulares como extracelulares que regulan el crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Laplante y Sabatini, 2009). Por lo anterior la actividad de este complejo se determinó a partir de la fosforilación de la proteína P70S6K, en la Treonina 389 (Gráfica 6.17), la cual es una proteína que señala a varios componentes de la maquinaria traduccional y es allí precisamente donde mTOR-C1 regula esta cascada de señalización después de la ingestión de proteína (Balange *et al.*, 2001 y Long *et al.*, 2000). ¿De qué manera los aminoácidos pueden ejercer este efecto? Es una pregunta que aún no se conoce con profundidad.

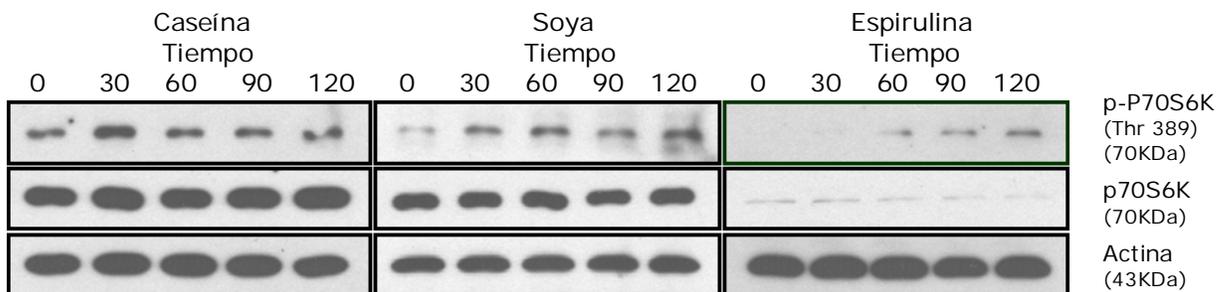
Gráfica 6.16. Expresión de mRNA mTOR-C1 en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



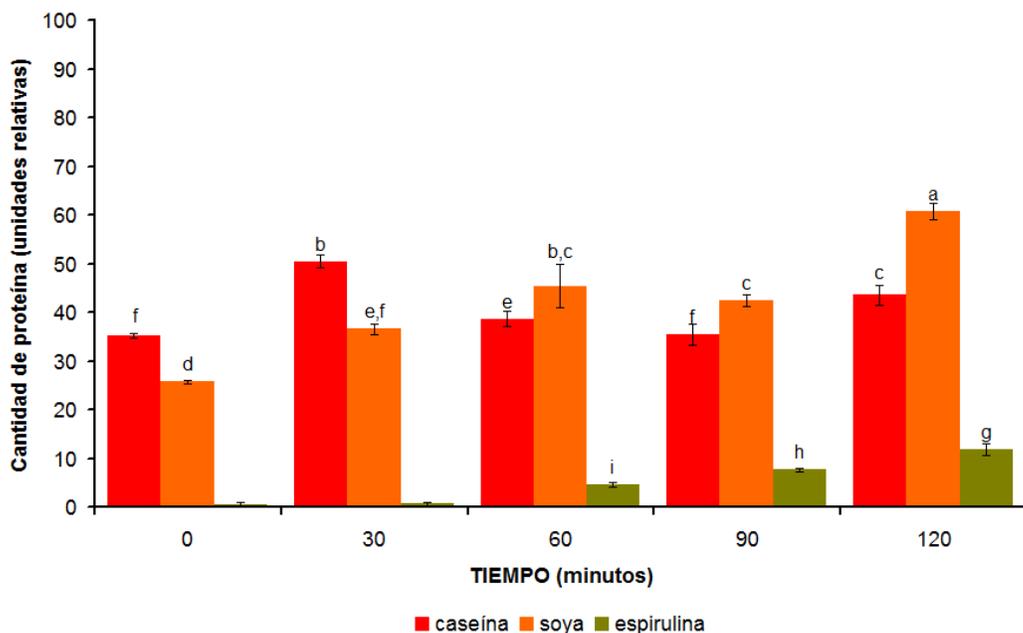
En la gráfica anterior se observó que en las ratas que consumieron espirulina hubo un aumento significativo en la expresión de mRNA mTOR-C1 a los 30 minutos posprandio, después la expresión bajó y se mantuvo sin cambios, lo mismo ocurrió en las ratas que consumieron proteína de soya y en el caso de las ratas que consumieron caseína hubo un descenso significativo en la concentración del mRNA mTOR-C1 una vez que iniciaron su alimentación y se mantuvo constante a lo largo de dos horas. La expresión de este gen fue significativamente mayor para las ratas que consumieron espirulina y soya a los 30 minutos, 80% más que para las ratas que consumieron caseína.

En cuanto a la fosforilación de P70S6K se presentan a continuación los siguientes resultados:

Gráfica 6.17. Cantidad relativa de proteína p-P70S6K en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con caseína, soya o espirulina (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



p-P70S6K

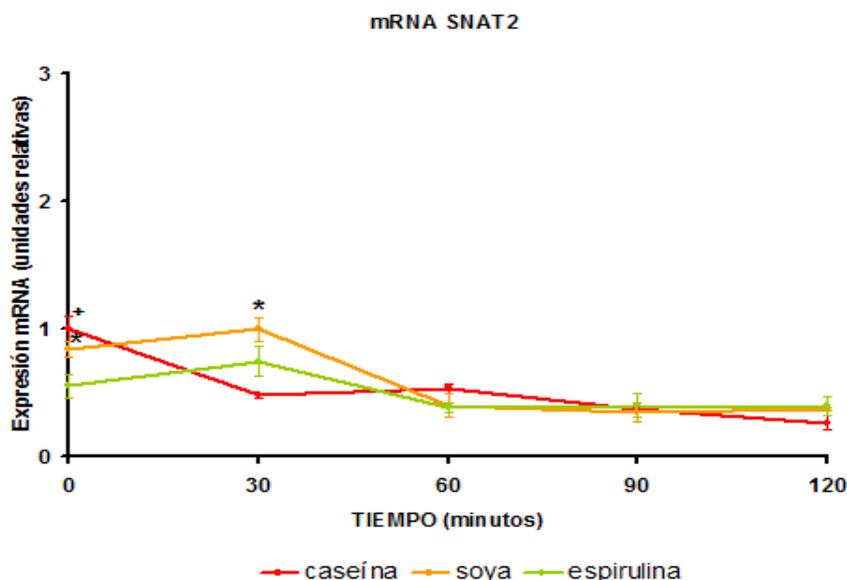


En estos resultados se observó que las ratas que fueron alimentadas con espirulina presentaron significativamente una menor cantidad de proteína P70S6K fosforilada e incluso se observó en los resultados por Western blot que la proteína P70S6K total también se encontró en menor cantidad en comparación con la cantidad de proteína de las ratas que fueron alimentadas con soya o caseína. A los 120 minutos después de alimentarse el contenido de p-P70S6K en las ratas que consumieron soya es 27.4% mayor que en las ratas que consumieron caseína y 77.4% mayor que en las ratas que consumieron espirulina. La fosforilación de P70S6k fue en aumento significativamente desde el ayuno hasta las dos horas posprandio en el grupo con espirulina, lo mismo sucedió en las ratas que consumieron soya y para las ratas que consumieron caseína la mayor acumulación de p-P70S6K se dio a los 30 minutos posprandio. Cabe mencionar que en cuanto al perfil de aminoácidos presente en las dietas, la espirulina presentó niveles más bajos de todos los aminoácidos indispensables entre los cuales se encuentra la leucina, el cual se cree que es un activador potente en esta vía de señalización.

Efecto del perfil de aminoácidos de la proteína dietaria sobre la expresión del transportador SNAT2.

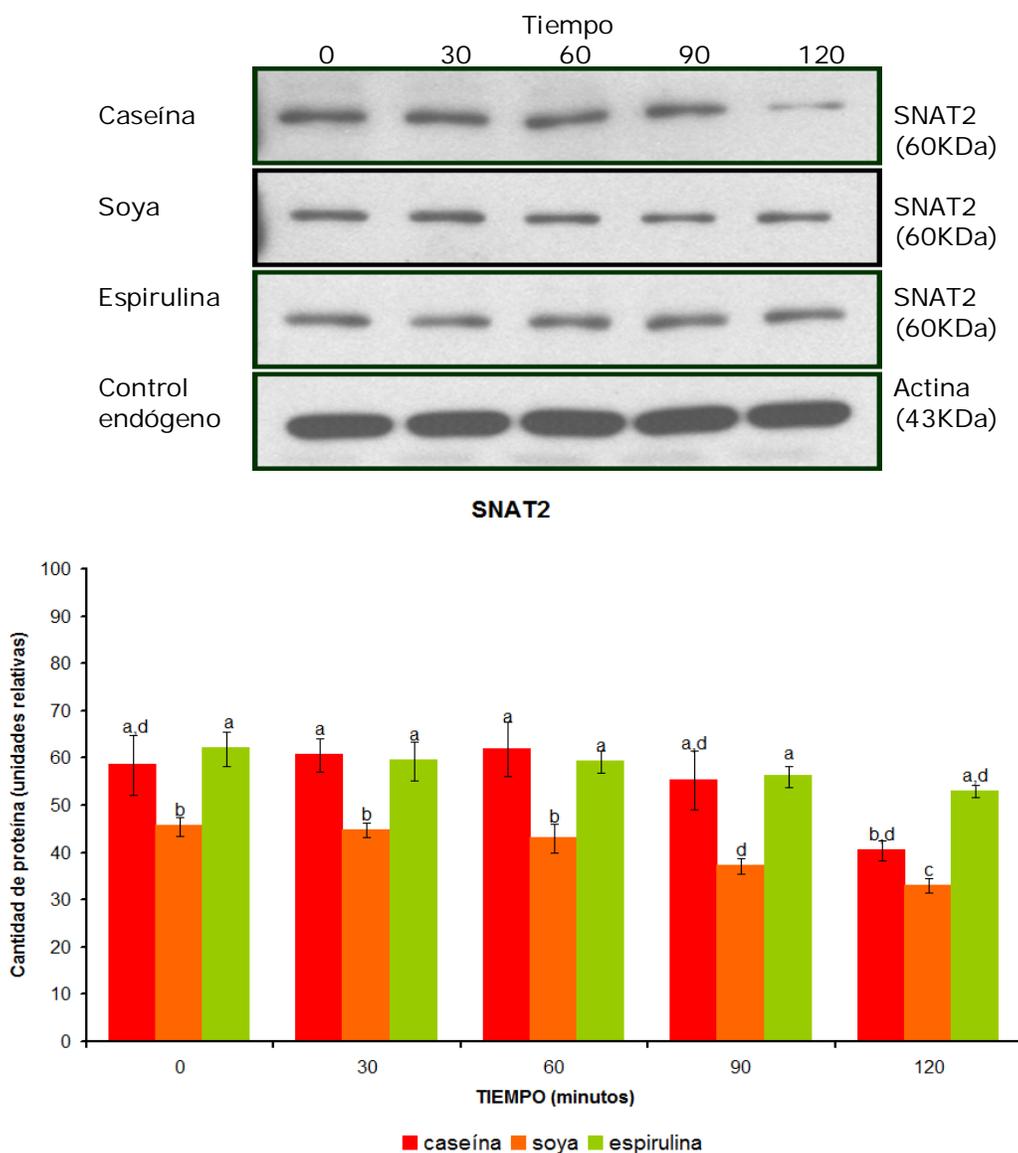
A continuación se presentan los resultados de la expresión de mRNA SNAT2 (Gráfica 6.18) y la cantidad de proteína SNAT2 (Gráfica 6.19) presente en los hepatocitos de las ratas que fueron alimentadas con espirulina, soya o caseína. El transportador SNAT2 es de particular interés debido a que se cree que puede sensar la suficiencia o deficiencia de aminoácidos en la poza intracelular, además se ha reportado que ante la carencia de aminoácidos se traduce eficientemente a pesar de la reducción de la síntesis de proteína (Gaccioli *et al.*, 2006) y finalmente la relación que tiene con otras vías de señalización es una cuestión abierta al análisis exhaustivo.

Gráfica 6.18. Expresión de mRNA SNAT2 en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con diferentes fuentes de proteína (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



En general para la expresión de mRNA SNAT2 se observan curvas que van de una mayor expresión a una menor expresión conforme transcurre el tiempo de alimentación. Este cambio fue significativo para el grupo que consumió soya y caseína ya que en el grupo que consumió espirulina se observó esta misma tendencia pero no hubo cambios significativos. Entre los tres grupos sólo hubo diferencia significativa a los 30 minutos posprandio, donde se observó que las ratas que consumieron proteína de soya tuvieron 25.2% más contenido de mRNA SNAT2 que las ratas que consumieron espirulina y 52.5% más que las ratas que consumieron caseína.

Gráfica 6.19. Cantidad relativa de proteína SNAT2 en hígado de ratas en ayuno y durante 2 horas después de ser alimentadas con caseína, soya o espirulina (promedio \pm EE, $n=5$, sin signo común difieren, $P<0.05$).



El contenido de proteína de SNAT2 en las ratas que consumieron espirulina se mantuvo sin cambios significativos desde el ayuno hasta las dos horas posprandio. En las ratas que consumieron soya hubo un descenso significativo de la cantidad de proteína de SNAT2 a partir de los 90 minutos posprandio y para las ratas que consumieron caseína este mismo cambio se dio hasta los 120 minutos posprandio. La cantidad de esta proteína se observó muy similar entre los tres grupos en los resultados del Western blot, sin embargo es estadísticamente significativo que las ratas que consumieron soya tuvieron alrededor de 25% menos contenido de SNAT2 que las ratas que consumieron espirulina o caseína.

7. DISCUSIÓN

Se observó que la proteína de espirulina, procedente de Solarium Biotechnology de Chile, fue deficiente en todos los aminoácidos indispensables, principalmente en lisina (47.2% del requerimiento, FAO/OMS/UNU, 1985). Otra de las dietas que se probó contenía proteína de soya en la cual los aminoácidos limitantes fueron los aminoácidos azufrados (83.6% del requerimiento FAO/OMS/UNU, 1985). En la última dieta, que se utilizó como control, se agregó proteína de origen animal que no es deficiente en ningún aminoácido: caseína.

De acuerdo con lo anterior, las ratas que se alimentaron con espirulina tuvieron significativamente menor ganancia de peso a lo largo de los 21 días de alimentación, a pesar de que ganaron peso más rápido en los últimos 9 días comparadas con las ratas que se alimentaron con caseína o soya. Las ratas que se alimentaron con caseína obtuvieron significativamente mayor peso al final del experimento en comparación con las ratas que se alimentaron de soya o espirulina. Cabe destacar que las ratas que consumieron soya y caseína, en el día 6 y 7 de alimentación, detuvieron su crecimiento, pero las ratas que consumieron espirulina después del día 5 y hasta el día 15 no sólo dejaron de crecer sino que perdieron peso. Esto indica que las ratas con dieta de espirulina estuvieron en estado de balance negativo de nutrimentos por 10 días, lo que generó desnutrición en este grupo.

En el consumo de alimento no existe diferencia significativa entre las ratas que consumieron espirulina, soya o caseína durante la última semana de alimentación, lo cual implica que la diferencia de tamaño entre los tres grupos de ratas al final del experimento no se debe a la cantidad de alimento que consumieron.

La velocidad de crecimiento de un animal, bajo condiciones definidas, proporciona una forma relativamente simple de medir el valor de las proteínas de la dieta. Cuando existe una deficiencia prolongada de uno o más de los aminoácidos indispensables, el crecimiento se reduce o se detiene completamente (Canfield y Chytil, 1978). Con estos resultados es evidente que la espirulina al ser una proteína deficiente en aminoácidos indispensables compromete el crecimiento óptimo de las ratas por lo que se puede catalogar como una proteína de mala calidad nutrimental.

A continuación se discute el efecto del perfil de aminoácidos presente en cada una de las dietas sobre la vía de señalización de SREBP-1c en el hígado de ratas.

Como se ha mencionado a lo largo de este estudio, generalmente las proteínas de origen vegetal son ricas en arginina y deficientes en lisina (Kritchevsky, 1976), esto provoca que la relación lisina/arginina sea baja (≤ 2). Además estas proteínas favorecen la secreción de glucagon preferentemente sobre la secreción de insulina por lo que la relación insulina/glucagon se mantiene en un nivel más bajo del que se produce con el consumo de proteínas de origen animal (Torres y Tovar, 2007). Particularmente esto se ha asociado con una baja activación de la lipogénesis a través del factor de transcripción SREBP-1c y la enzima FAS en el hígado de ratas (Ascencio *et al.*, 2004). El resultado de estos eventos se observa en la disminución de lípidos circulantes, triglicéridos y colesterol sérico (Wang *et al.*, 2003) y no se aprecia algún daño por acumulación de grasa en el tejido hepático o en los adipocitos, los cuales se mantienen funcionales (Torre-Villalvazo *et al.*, 2008). El efecto de la proteína vegetal que se ha descrito se observa a continuación esquemáticamente (Figura 7.1).



Figura 7.1. Efecto de la proteína vegetal sobre el metabolismo lipídico a través de SREBP-1c en el hígado de ratas. Fuentes: Kritchevsky, 1976; Torres y Tovar, 2007; Ascencio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003; Torre-Villalvazo *et al.*, 2008.

Las tres fuentes de proteína que se probaron en este estudio fueron: espirulina, soya y caseína. Cada una de estas fuentes de proteína presenta un perfil de aminoácidos particular, el cual se ilustró en la Tabla 6.2, a continuación se presenta nuevamente esta tabla con el fin de facilitar el análisis de estos resultados.

Tabla 6.2. Aminoácidos limitantes y deficientes de las diferentes fuentes de proteína.

aa	aa indispensables									aa dispensables						
	Trp	His	Cys+Met	Ile	Thr	Val	Lys	Tyr+Phe	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Pro
CAS																
SOY																
ESP																

■ limitante ■ deficiente ■ valor más alto

El valor de la relación lisina/arginina en la proteína de la espirulina (0.6) fue el más bajo en comparación con el valor que se encontró en la proteína de soya (0.8) y en la caseína (2.1). Se considera que un valor mayor o igual a 2 es alto para la relación lisina/arginina.

Se ha reportado que el patrón de aminoácidos en la dieta estimula de manera diferente la secreción de insulina (Ascencio *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos de insulina sérica en las ratas de este estudio, después de una hora posprandio confirmaron lo anterior, ya que en este tiempo se observaron diferencias significativas en los tres grupos. La caseína generó una secreción de insulina tres veces mayor de lo que lo hizo la proteína de soya y sólo 0.5 veces más alta de lo que se generó para la espirulina. Estos resultados son congruentes con las observaciones realizadas por el grupo de Tovar y colaboradores en 2004, en donde ratas con dieta a base de caseína mantienen niveles más elevados de insulina en comparación con ratas alimentadas con proteína de soya. En otro estudio del mismo grupo de investigadores, pero en 2007, se observó que en islotes pancreáticos incubados con un patrón de aminoácidos similar al de la proteína de soya, la secreción de insulina es significativamente menor que los incubados con el patrón de aminoácidos proveniente de la caseína (Noriega-López *et al.*, 2007). La mayor concentración de insulina sérica en las ratas que fueron alimentadas con caseína se puede explicar con el hecho de que la caseína tiene mayor contenido de aminoácidos de cadena ramificada: leucina, isoleucina y valina, a diferencia de la espirulina que es deficiente en leucina y valina, ya que como lo observaron May y Buse (1989) estos aminoácidos estimulan la producción de insulina.

Como se explicó antes, el aumento de glucosa en la sangre provoca la secreción de insulina y debido a la captación acelerada de glucosa sanguínea, la concentración de glucosa en sangre disminuye hasta niveles normales y también disminuye la liberación de insulina (Nelson *et al.*, 2000 y Benyon, 2003). Sin embargo la relación directa entre la concentración de glucosa en sangre y la secreción de insulina no se correlacionó totalmente en los resultados que se obtuvieron en este estudio. Mientras que las ratas que consumieron espirulina presentaron un aumento significativo de glucosa a partir de los 90 minutos posprandio, su nivel de insulina en la sangre aumentó desde los 30 minutos posprandio y se mantuvo constante. En las ratas que consumieron caseína, su concentración de glucosa sérica se mantiene sin cambios significativos, sin embargo en su concentración de insulina sérica presentaron un aumento significativo desde los 30 minutos posprandio. En las ratas que consumieron soya, tanto la concentración de glucosa como la concentración de

insulina en sangre se mantuvieron sin cambios significativos a lo largo de las dos horas posprandio.

Por otro lado, en cuanto a la secreción de glucagon se observó que las ratas que fueron alimentadas con caseína, después de una hora posprandio, generaron significativamente una concentración mayor de glucagon sérico que lo que se generó en las ratas que consumieron espirulina o soya. Se esperaba que las ratas alimentadas con la proteína vegetal acumularan mayor concentración de glucagon en la sangre y por otro lado estos datos no se correlacionan como se esperaba con los resultados de insulina sérica, ya que se sabe que la secreción de insulina y glucagon es alterna debido a que producen efectos opuestos en el hígado (Saltiel y Kahn, 2001). En este caso, las ratas que consumieron caseína presentaron la mayor concentración de insulina sérica y también la mayor concentración de glucagon sérico después de 60 minutos posprandio.

Posteriormente se determinó la relación insulina/glucagon. A los 30 minutos posprandio, a pesar de que las ratas que consumieron espirulina tuvieron la menor relación lisina/arginina, presentaron el valor más alto en la relación insulina/glucagon (0.02). Se debe tomar en cuenta que las ratas que consumieron esta dieta se encontraban en recuperación del estado de desnutrición en el que se mantuvieron al menos por 10 días, lo cual seguramente generó una serie de modificaciones metabólicas para regular su funcionamiento celular. Es por esto que la alta relación insulina/glucagon, comparada con los grupos de soya o caseína, no puede ser consecuencia directa únicamente de la relación lisina/arginina.

A pesar de que no hay cambios significativos desde el ayuno y durante el periodo de alimentación, se puede distinguir la tendencia de mayor valor para la relación insulina/glucagon en el grupo que consumió espirulina a los 30 minutos posprandio. Este pico en la curva concuerda con un aumento significativo de la expresión génica de SREBP-1c, tanto en mRNA como en proteína. De igual manera esta tendencia se reflejó en la expresión génica de FAS, ya que el mRNA FAS se encontró significativamente en mayor cantidad a los 30 minutos posprandio en el hígado de las ratas que consumieron espirulina y el nivel de proteína FAS también fue significativamente mayor en el ayuno y a los 30 minutos posprandio. Esto indica que la proteína de espirulina al tener un contenido de aminoácidos indispensables mas bajo, que el de la caseína o la proteína de soya, propició un estado de desnutrición que en conjunto con el aumento de la relación insulina/glucagon en el minuto 30 después de su alimentación favoreció la lipogénesis, esto pudo contribuir

a que las ratas de esta dieta tuvieron significativamente mayor concentración de triglicéridos y colesterol en suero. Se sabe que la lisina y la metionina son precursores para la síntesis de carnitina, la cual es responsable del transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria para su ulterior oxidación (Devlin, 2008). Por esta razón, si la proteína de espirulina es deficiente en estos aminoácidos se puede explicar porque la mayor acumulación de triglicéridos en la circulación sanguínea se dio en este grupo de ratas.

Cuando hay una expresión elevada y prolongada de FAS, se corre el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la acumulación de lípidos como la esteatosis hepática (Liu *et al.*, 2010). Sin embargo, la histología del tejido hepático de las ratas que consumieron espirulina mostró que no hubo daño en el hígado por acumulación de grasa, a pesar de la elevada expresión de FAS en estas células y en los adipocitos, se tiene una morfología propia de animales sanos, con adipocitos pequeños y funcionales.

En el grupo de ratas que consumió caseína hubo un aumento significativo en la concentración de insulina a los 60 minutos posprandio, esto se correlacionó con el aumento significativo en la expresión del mRNA SREBP-1c y mRNA FAS a los 60 minutos posprandio. En cuanto al contenido de proteína de SREBP-1c el aumento de su concentración es significativo hasta los 90 minutos posprandio, y para la proteína FAS es significativamente mayor en el ayuno y a los 30 minutos posprandio. Se debe tener en cuenta que los niveles de expresión de mRNA no siempre correlacionan con la concentración de proteína, debido a la vida media del mRNA y al procesamiento que conlleva, en este caso para SREBP-1c, involucra que tiene que migrar al núcleo y sufrir cortes proteolíticos hasta llegar a ser maduro (Vernia-Miralles, 2007).

Estos resultados son congruentes desde el punto de vista de que las proteínas de origen animal favorecen la secreción de insulina y esto repercute directamente en el aumento de la lipogénesis a través de SREBP-1c. Cabe señalar que la caseína, en este estudio, tuvo un contenido más elevado de cisteína y metionina que la soya o la espirulina. Esto se reflejó en la mayor acumulación de homocisteína encontrada en el suero de las ratas que consumieron caseína. Se ha reportado que la acumulación de este metabolito en suero favorece la metilación de sitios promotores de SREBP-1c activando de esta manera la vía lipogénica, es por eso que los niveles elevados de homocisteína en sangre contribuyen al desarrollo de hipercolesterolemia en animales de laboratorio (Blachier *et al.*, 2010). Sin embargo,

durante el periodo de tiempo que duró este experimento, estos datos no se correlacionan con la concentración de triglicéridos o colesterol sérico de las ratas que consumieron caseína ya que las concentraciones de estos lípidos en el suero se mantuvieron sin cambios significativos y dentro del rango normal considerado para esta cepa de roedores (León *et al.*, 2011). A través del análisis histomorfológico en este grupo de ratas se observó que el hígado y el tejido adiposo tuvieron morfología propia de animales sanos.

En cuanto a las ratas que consumieron soya, la concentración de insulina en sangre tuvo la tendencia a permanecer más baja en comparación con las ratas que se alimentaron con espirulina o caseína. Estos resultados también muestran que la soya fue la proteína menos lipogénica ya que tanto la expresión de mRNA FAS como la cantidad de proteína de SREBP-1c y FAS se mantuvieron por debajo de las curvas de caseína y espirulina. Este efecto se puede asociar con el hecho de que la proteína de soya fue deficiente en cisteína y metionina y su contenido de ácido glutámico (glutamato en su forma ionizada) fue 50% menor que en la caseína, ya que como lo señalaron Dudek y Semenkovich, de la Universidad de Washington, la restricción de cisteína y glutamato en células humanas HepG2 disminuyeron el inicio de la transcripción y la expresión de FAS, lo cual ayuda a explicar la menor expresión de esta enzima en las ratas que consumieron proteína de soya. En este grupo de ratas no se observa que haya acumulación de lípidos en hepatocitos y el mayor porcentaje de adipocitos se encontró en el intervalo de tamaño de 500 a 1000 μm^2 , lo que indica adipocitos pequeños y más funcionales.

Los efectos benéficos de la proteína de soya no sólo se han atribuido a su perfil de aminoácidos ya que la planta de soya sintetiza una serie de compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Los flavonoides más abundantes en la soya son las isoflavonas: genisteína y dadzeína (Zhang *et al.*, 2007). Las isoflavonas se asocian fuertemente a la proteína y su concentración en aislados de proteína de soya es aproximadamente de 2 mg/g de proteína. Al hablar de flavonoides Peluso (2006) observa que diferentes tipos de flavonoides *in vitro* presentan un claro efecto dislipidémico pero en la mayoría de los casos este efecto no se ha observado *in vivo*.

A continuación se discute el efecto del perfil de aminoácidos presente en cada una de las dietas sobre la vía de señalización de mTOR-C1 en el hígado de ratas.

Se sabe que los aminoácidos son activadores de mTOR-C1 (Kim, 2009) En los últimos años se ha propuesto que lo hacen a través de las proteínas Rag GTPasas (Laplante y Sabatini, 2012). Recientemente también se ha profundizado en como la insulina también activa a mTOR-C1 a través de la ruta PI3K/AKT ya que AKT fosforila al complejo TSC1/2 y lo disocia de la superficie lisosomal donde reside Rheb y mTOR-C1. De esta manera GTP-Rheb permanece activo y unido a mTOR-C1. Se ha propuesto que la activación de mTOR-C1 se da sólo cuando estas dos señales se integran. Sin embargo, el mecanismo unificado de cómo rutas independientes afectan el reclutamiento espacial de mTOR-C1 es desconocido (Menon *et al.*, 2014 y Wang *et al.*, 2015). mTOR-C1 activado estimula la actividad de P70S6K, por fosforilación en la Thr 389, lo que resulta en la activación de la maquinaria traduccional (Ma y Blenis, 2009). A continuación se presenta un esquema de este proceso (Figura 7.2).

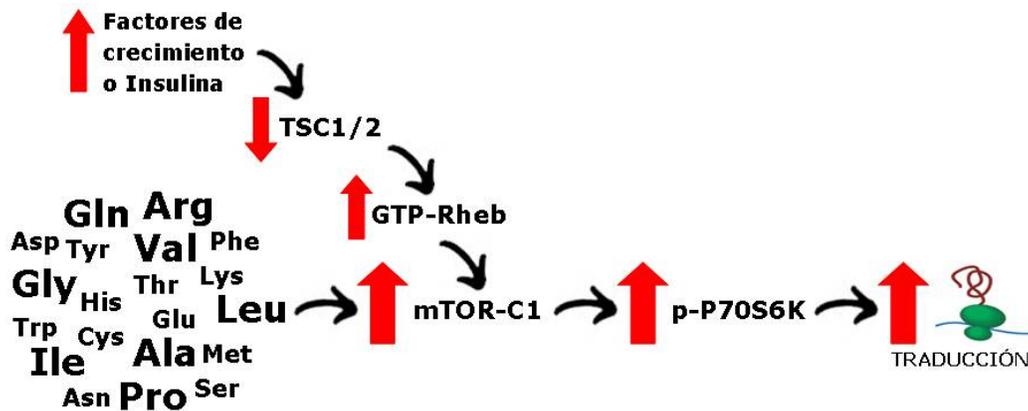


Figura 7.2. Efecto del perfil de aminoácidos sobre la vía de señalización de mTOR-C1 en el hígado de rata. Fuentes: Kim, 2009; Ma y Blenis, 2009; Nicklin *et al.*, 2009; Mortimore *et al.*, 1991; Bohe *et al.*, 2003; Menon *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015.

La activación de la vía de señalización de mTOR-C1 es fácilmente abordada a través de las proteínas que fosforila, en este caso a través de la fosforilación de P70S6K la cual se ha observado que es la señal más significativa cuando se quiere analizar el efecto de los aminoácidos.

En estos resultados es evidente que en las ratas que consumieron espirulina la fosforilación de P70S6K se da significativamente en mucho menor grado a

comparación de las ratas que consumieron caseína o soya. Esto se puede explicar fácilmente a partir del perfil de aminoácidos que presentó la espirulina comparada con caseína o con la proteína de soya. En la dieta con espirulina hay menor contenido de aminoácidos como: leucina (39.27% menor que el contenido en caseína), ácido glutámico (54.91% menor que el contenido en caseína), isoleucina (31.79% menor que el contenido en caseína) y valina (38.44% menor que el contenido en caseína), los cuales se han estudiado como principales activadores del complejo 1 de mTOR. Sin embargo, análisis *in vivo* han destacado el papel de otros aminoácidos fuera de la célula, por ejemplo: alanina, glicina, prolina (Mortimore *et al.*, 1991; Bohe *et al.*, 2003) y arginina (Wang *et al.*, 2015). Se ha visto que la señalización de mTOR-C1 se inhibe fuertemente en cultivos celulares, bajo condiciones de carencia de nutrimentos y la reconstitución de estos medios con aminoácidos pudo dramáticamente estimular la actividad de mTOR-C1 (Jacinto y Hall, 2003; Hay y Sonenberg, 2004). Se ha probado que la leucina, un aminoácido indispensable requerido para la activación de mTOR-C1, se transporta dentro de las células en un modo dependiente de glutamina (Nicklin *et al.*, 2009). En los últimos años se ha destacado el papel de la enzima leucil-tRNA sintetasa (LRS) como mediador en la señalización de mTOR-C1 a través de su unión a proteínas Rag GTPasas. Mutaciones de LRS en su dominio de unión a leucina otorga a la ruta de mTOR-C1 insensibilidad a los niveles de aminoácidos intracelulares (Han *et al.*, 2012). En otro estudio se señala que mTOR-C1 puede ser regulado por glutamina de una manera independiente de las proteínas Rag GTPasas (Jewel *et al.*, 2015).

Las Rag GTPasas y Rheb tienen papeles esenciales pero distintos en la ruta de activación de mTORC1. Con las Rags se controla la localización subcelular de mTOR-C1 y Rheb estimula su actividad cinasa (Laplanche y Sabatini, 2012). Los aminoácidos activan las Rag GTPasas con lo que se recluta a mTOR-C1 a la superficie lisosomal (Sancak *et al.*, 2008 y Kim *et al.*, 2008). Rheb también se localiza en la superficie lisosomal y tras el estímulo de factores de crecimiento o insulina se inhibe el complejo TSC1/2 y de esta manera se activa Rheb (Menon *et al.*, 2014). Así las Rag y Rheb convergen en el lisosoma transmitiendo dos señales a un detector que seguramente activa a mTOR-C1 sólo cuando ocurren ambos eventos (Wang *et al.*, 2015). En estos resultados se observa que la espirulina a pesar de que generó mayor secreción de insulina que la proteína de soya, a los 60 minutos posprandio, las ratas que consumieron esta dieta produjeron menor cantidad de p-P70S6K. Lo que significa que cuando la rata está consumiendo la dieta con espirulina, debido a la deficiencia de aminoácidos, se abate la síntesis de proteína y se favorece la vía lipogénica (Peterson *et al.*, 2011; Chakrabarti *et al.*,

2010). En el caso particular de las ratas que consumieron caseína es congruente el hecho de que en la caseína hay cantidades más elevadas de la mayoría de los aminoácidos y además fue en estas ratas donde se observó el mayor aumento en la concentración de insulina sérica, lo cual se puede relacionar con la alta fosforilación de P70S6K que mostró este grupo de ratas. Se ha probado que Rheb no activa a mTOR-C1 aunque esté unida a él, cuando hay deficiencia de aminoácidos (Chiang y Abraham, 2005). Es así como la actividad de este complejo puede estar obedeciendo al tipo y cantidad de los aminoácidos que se encuentran presentes en la dieta, ya que una proteína muy deficiente en aminoácidos no activa de manera eficiente la síntesis de proteína a través de mTOR-C1.

En los resultados de la cuantificación de mRNA mTOR-C1 se observó que en las ratas que consumieron espirulina y soya la mayor expresión se da en el ayuno y a los 30 minutos posprandio y en las ratas que consumieron caseína se observa significativamente la mayor expresión de mRNA mTOR-C1 en el ayuno. Estos resultados contrastan con lo que se observó en la fosforilación de P70S6K lo cual hace pensar que el complejo 1 mTOR al interactuar con varias subunidades, al integrar diferentes señales y al estar regulado de diferentes maneras se vuelve una proteína de difícil acceso para su análisis y la respuesta que produce no siempre es reflejo de su actividad. A pesar de esto se determinó la presencia de este mensajero debido a que falta mucha información para detallar el funcionamiento de la vía de señalización de mTOR-C1.

En la proteína de espirulina y soya se encontraron niveles más altos de arginina en comparación de lo que hay en la caseína, esto puede estar relacionado con el hecho de que en las ratas que consumieron estas dietas se encuentre una cantidad mayor de mRNA mTOR-C1. En un artículo muy reciente publicado por el grupo de Wang y Sabatini, en el Instituto Tecnológico de Massachusetts, se probó que SLC38A9, una proteína transmembranal en el lisosoma, no caracterizada, con secuencia similar a los transportadores de aminoácidos y que transporta arginina, interactúa con las proteínas Rag GTPasas y la proteína Ragulator de un modo sensible a aminoácidos. La pérdida de SLC38A9 reprime la activación de mTOR por aminoácidos, particularmente arginina. De esta manera, SLC38A9 funciona río arriba de las Rag GTPasas y es un excelente candidato a convertirse en un sensor de arginina para la ruta de mTOR-C1 (Wang *et al.*, 2015).

Otro efecto que podría ayudar a entender la mayor concentración de mRNA mTOR-C1 en las ratas que consumieron espirulina y soya es su contenido más alto en

glicina, alanina y prolina en comparación de la caseína, ya que la activación de mTOR-C1 se ha asociado con los transportadores de aminoácidos neutros cortos que transportan precisamente estos aminoácidos, conocidos como PATs (Proton-assisted Amino acid Transporters), los cuales han mostrado interacción con los componentes que posiblemente activen mTOR-C1 a partir de aminoácidos (Goberdhan *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2007)

Finalmente se discute el efecto del perfil de aminoácidos presente en cada una de las dietas sobre la expresión de SNAT2 en el hígado de ratas.

En los resultados de la expresión de SNAT2 (mRNA SNAT2 y proteína SNAT2) se observó, en general para los tres grupos de ratas, que la expresión fue mayor en el ayuno y en los primeros minutos posprandio y después disminuye. Estos cambios fueron significativos para las ratas que consumieron caseína y soya pero no para las ratas que consumieron espirulina, en este grupo no hay cambios significativos en la concentración de este transportador durante las dos horas posprandio, aunque si hay un patrón de expresión muy similar al que generan las otras dietas. Estos resultados son congruentes con lo que se ha reportado en cuanto a la "regulación adaptativa" que presenta SNAT2 (Ling *et al.*, 2001). En estos resultados se observó el incremento de mRNA SNAT2 y la proteína SNAT2 ante la falta de aminoácidos en el ayuno y durante los primeros minutos de alimentación. Se ha sugerido que la ocupación del sitio de unión al sustrato en SNAT2, en el estado de suficiencia de aminoácidos, evoca una señal represiva que mitiga la respuesta adaptativa (Hyde *et al.*, 2007), lo que explica porque después de una hora de alimentación la expresión de SNAT2 disminuye considerablemente en los tres grupos.

SNAT2 se encarga de transportar aminoácidos neutros de cadena corta como son: alanina, glicina, serina, prolina, cisteína y glutamina. En el hígado SNAT2 transporta principalmente alanina y glutamina. La glutamina también puede interaccionar con otros sistemas intercambiadores como el Sistema L, estimulando la entrada de leucina, isoleucina y valina a las células (Palii *et al.*, 2004).

La expresión de mRNA SNAT2 fue significativamente mayor en las ratas que consumieron caseína y soya en el ayuno y a los 30 minutos posprandio. El perfil de aminoácidos de caseína y soya muestra que estas proteínas tienen menor contenido de alanina en comparación con la espirulina que tiene hasta 40% más alanina que la caseína y 20% más que la soya. Probablemente SNAT2 se está

expresando más en el hígado de las ratas que consumieron las dietas con caseína y soya como una respuesta adaptativa a la deficiencia de alanina. En cuanto al contenido de ácido glutámico, la caseína (203.6 mg/g de proteína) y la proteína de soya (169 mg/g de proteína) muestran mayor cantidad de este aminoácido en comparación con la espirulina (91.8 mg/g de proteína), esto se puede relacionar con los resultados de western blot, las ratas que consumieron espirulina presentaron una cantidad significativamente mayor de SNAT2 a los 120 minutos de alimentación, aunque se debe considerar que tanto el ácido glutámico como la glutamina son aminoácidos dispensables para el organismo. Sin embargo, la correlación entre mRNA SNAT2 y proteína SNAT2 aunque no es directa, el contenido de alanina en estas fuentes de proteína seguramente esta modulando la respuesta adaptativa que se observa, por lo que se requiere mayor investigación en este punto.

Se ha reportado que SNAT2 tiene la capacidad de modular la cantidad de aminoácidos libres intracelulares así como detectar cambios en la disponibilidad de aminoácidos extracelulares (Hyde *et al.*, 2007). En este estudio SNAT2 está regulando su expresión de forma adaptativa, de acuerdo a la disponibilidad de aminoácidos presentes en las tres dietas, sobre todo de sus sustratos.

En los últimos años se ha estudiado la regulación de SNAT2 por acción hormonal. En el hígado, el glucagon estimula su actividad y expresión a través de la formación de AMPc activando el factor de transcripción CRE que se une a la región promotora del gen de SNAT2 (Ortiz *et al.*, 2011). En los resultados de la concentración de glucagon sérico que aquí se presentan, el único cambio significativo es el aumento de la concentración a los 60 minutos posprandio en las ratas que consumieron caseína, lo cual no tiene correlación con la cantidad de proteína SNAT2 que se expresa en el hígado de estas ratas.

Finalmente el efecto de los aminoácidos sobre los mecanismos que se analizaron en este estudio puede estar asociado con más de una vía de señalización como se ha discutido ampliamente, debido a la diversidad estructural y funcional de los aminoácidos. Algunos ejemplos de esta relación son estudios como el de Gulati y colaboradores en 2008, donde se observa que la suplementación con aminoácidos incrementa el Ca^{2+} intracelular a través del sistema de transporte SLC38A2 (SNAT2) en células HeLa y esto es necesario para la activación, inducida por aminoácidos, de la ruta de mTOR-C1 vía la modulación de la proteína hVps34. También se ha estudiado que SNAT2 ejerce un efecto estimulador sobre la actividad

de la PI3-cinasa activada por insulina y la fosforilación de PKB/Akt. Aún es poco claro como SNAT2 puede modular la señalización a PI3-cinasa/PKB, tal respuesta puede actuar para sinergizar los efectos de la insulina sobre la ruta de mTOR (Evans *et al.*, 2008). Por otro lado, en los últimos años se ha estudiado que a través de un mecanismo desconocido, mTOR-C1 regula la actividad transcripcional de SREBP a través de la defosforilación mediada por mTORC1 de la proteína Lipin 1, que entra al núcleo y evita la señalización SREBP, cuando hay deficiencia de aminoácidos y/o factores de crecimiento, es decir cuando mTORC1 no está activo (Peterson *et al.*, 2011).

El efecto que el perfil de aminoácidos de espirulina tuvo sobre estos mecanismos de acción en conjunto, siempre en comparación con el efecto de la caseína y la proteína de soya, fue el siguiente: Activó la lipogénesis incrementando la expresión génica de SREBP1c y FAS y favoreció la acumulación de triglicéridos y colesterol en suero, a partir de los 30 minutos posprandio, donde se registró una mayor concentración de insulina y menor concentración de glucagon en suero. Esto se puede explicar a partir de su deficiencia en aminoácidos indispensables sobre todo en lisina y al contenido alto de arginina. El aumento en la insulina sérica que presentan estas ratas no es suficiente para activar a mTOR-C1 cuando hay deficiencia de aminoácidos ya que la síntesis de proteína fue mínima a través de la fosforilación de P70S6K, esto se puede relacionar con la deficiencia de aminoácidos como leucina o glutamina a pesar de la suficiencia de arginina. La expresión de SNAT2 a pesar de que se mantiene sin cambios significativos puede estar sensando la disponibilidad de alanina después de 60 minutos posprandio. En conjunto en estos resultados no se observó alguna relación entre la expresión de SNAT2 y la secreción de glucagon o el aumento en la secreción de insulina. En general la expresión alta de SREBP1c y FAS tiene sentido cuando se observa la relación insulina/glucagon pero contrasta con la baja actividad de mTORC1 ya que a través de Lipin 1 debería frenar la lipogénesis. Sin embargo para profundizar en la interrelación entre estos mecanismos hacen falta más determinaciones.

La caseína contiene un perfil de aminoácidos indispensables más completo en relación a la proteína de espirulina o a la proteína de soya por lo que se piensa que el efecto sobre los mecanismos de acción que aquí se estudian, pueden ser más congruentes con lo que se ha reportado en los últimos años. Las ratas que consumieron esta dieta generan una mayor relación insulina/glucagon a los 60 minutos posprandio, lo que favoreció la expresión de SREBP-1c y FAS. También se

dió una expresión más alta de SNAT2 y a los 30 minutos posprandio hubo un aumento en la síntesis de proteína a través de p-P70S6K.

Estas observaciones unen a estas vías de señalización en puntos donde hace falta más investigación sin embargo los efectos que se destacan en este estudio pueden servir como una base para desarrollar nuevas hipótesis. Existe mucha investigación en todo el mundo tratando de detallar la relación entre los diferentes mecanismos celulares, en particular los que aquí se analizaron.

Dentro de las determinaciones complementarias que se realizaron, el perfil de ácidos grasos resulta necesario para conocer el tipo de lípidos que se encuentran presentes en la muestra de espirulina y si de alguna manera están interfiriendo con los resultados obtenidos. Lo mismo sucede con los minerales tóxicos presentes. Sin embargo la cantidad en la que se encuentran no es significativamente alta por lo que no implican un desbalance en la dieta, durante el periodo que duró este experimento.

8. CONCLUSIONES

- La espirulina procedente de Solarium Biotechnology fue deficiente en aminoácidos indispensables y su aminoácido limitante fue la lisina. El consumo de esta proteína generó menor ganancia en peso y desnutrición en las ratas por lo que se considera una proteína de baja calidad nutrimental en comparación con la caseína o la proteína de soya.
- El patrón de aminoácidos de la espirulina, caseína y soya generó diferencias significativas en la relación insulina/glucagon a los 30 minutos posprandio lo cual se correlacionó con la expresión génica de SREBP-1c y FAS. La espirulina de Solarium Biotechnology que fue deficiente en lisina y que presentó un contenido más alto de arginina, en comparación con la caseína, favoreció la lipogénesis a través del aumento significativo de SREBP-1c y FAS y además puede contribuir a la acumulación de triglicéridos y colesterol en suero.
- La activación de mTOR-C1, evaluada a través de la fosforilación de su blanco, la proteína P70S6K, presenta diferencias significativas de acuerdo con el tipo de aminoácidos presentes en la dieta. La espirulina deficiente en aminoácidos como: leucina, isoleucina, valina y glutamina es responsable del contenido significativamente bajo de p-P70S6K en el hígado de las ratas que consumieron esta dieta, a los 60, 90 y 120 minutos posprandio, a comparación de las ratas que consumieron las otras dietas.
- La expresión génica del transportador SNAT2 responde al contenido de aminoácidos en la dieta de forma adaptativa, siendo significativamente mayor en el ayuno y durante los primeros minutos posprandio y disminuyendo significativamente su expresión hasta las dos horas posprandio. Sin embargo, el perfil de aminoácidos de la espirulina, caseína o soya, principalmente su contenido de alanina y ácido glutámico no se relaciona directamente con la expresión de este transportador. En el hígado de las ratas que consumieron espirulina no existen cambios significativos en la expresión de SNAT2 desde el ayuno y hasta las dos horas posprandio.

- Los resultados en este estudio difieren con la hipótesis propuesta en cuanto a que la espirulina aumentó significativamente la expresión de SREBP-1c a pesar de su baja relación lisina/arginina. La expresión de SNAT2 no responde necesariamente al perfil de aminoácidos y finalmente la proteína de espirulina aumentó significativamente de una forma muy discreta la actividad de mTOR-C1 en comparación con la activación que generó la caseína o la soya.
- La respuesta celular al perfil de aminoácidos presente en la espirulina, caseína o soya, que se generó en la insulina, SREBP-1c, FAS y mTOR-C1 no es suficiente para asegurar que alguna de estas proteínas sea un sensor de aminoácidos. Lo que si queda claro es que probablemente no haya un sensor de aminoácidos general, sino que puede haber un sensor para cada aminoácido, dependiendo las condiciones a las que sea sometida la célula.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abo-Shady A, Abou-El-Souod S, El-Raheem A, El-Shanshoury R, Mahmoud Y. Protoplasts from the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *World J Microbiol & Biotech* 8:385-386, 1992.

Anitha L y Chandralekha. Effect of supplementation of *Spirulina* of blood glucose, glycosylated hemoglobin and lipid profile of male non-insulin dependent diabetics. *Asian J Exp Biol Sci* 1(1):36-46, 2010.

American Heart Association (2014). Disponible en: <http://www.heart.org/HEARTORG/>.

Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R, Tovar A. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in Rats. *J Nutr* 134:522-529, 2004.

Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:592-602, 2009.

Artiss JD y Zak B. Measurement of cholesterol concentration en Handbook of Lipoprotein Testing. AACC Press, Washington, 1997.

Balage M, Sinaud S, Prod'homme M, Dardevet D, Vary T, Kimball S, Jefferson L, Grizard J. Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E. eIF4G complex in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 281:E565-574, 2001.

Benyon R. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Elsevier. Segunda Edición. 2003.

Blachier F, Lancha JrAH, Boutry C, Tomé D. Alimentary proteins, aminoacids and cholesterolemia. *Amino acids* 38:15-22, 2010.

Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *J Physiol* 552: 315-324, 2003.

Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem* 277: 22966-22973, 2009.

Borowitzka M. Products from algae. 1st Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology. University of Malaysia. Kuala Lumpur, Malaysia, 1994.

- Brasse-Lagnel C, Lavoigne A, Husson A.** Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *FEBS J* 276(7):1826–1844, 2009.
- Buerger C, DeVries B, Stambolic V.** Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochem Biophys Res Commun* 344:869–880, 2006.
- Canfield LM y Chytil F.** Effect of low lysine diet on rat protein metabolism. *J Nutr* 108:1343-1347, 1978.
- Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM, Kandror KV.** Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes* 59:775–781, 2010
- Chamorro G, Salazar M, Favila L, Bourges H.** Estudio teratogénico de *Spirulina* en ratón. *Arch Latinoamer Nutr* 40:86-94, 1996.
- Chamorro G, Salazar M, Gómez de Lima AK, Pereira-dos Santos C, Ceballos G, Fabila CL.** Actualización de la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional. *Arch Latinoamer Nutr* 52(3):232-240, 2002.
- Chiang GG y Abraham RT.** Phosphorylation of Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by P70S6 kinase. *J Biol Chem* 280(27):25485–25490, 2005.
- Christie GR, Hajduch E, Hundal HS, Proud CG, Taylor PM.** Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a TOR dependent manner. *J Biol Chem* 277:9952–9953, 2002.
- Ciferri O y Tiboni O.** The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual Rev. Microbiology*, 39:503-526, 1985.
- Cohen, Z.** The chemicals of *Spirulina*. In *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell biology and biotechnology*. Taylor & Francis Londres, 175-203, 1997.
- Cutler NS, Heitman J, Cardenas ME.** TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Endocrinol* 155:135–142, 1999.
- Devlin TM.** Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Metabolismo de los aminoácidos. Cuarta edición, ed Reverté, Barcelona, 2008.
- Dudek SM, Semenkovich CF.** Essential amino acids regulate fatty acid synthase expression through an uncharged transfer RNA-dependent mechanism. *J Biol Chem* 270:29323–29329, 1995.

Eberlé D, Hagarthy B, Bossard P, Ferré P, Fougère F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848, 2004.

Evans K, Nasim Z, Brown J, Clapp E, Amin A, Yang B, Herbert TP, Bevington A. Inhibition of SNAT2 by metabolic acidosis enhances proteolysis in skeletal muscle. *J Am Soc Nephrol* 19:2119–2129, 2008.

Fafournoux P, Bruhat A, Jousse C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem J* 351:1–12, 2000.

Falquet J. The nutritional aspects of Spirulina (2008). Disponible en: <http://www.antenna.ch/en/malnutrition/documents.html>.

Felder TK, Klein K, Patsch W, Oberkofler H. A novel sREBP-1 splice variant: Tissue abundance and transactivation potency. *Biochim Biophys Acta* 1731:41-47, 2005.

Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16:1865-1870, 2006.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014). Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/>.

Gaccioli F, Huang CC, Wang C, Bevilacqua E, Franchi-Gazzola R, Gazzola GC, Bussolati O, Snider MD, Hatzoglou M. Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation and cap-independent translation. *J Biol Chem* 281:17929–17940, 2006.

Gazzda F, Visigalli R, Bussolatti O, Di Asta V, Franchi R. Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK 1/2 activation. *J Biol Chem* 274:28922-28928, 1999.

Gilroy D, Kauffman K, Hall R, Huang X, Chu F. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ Health Perspect* 108:435–439, 2000.

Goberdhan DC, Meredith D, Boyd CA, Wilson C. PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* 132:2365–2375, 2005.

Goberdhan DCI, O'Grady MH, Kazi S, Reynolds B, Visvalingam SM, Wilson C, Boyd CAR. Amino acid sensing and mTOR regulation: inside or out?. *Biochem Soc Trans* 37:248–252, 2009.

Guertin DA y Sabatini DM. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12:9-22, 2007.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell* 11:859-871, 2006.

Guglielmi G, Rippka R, Tandeau De Marsac N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* sp. and *Arthrospira* sp. among cyanobacteria. Doumenge F, Durand-Chastel H, Toulemont A, eds. *Spiruline* Algue de vie. *Bulletin de l'institut Océanographique Monaco. Musée Océanographique. Numéro Spécial* 12:13-23, 1993.

Gulati P, Gaspers LD, Dann SG, Joaquin M, Nobukuni T, Natt F, Kozma SC, Thomas AP, Thomas G. Amino acids activate mTOR complex1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* 7:456–465, 2008.

Habib M, Parvin M, Huntington T, Hasan M. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations Fisheries and Aquaculture Circular No 1034. Rome, Italy, 2008.

Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S. Leucyl-tRNA Synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149:410–424, 2012.

Hanson RW, Hatzoglou M, McGrane MM, Wynshaw-Boris A, Rottman FM, Wagner T. Molecular biology and nutrition research. *J Nutr* 119: 957-964, 1989.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110:177-189, 2002.

Hatanaka T, Hatanaka Y, Setou M. Regulation of amino acid transporter ATA2 by ubiquitin ligase Nedd4–2. *J Biol Chem* 281:35922–35930, 2006.

Hay N y Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926–1945, 2004.

Health Canada (1999). Blue-green algal products. disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/media/nr-cp/1999/1999_114bk1_e.php.

Hernández A, Vasallo PM, Torres A, Salido E. Análisis de RNA: estudio de la expresión génica. *Nefrología* 15(2):67-84, 1995.

Horton J, Goldstein J, Brown M. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Investig* 109:1125-1131, 2002.

Horwitz W & AOAC International. *Official methods of analysis of AOAC International.* Gaithersburg, Md: AOAC International, 2002.

Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E603-E613, 2009.

Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS. Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability. *J Biol Chem* 282:19788–19798, 2007.

Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J* 373: 1–18, 2003.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590, 2003.

Jacinto E y Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 117–126, 2003.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127: 125-137, 2006.

Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu FX, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracci VS, Guan KL. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science* 447(6218): 194-198, 2015.

Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 133-139, 2013.

Kaput J, Rodríguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 16(2):166-177, 2004.

Kilberg MS, Pan YX, Chen H, Leung-Pineda V. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr* 25: 59–85, 2005.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163-175, 2002.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10: 935-945, 2008.

Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract* 3(1): 64-71, 2009.

Konoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimotohno K. Quantification of gen expression over a wide range by the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 206:231-235, 1992.

Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 56:239-263, 2001.

Kurien BT y Scofield RH. Western Blotting. *Methods* 38(4):283-293, 2006.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122: 3589–3594, 2009.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *J Cell Sci* 149: 274–293, 2012.

Lee C, Inoki K, Guan K. mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:443-467, 2007.

León G, Blanco D, Peña A, Ronda M, González BO, Arteaga ME, Bada AM, González Y, Mancebo A. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidos en CENPALAB, Cenp:SPRD. *Rev electrón vet* 12(11), 2011.

Li D y Qi Y. Spirulina industry in China: Present status and future prospects. *J. Appl. Phycol.*, 9:25–28, 1997.

Ling R, Bridges CC, Sugawara M, Fujita T, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V. Involvement of transporter recruitment as well as gene expression in the substrate-induced adaptive regulation of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta* 1512: 15–21, 2001.

Liu H, Liu J, Wu X, Zhang J. Biochemistry, molecular biology and pharmacology of fatty acid synthase, and emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. *Int J Biochem Mol Biol* 1:69-89, 2010.

Liu X y Zheng XF. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol Biol Cell* 18: 1073–1082, 2007.

Long W, Saffer L, Wei L, Barrett E. Amino acids regulate skeletal muscle PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation independently of insulin. *Am J Physiol* 279: E301-306, 2000.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 15: 702-713, 2005.

Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307–318, 2009.

Macedo G, Ferreira C, Menegaz A. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. *J Med and Biol Res* 41: 519-525, 2008.

Malmberg SE, Adams CM. Insulin signaling and the general amino acid control response. Two distinct pathways to amino acid synthesis and uptake. *J Biol Chem* 283: 19229–19234, 2008.

Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Zulet MA, Martínez JA. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigénica. *Nutr Hosp* 20(3): 157-164, 2005.

May ME, Buse M. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. *Diabetes Metabol Rev* 5: 227-245, 1989.

McCormick JI, Johnstone RM. Identification of the integrin alpha 3 beta 1 as a component of a partially purified A-system amino acid transporter from Ehrlich cell plasma membranes. *Biochem J* 311: 743–751, 1995.

Menéndez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7: 763-777, 2007.

Mendoza ME, Sotomayor GA, Bourges RH, Chávez VA. Aspectos nutrimentales de una proteína unicelular. *Tecnología de Alimentos* 6(22): 22-30, 1971.

Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* 156: 771–785, 2014.

Morrison CD, Reed SD, Henagan TM. Homeostatic regulation of protein intake: in search of a mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R917–R928, 2012.

Mortimore GE, Khurana KK, Miotto G. Amino acid control of proteolysis in perfused livers of synchronously fed rats: mechanism and specificity of alanine co-regulation. *J Biol Chem* 266: 1021–1028, 1991.

Nelson D, Cox M. Principles of biochemistry of Leningher. Worth Publishers Inc New York, 2000.

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C. Defining the Role of mTOR in Cancer Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136: 521-534, 2009.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14238-14243, 2005.

Noriega.López L, Tovar A, González-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillan-Doherty P, Torres N. Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acids pattern and isoflavones. *J Biol Chem* 282: 20657-20666, 2007.

Norma oficial mexicana nom-117-ssa1-1994. Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/117ssa14.html>.

Okamura H, Aoyama I. Interactive toxic effect and distribution of heavy metals in phytoplankton. *Toxicol. and Water Quality* 9: 7–15, 1994.

Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635–648, 2006.

Oregon Department of Agriculture (2014). Disponible en: <http://www.oregon.gov/oda/Pages/default.aspx>.

Organización Mundial de la Salud (2014). Disponible en: <http://www.who.int/es/>.

Ortiz V, Alemán G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR. Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E1092–E1102, 2011.

Palii SS, Chen H, Kilberg M. Transcriptional control of the human SNAT2 system a transporter gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J Biol Chem* 279: 3463-3471, 2004.

Palii SS, Thiaville MM, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS. Characterization of the amino acid response element within the human sodium coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem J* 395: 517–527, 2006.

Palou A, Bonet ML, Picó C, Rodríguez AM. Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48(2): 36-48, 2004.

Paniagua-Michel J, Dujardin E, Sironval C. Crónica Azteca. El tecuitlalt concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los aztecas. *Cahiers Agricultures*, 2:283-287, 2004.

Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp Biol and Med* 231(8):1287-1299, 2006.

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137: 873-886, 2009.

Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146(3): 408-420, 2011.

Reeves F, Nielsen F, Fahey G. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951, 1993.

Reynolds B, Laynes R, O'gmondsdo' ttr MH, Boyd CA, Goberdhan DC. Amino acid transporters and nutrient-sensing mechanisms: new targets for treating insulin-linked disorders?. *Biochem Soc Trans* 35: 1215–1217, 2007.

Richter JD y Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477-480, 2005.

Rubio-Aliaga I, Boll M, Vogt Weisenhorn DM, Foltz M, Kottra G, Daniel H. The proton/amino acid cotransporter PAT2 is expressed in neurons with a different subcellular localization than its paralog PAT1. *J Biol Chem* 279: 2754–2760, 2004.

Saltiel AR y Kahn R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 779-806, 2001.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, 1,2, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320:1496–1501, 2008.

Sancak Y y Sabatini DM. Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem Soc Trans* 37: 289-290, 2009.

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141: 290-303, 2010.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320: 1496-1501, 2008.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25: 903-915, 2007.

Sánchez MR, Bernal J, Rozo C, Rodríguez I. Spirulina (Arthrospira): An edible microorganism: A review. *Universitas Scientiarum* 8(1): 11-12, 2003.

Sánchez M, Jiménez S, Morgado J. La homocisteína: un aminoácido neurotóxico. *REB* 28: 3-8, 2009.

Santillan C. Cultivation of Spirulina for human consumption and for animal feed. International Congress of Food Science and Technology. Madrid, Spain, 2004.

Sasson A. Micro Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries. BIOTEC Publication 1/2542. pp.11-31. Place de Fontenoy, Paris, France. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), 1997.

Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotech* 19: 751–755, 2001.

Simpore J, Kabore F, Zongo F, Dansou D, Bere A, Pignatelli S, Biondi D, Ruberto G, Musumeci S. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutrition Journal*, 5:325-333, 2006.

Solarium **biotechnology** (2014). Disponible en:
<http://www.spirulina.cl/investigaciones.html>

Thedieck K, Polak P, Kim ML, Molle KD, Cohen A, Jenó P, Darrieumerlou C, Hall MN. PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS ONE* 2: e1217, 2007.

Tomaselli L, Palandri M, Tredici M. On the correct use of the *Spirulina* designation. *Algal Stud* 83:539-548, 1996.

Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Blé-Castillo J, Díaz-Zagolla JC, Juárez-Oropeza MA. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *J Ethnopharmacol* 64:108-110, 1998.

Torres N, Noriega L, Tovar AR. Chapter 9 Nutrient modulation of insulin secretion. *Vitamins and Hormones* 80: 217-244, 2009.

Torres N y Tovar AR. The role of dietary protein on lipotoxicity. *Nutr Reviews* 65(6): 64-68, 2007.

Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragán VE, Cerbón-Cervantes MA, Torres N. Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr* 138(3): 462-468, 2008.

U.S. Food and Drug Administration (2014). Disponible en: <http://www.fda.gov/>.

United States Department of Agriculture (2014). Disponible en:
<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>

Van Sluijters DA, Dubbelhuis PF, Blommaert EF, Meijer AJ. Aminoacid-dependent signal transduction. *Biochem J* 351: 545–550, 2000.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9: 316-323, 2007.

Vernia Miralles. Tesis Doctoral: Estudio del factor de transcripción srebp1 en estados de Resistencia a la insulina. Universidad de Valencia. Servei de publicacions, Valencia, España. pp. 45-47, 2007.

Voltarelli F, de Mello M. *Spirulina* enhanced the skeletal muscle protein in growing rats. *Eur J Nutr* 47:393-400, 2008.

Vonshak A, Chanawongse L, Bunnag B, Tanticharoen M. Light acclimation and photoinhibition in three *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) isolates. *J Appl Phycol* 8: 35–40, 1996.

Vonshak A, Tomaselli L. Arthrospira (Spirullina): Systematics and Ecophysiology. En *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher Dordrecht, Holanda. pp 502-522, 2000.

Vonshak A. Recent advances in microalgal biotechnology. *Biotech Adv* 8: 709–727, 1990.

Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 282: 20036-20044, 2007.

Wang S, Tsun Z, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, Yuan ED, Jones TD, Chantranupong L, Comb W, Wang T, Bar-Peled L, Zoncu R, Straub C, Kim C, Park J, Sabatini BL, Sabatini DM. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science* 347: 188-194, 2015.

Wang Y, Hones P, Ausman LM, Lichstesntein A. Soy protein reduce triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 173: 269-275, 2003.

Wei EK, Ma J, Pollak MN, Rifai N, Fuchs CS, Hankinson SE, Giovannucci E. A prospective study of C-peptide, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 850–855, 2005.

Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem* 282: 25604-25612, 2007.

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

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 21–35, 2011.

ANEXO I

ESPECIFICACIONES PARA CASEÍNA MARCA HARLAN TEKLAD "VITAMIN FREE" TEST Catalog No. 160040, Batch No. 892475.



CASEIN, "VITAMIN-FREE" TEST (Catalog No. 160040)
Batch No. 892475

TEKLAD "Vitamin-Free" Test (VFT) Casein is manufactured by extracting high quality casein (obtained from lactic acid precipitation of skim milk) with hot denatured ethanol.

VFT Casein often is the protein source chosen for semipurified test diet formulas. As compared with regular casein, VFT casein contains less fat, less moisture and more protein. The reduced levels of many vitamins in VFT Casein make it the preferred protein source for many vitamin studies. Thus, the nickname "Vitamin-Free" was given to extracted casein many years ago.

The nutrient content of VFT Casein is fairly consistent, however small variations do occur from batch to batch. The variations which occur are directly related to the nutrient variations which are inherent for different lots of casein prior to extraction. Some typical nutrient values for VFT Casein are given as a source of information.

"Typical" General Information (as is basis):

Nitrogen (%)	14.2	
Protein (N x 6.38) (%)	90.6	N=14.2
Fat (%)	0.1	
Fiber (%)	0.0	
Lactose (%)	0.06	
Ash (%)	1.9	
Moisture (%)	6.3	
Gross Energy (Kcal/g)	5.67	

"Typical" Mineral Values (as is basis):

Calcium	(%)	0.005-0.05	Zinc	(mg/Kg)	38.4
Phosphorus, Total	(%)	0.74	Manganese	(mg/Kg)	1.6
Phosphorus, Inorganic	(%)	0.03	Chromium	(mg/Kg)	0.8
Sodium	(%)	0.014	Fluoride	(mg/Kg)	3.1
Chloride	(%)	0.03	Iodine	(mg/Kg)	0.2
Potassium	(%)	<0.05	Aluminum	(mg/Kg)	4.8
Magnesium	(%)	0.005	Selenium	(mg/Kg)	0.2
Iron	(mg/Kg)	7.4	Cobalt	(mg/Kg)	0.2
Copper	(mg/Kg)	4.4	Boron	(mg/Kg)	0.9

"Typical" Vitamin Values (mg/Kg):

Biotin	0.03	Pantothenic Acid	2.3
Choline Chloride, Total	<50.	Pyridoxine HCl	0.5
Choline Chloride, Free	<50.	Riboflavin	1.0
Folic Acid	0.6	Thiamin	0.1
Niacin	0.5	Vitamin B ₁₂	0.002

ANEXO I

CERTIFICADO DE SALUD Y SEGURIDAD DE LAS RATAS SPRAGUE DAWLEY.

CERTIFICADO DE SALUD



En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la Factura 2275, de Harlan Laboratories, SA de CV., se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y genéticamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido.

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidos en la Barrera Harlan No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Harlan), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.harlan.com. Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México a 17 días del mes de Mayo del 2010.

El Médico Veterinario Responsable.



ANEXO I

CERTIFICADO DE SALUD Y SEGURIDAD DE LAS RATAS SPRAGUE DAWLEY.

		Health Monitoring Report Latest Monthly Update: 1 April 2010			
Location: Mexico City, Mexico		Barrier: 650		Species: Rat	
	Most Recent Test Date	Most Recent Results ^a	Historical Results ^{a,b}	Test Frequency ^c	Test Method
Viruses					
Hantaan Virus	19-Nov-09	0/2	0/35	Semi-Annually	MFI
Kilham's Rat Virus (KRV)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCM)	19-Nov-09	0/2	0/35	Semi-Annually	MFI
Mouse Adenovirus type 1 (FL)(MAD-1)	19-Nov-09	0/2	0/35	Semi-Annually	MFI
Mouse Adenovirus type 2 (K87)(MAD-2)	19-Nov-09	0/2	0/35	Semi-Annually	MFI
Pneumonia Virus of Mice (PVM)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Rat Minute Virus (RMV)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Rat Parvovirus (RPV)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Rat Theiler Virus (RTV)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Respiratory Enteric Virus III (REO 3)	19-Nov-09	0/12	0/82	Quarterly	MFI
Sendai Virus	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Sialodacryoadenitis Virus (SDAV)(RCV)	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Toolan's H-1 Parvovirus	29-Jan-10	0/12	0/105	Monthly	MFI
Bacteria, Mycoplasma and Fungi					
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	19-Nov-09	0/8	0/30	Quarterly	Culture
<i>CAR Bacillus</i>	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	MFI
<i>Clostridium piliforme</i>	19-Nov-09	0/12	0/82	Quarterly	MFI
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	19-Nov-09	0/8	0/30	Quarterly	Culture
Dermatophytes	19-Nov-09	0/4	0/22	Semi-Annually	Culture
<i>Helicobacter bilis</i>	19-Nov-09	0/2	0/8	Quarterly	PCR
<i>Helicobacter hepaticus</i>	19-Nov-09	0/2	0/8	Quarterly	PCR
<i>Helicobacter spp</i>	19-Nov-09	0/2	0/8	Quarterly	PCR
<i>Klebsiella oxytoca</i>	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	Culture
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	Culture
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	19-Nov-09	0/12	0/82	Quarterly	MFI
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	29-Jan-10	0/12	0/70	Monthly	Culture
<i>Proteus mirabilis</i>	19-Nov-09	1/12	7/46	Quarterly	Culture
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	Culture
<i>Salmonella spp</i>	19-Nov-09	0/12	0/82	Quarterly	Culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	19-Nov-09	0/8	0/30	Quarterly	Culture
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	PCR
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	19-Nov-09	0/8	0/51	Quarterly	Culture
<i>Streptococcus spp Group B beta</i>	19-Nov-09	0/8	0/30	Quarterly	Culture
Parasites					
Ectoparasites	29-Jan-10	0/12	0/115	Monthly	Microscopy
Endoparasites	29-Jan-10	0/12	0/115	Monthly	Microscopy
Enteric Protozoan	29-Jan-10	0/12	0/115	Monthly	Microscopy
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19-Nov-09	0/2	0/35	Semi-Annually	MFI
Pathological Lesions					
Gross Exam	29-Jan-10	0/12	0/115	Monthly	Pathology
Histopathology-Lungs ^d	19-Nov-09	0/12	0/46	Quarterly	Pathology

Testing Laboratory: RADIL
 Report Released: 1 April 2010
 Date Barrier Populated: 2001
 Species Within Barrier: Mouse, Rat
 Report Notes:
 a Data are expressed as number animals positive/number tested.
 c Testing intervals are reported per room; however, barriers with multiple rooms have more frequent testing intervals.
 e Historical results include 18 months of cumulative data.
 f Results do not include strain-related or incidental findings.

Outbred
 Hsd:Sprague Dawley®™SD®™
 Hsd:WI


 Dale M. Cooper, DVM, MS, DACLAM
 Director, Animal Health, Laboratory Animal Medicine

 Helping you do research better

ANEXO III MÉTODOS

1. DETERMINACIÓN DE INSULINA SÉRICA (Millipore Rat Insulin RIA KIT, #cat: RI-13K, Millipore, St Charles, Missouri, USA).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- En la siguiente tabla se muestran los pasos que se siguieron para la determinación:

DETERMINACIÓN DE INSULINA								
Día 1						Día 2		
No. tubo	Paso 1	Paso 2 y 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8	Paso 9-11
	Agregar Buffer de ensayo	Agregar Estándar/ Muestra QC	Agregar 125 insulina marcada	Agregar Anticuerpo contra Insulina	Vortex, taponar e incubar 20-24 hrs, T 4°C.	Agregar Reactivo Precipitante	Vortex, incubar 20 minutos a 4°C.	Centrifugar a 2500 x g a 4°C por 20 minutos, decantar y cuantificar.
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 de 2µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
9,10	100 µL	100 µL de 5µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
11,12	100 µL	100 µL de 10µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
13,14	100 µL	100 µL de 20µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
15,16	100 µL	100 µL de 50µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
17,18	100 µL	100 µL de 100µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
19,20	100 µL	100 µL de 200µU/mL	100 µL	100 µL		1.0 mL		
21,22	100 µL	100 µL de QC1	100 µL	100 µL		1.0 mL		
23,24	100 µL	100 µL de QC2	100 µL	100 µL		1.0 mL		
25,26	100 µL	100 µL de muestra	100 µL	100 µL		1.0 mL		
27-n	100 µL	100 µL de muestra	100 µL	100 µL	1.0 mL			

* tubos de unión no especifica. ** tubos de referencia. Muestra QC: Muestra para control de calidad.

Buffer de ensayo: solución fosfosalina 0.05M, pH 7.4 con EDTA 0.025M, azida de sodio 0.08% y RIA 1%.

Anticuerpo contra insulina: Guinea Pig anti-Rat Insulin Serum

Estándar de insulina purificada de rata en las siguientes concentraciones 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µU/mL.

Muestra para control de calidad: Insulina purificada de rata.

Reactivo precipitante: Goat anti-Guinea Pig IgG Serum, PEG 3% y Triton X-100 0.05% en solución fosfosalina 0.05M, EDTA 0.025M, Azida de sodio 0.08%.

Los cálculos para determinar la concentración de insulina fueron proporcionados automáticamente por el contador de gamas y el principio en el que se basan es el siguiente:

Obtener el promedio de cada duplicado.

Restar el promedio de los tubos 3 y 4 de cada uno de los demás promedios.

Calcular el porcentaje de insulina marcada unida (entre 35% y 50%) = (porcentaje del tubo 5 y 6) / (porcentaje de tubos 1 y 2).

Calcular el porcentaje de adherencia de cada muestra (B) y del estándar (B₀):

$$\%B/B_0 = (\text{muestra o estándar} / \text{tubos 5 y 6}) \times 100.$$

Graficar el porcentaje B/B₀ de cada muestra en el eje de las ordenadas y la concentración conocida en el eje de las abscisas.

Construir la curva de referencia.

Calcular la concentración (µL/mL) de cada muestra interpolando en la curva de referencia.

2. DETERMINACIÓN DE GLUCAGON SÉRICO (Millipore Glucagon RIA KIT, #cat: GL-32K, St Charles, Missouri, USA).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- En la siguiente tabla se muestran los pasos que se siguieron para la determinación:

DETERMINACIÓN DE GLUCAGON								
Día 1					Día 2		Día 3	
No. tubo	Paso 1	Paso 2 y 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8	Paso 9-11
1,2	-	-	-	Vortex, tapar e incubar 20-24 hrs, T 4°C.	Agregar ¹²⁵ I- glucagon marcado	Vortex, tapar e incubar 20-24 hrs, T 4°C.	Agregar Reactivo Precipitante	Incubar 20 minutos a 4°C, centrifugar a 2000 x g a 4°C por 20 minutos. Decantar y cuantificar.
3,4*	300 µL	-	-		100 µL		-	
5,6**	200 µL	-	100 µL		100 µL		1.0 mL	
7,8	100 µL	100 µL de 20pg/mL	100 µL		100 µL		1.0 mL	
9,10	100 µL	100 µL de 50pg/mL	100 µL		100 µL		1.0 mL	
11,12	100 µL	100 µL de 100pg/mL	100 µL		100 µL		1.0 mL	
13,14	100 µL	100 µL de 200pg/mL	100 µL		100 µL		1.0 mL	
15,16	100 µL	100 µL de 400pg/mL	100 µL		100 µL		1.0 mL	
17,18	100 µL	100 µL de QC1	100 µL		100 µL		1.0 mL	
19,20	100 µL	100 µL de QC2	100 µL		100 µL		1.0 mL	
21,22	100 µL	100 µL de muestra	100 µL		100 µL		1.0 mL	

* tubos de unión no específica. ** tubos de referencia. Muestra QC: Muestra para control de calidad.

Buffer de ensayo: glicina 0.2M pH 8.8, EDTA 0.03M, azida de sodio 0.08% y RIA 1%.

Anticuerpo contra glucagon: Guinea pig anti-glucagon serum.

Estándar: Glucagon Standards en las siguientes concentraciones 20, 50, 100, 200 y 400 pg/mL.

Muestras para control de calidad: Glucagon recombinante purificado.

Reactivo precipitante: Goat anti-Guinea Pig IgG Serum, PEG 3 %, Triton X-100 0.05% y EDTA 0.025M.

Los cálculos para determinar la concentración de glucagon fueron proporcionados automáticamente por el contador de gamas y el principio en el que se basan es igual a como se explicaron para la determinación de la concentración de insulina.

3. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA. Método de glucosa oxidasa con el analizador YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI Life Science, Ohio, USA).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- Mezclar en vortex.
- Agregar en un tubo 10µL de muestra y hacer reaccionar con la enzima glucosa oxidasa.
- Acercar la muestra a la aguja del aparato YSI 2700 SELECT hasta que llegue a la mitad del tubo para que succione la muestra.
- Calibrar el aparato cada seis tomas con un estándar de glucosa.

4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL SÉRICO. Prueba enzimática fotométrica "CHOD-PAP" (Cholesterol FS, Diagnostic System International, Alemania).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- Pipetear en tubos eppendorf de 1.5 mL los siguientes reactivos:

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

Reactivo: Buffer 50 mmol/L pH 6.7, fenol 5 mmol/L, 4-aminoantipirina 0.3 mmol/L, colesterol esterasa \geq 200 U/L, colesterol oxidasa \geq 50 U/L, peroxidasa \geq 3 kU/L.
Estándar: 200 mg/dL (5.2 mmol/L).

- Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 500nm contra el blanco, durante los 60 minutos posteriores a la mezcla de los reactivos.
- Calcular la concentración de cada muestra con base a la absorbancia y concentración del estándar de colesterol.

Cálculos:

$$\text{Colesterol [mg/dL]} = (\Delta A \text{ Muestra} / \Delta A \text{ Estándar}) \times \text{Concentración Estándar [mg/dL]}$$

5. DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS. Ensayo colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO) (Triglicerides FS, Diagnostic System International, Alemania).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- Pipetear en tubos eppendorf de 1.5 mL los siguientes reactivos:

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

Reactivo: Amortiguador de Good 50 mmol/L pH 7.2, 4-Clorofenol 4 mmol/L, ATP 2 mmol/L, Mg²⁺ 15 mmol/L, glicerocinasa ≥ 0.4 kU/L, peroxidasa ≥ 2 kU/L, lipoproteína lipasa ≥ 2 kU/L, 4-aminoantipirina 0.5 mmol/L, glicerol-3-fosfato oxidasa ≥ 5 kU/L.

Estándar: 200 mg/dL (2.3 mmol/L).

- Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 500nm contra el blanco, durante los 60 minutos posteriores a la mezcla de los reactivos.
- Calcular la concentración de cada muestra con base a la absorbancia y concentración del estándar de triglicéridos.

Cálculos:

$$\text{Triglicéridos [mg/dL]} = (\Delta A \text{ Muestra} / \Delta A \text{ Estándar}) \times \text{Concentración Estándar [mg/dL]}$$

6. DETERMINACIÓN DE HOMOCISTEÍNA SÉRICA. Homocysteine Kit con el equipo Axsym System (Abbott, Illinois, USA).

- Descongelar en hielo las muestras de suero.
- Reactivos del KIT Homocysteine Reagent Pack 5F51-20: S-adenosil-L-cisteína, hidrolasa S-adenosil-L- homocysteína, anti S-adenosil-L homocisteína y solución de pretratamiento que contiene DTT y adenosina. El KIT también incluye los reactivos para calibrar el equipo y los controles.

- Colocar los reactivos en el equipo AxSYM System, en sus respectivos envases.
- Colocar 150 µL de muestra de suero en los carriles correspondientes para cuantificación.
- El equipo lleva a cabo automáticamente la mezcla de reacción y determina la concentración de homocisteína mediante la intensidad de la luz polarizada fluorescente por medio del lector óptico de FPIA del equipo.

7. HISTOMORFOLOGÍAS. Método de tinción con hematoxilina-eosina.

- Para procesar el tejido que se encuentra en los cassetes en formalina al 10% se hacen las siguientes inmersiones:

SOLUCIÓN	TIEMPO
Alcohol 95%	25 minutos
Alcohol 95%	25 minutos
Alcohol absoluto	20 minutos
Alcohol absoluto	20 minutos
Alcohol/Xilol	30 minutos
Xilol	25 minutos
Xilol	25 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	30 minutos
Parafina	30 minutos

- Después de la última inmersión en parafina, secar los cassetes por 24 horas para solidificar la parafina.

Para obtener bloques sólidos de parafina, en donde el tejido se encuentre en una cara de éste para su corte posterior, se lleva a cabo la inclusión del tejido en una cámara de inclusión (Leica EG 1160, Leica Biosystems Nussloch, GmbH, Alemania).

- Colocar los cassetes en la cámara de inclusión a 65°C por 20 minutos.
- Abrir los cassetes y tomar el tejido con pinzas metálicas.
- Colocar los tejidos sobre la placa fría de la cámara de inclusión para formar bloques sólidos de parafina.
- Cortar cada bloque de parafina en un microtomo eligiendo el grosor adecuado para cada tejido.
- Depositar cada corte en un baño de agua (1 L de agua destilada y 0.1 g grenetina para histologías) a 65°C.
- Colocar cada corte sobre un portaobjetos limpio.
- Fijar el tejido al portaobjetos colocándolo en una estufa a 65°C por 20 minutos.

- Revertir el proceso de inclusión, para posteriormente teñir el tejido, colocando la muestra a 60°C durante 30 minutos.
- Se lleva a cabo la tinción con hematoxilina-eosina, sumergiendo el tejido fijo al portaobjetos de la siguiente manera:

SOLUCIÓN	TIEMPO
Xilol absoluto	10 minutos
Xilol absoluto	10 inmersiones
Xilol:etanol (50:50)	10 inmersiones
Etanol absoluto	10 inmersiones
Etanol 96%	10 inmersiones
Agua	Lavar hasta que el tejido sea blanco
Hematoxilina	7 minutos
Alcohol ácido	1 inmersión
Agua	Lavar
Carbonato de litio	10 inmersiones
Agua	Lavar
Etanol 80%	10 inmersiones
Eosina	5 inmersiones
Etanol 95%	10 inmersiones
Xilol:etanol (50:50)	10 inmersiones
Xilol absoluto	10 inmersiones

- Después de la tinción agregar 3 gotas de resina al tejido teñido en el portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos.
- Dejar secar y observar al microscopio.

8. EXTRACCIÓN DE RNA DE HÍGADO DE RATA. Método de Tiocianato de Guanidinio con gradiente de Cloruro de Cesio de Chomczynski y Sachi, 1986.

Día 1.

- Limpiar el área de trabajo con etanol y DEPC.
- Agregar 8 mL de tiocianato de guanidinio a 4°C en tubos corex de 30 mL con una pipeta estéril desechable.
- Agregar 46 µL de β-mercapto etanol a cada tubo dentro de la campana de extracción.
- Tapar los tubos con papel aluminio y dejar en la campana.
- Sacar tejidos del ultracongelador y ponerlos en nitrógeno líquido.
- Cortar aproximadamente 500 mg de tejido y depositarlos en los tubos corex.
- Limpiar el politron con agua DEPC por lo menos 5 veces.

- Homogeneizar los tejidos en los tubos con tiocianato de guanidinio con ayuda del politron.
- Agregar 400 μL de sarcosil 10% por la pared del tubo corex.
- Mezclar por inversión una vez y tapar con parafilm.
- Centrifugar a 14 000 rpm a 18 °C por 15 minutos.
- Tomar 8 mL de sobrenadante y verter suavemente por las paredes en un tubo de polialómero con 4 mL de cloruro de cesio. No romper el gradiente.
- Colocar los tubos con gradiente de cloruro de cesio en las camisas para ultracentrífuga y atornillar la tapa de cada camisa.
- Enganchar las camisas al rotor y revisar que se encuentren bien colocadas.
- Encender el vacío de la ultracentrífuga y centrifugar a 29 000 rpm a 18°C por 18 horas.

Día 2.

- Apagar el vacío y retirar las muestras de la ultracentrífuga.
- Destapar las camisas y sacar los tubos.
- Verter el sobrenadante en un vaso y dejar invertidos los tubos en una gradilla sobre una toalla de papel.
- Cortar los tubos de polialómero a 2 cm de la base con una navaja estéril.
- Disolver la pastilla con 300 μL de agua-DEPC pipeteando suavemente.
- Colocar el volumen final de la disolución en un tubo eppendorf y agregar 300 μL de agua-DEPC.
- Agitar con vortex hasta disolver la pastilla por completo.
- Agregar 30 μL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 750 μL de etanol 100% frío.
- Agitar con vortex por 30 segundos y almacenar a -70°C por 24 horas.

Día 3.

- Sacar muestras del ultracongelador y descongelar en hielo.
- Centrifugar a 14 000rpm a 4°C por 30 minutos.
- Desechar el etanol cuidando de no desprender la pastilla y dejar escurrir por inversión.
- Añadir 1 mL de etanol al 70% frío y agitar con vortex hasta desprender la pastilla.
- Centrifugar a 14 000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- Retirar el etanol y secar el borde del tubo.
- Resuspender la pastilla en 500 μL de DEPC y agitar con vortex hasta disolver completamente.
- Almacenar a -70°C.

Cuantificación de RNA.

- El RNA total de hígado se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).
- Descongelar las muestras de RNA total de hígado en hielo.
- Limpiar el pedestal del Nanodrop con 2 μ L de agua libre de RNAsas y absorber con papel kimwipe.
- Leer el blanco (Agua Sigma)
- Agitar por 30 segundos en vortex las muestras de RNA total de hígado.
- Depositar 2 μ L de muestra en el pedestal del Nanodrop y leer la absorbancia del RNA a 260nm.

Electroforesis de RNA

- Preparar un gel de agarosa grado biología molecular al 1% como se indica en la siguiente tabla:

REACTIVO	CANTIDAD
Agarosa	1 g
Agua-DEPC al 0.1%	72 mL
MOPS 10x	10 mL
Formaldehído	18 mL

MOPS: 3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico.

- Pesar 1 g de agarosa grado biología molecular libre de RNAsas en papel aluminio, no usar espátula y agregar a un matraz Erlenmeyer de 100mL.
- Adicionar 72 mL de agua-DEPC.
- Disolver la agarosa en el agua-DEPC calentando en microondas por un minuto.
- Dejar enfriar a 50°C y agregar 10 mL de MOPS 10x y 18 mL de formaldehído.
- Lavar la cámara de electroforesis, el peine y la caja con agua-DEPC, colocarlos en una campana de extracción y equilibrar para que el gel quede derecho.
- Vaciar la solución del gel de agarosa a la cámara de electroferesis y dejar solidificar por una hora.
- Cuando el gel comience a solidificar agregar un poco de MOPS 1X frío sobre la superficie del gel para evitar que se seque.
- Retirar los peides.
- Descongelar las muestras de RNA en hielo.
- Suspender las muestras de RNA en agua estéril a una concentración de 15 μ g/ μ L y mantener en hielo.

- En tubos eppendorf agregar los siguientes reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD
MOPS 10x	1.7µL
Formaldehído	2.3 µL
Loading buffer*	2 µL
Bromuro de etidio	1 µL
Formamida	12 µL
RNA	1 µL
Volumen final	20 µL

*Loading buffer (glicerol al 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol, cianol xileno 0.25%) se agrega después de la incubación a 65°C.

- Incubar 65°C por 5 minutos.
- Llenar la cámara de electroferesis con MOPS 1x frío hasta 1mm por encima del gel.
- Cargar los pozos del gel con el volumen total de los tubos eppendorf y correr 2.5 horas a 95 volts.
- Visualizar y fotografiar el gel en un transiluminador.

9. RT-PCR CUANTITATIVA (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real acoplando la reacción de la Transcriptasa Reversa) (Hernández *et al.*, 1995).

Síntesis de cDNA.

- Se descongelan las muestras en hielo.
- A partir de la cuantificación de RNA se hacen los cálculos necesarios para tener 3000 ng/4 µL de cDNA o 750 ng/µL de cDNA

Ejemplo del cálculo:

Muestra	Concentración (ng/µL)	FD (µL)	Volumen RNA (µL)	Volumen Agua (µL)
RNA muestra 1	1606.79	1.14	20	22.8

Factor de dilución (FD) = $[(1606.79 \text{ ng}/\mu\text{L}) / (750 \text{ ng}/\mu\text{L})] - 1 = 1.14 \mu\text{L}$

El FD significa que por 1 µL de RNA se pondrá 1.14 µL de agua y para facilitar el manejo de estos volúmenes se tomarán 20 veces estas cantidades, es decir, por 20 µL de RNA se pondrán 22.8 µL de agua.

Se realiza este cálculo para cada una de las muestras a partir de las cuales se va a sintetizar cDNA.

- En tubos eppendorf de 1.5 mL se hace cada una de las diluciones.
- En tubos eppendorf de 0.5 μL se agregar los siguientes reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer RT 5x	4 μL
Oligonucleótido dT 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2 μL
dNTPs 2 mM	4 μL
DTT 0.1 M	2 μL
Inhibidor de RNAsas	1 μL
Transcriptasa Reversa MMV L	0.5 μL
Agua	4.5 μL
RNA	4 μL
Volumen final	22 μL

Buffer RT: Tris HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM y MgCl_2 3 mM.

- Agitar cada tubo en vortex por 15 segundos y dar un minispin por 15 segundos.
- Colocar los tubos en la placa del termociclador y programar los ciclos (1 hora a 42°C , 5 minutos a 94°C y 30 minutos a 4°C).
- Al terminar el proceso se diluye el cDNA 1:10 para que quede de 3000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ a 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$. (Para cada μL de cDNA se agregan 9 μL de agua sigma).
- El cDNA se conserva en el congelador.

Reacción de PCR cuantitativa

- Descongelar en hielo los tubos con cDNA.
- Colocar en hielo todos los reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR cuantitativa.
- Agregar en un tubo eppendorf de 1.5 mL los siguientes reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD
Agua libre de RNAsas	4 μL
Ensayos Fluorogénicos TaqMan® para el gen de interés*	0.6 μL
Agitar en vortex 3 segundos	
Master Mix**	6 μL
cDNA correspondiente	1.4 μL
Agitar con minispin por 8 segundos	

*TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20x): Forward PCR primer, 18 μM ; Reverse PCR Primer, 18 μM ; TaqMan® Probe, 5 μM .

**TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) No AmpErase® UNG protocol 4351891.

- Mantener en hielo.
- Cargar la placa de 96 pozos (Applied Biosystems) con 10 μL de cada mezcla de reacción en cada pozo, por triplicado y 10 μL de un blanco (Todos los reactivos excepto el cDNA, en su lugar agua sigma).

- Cubrir la placa con la cubierta plástica adhesiva (Applied Biosystems).
- Colocar la placa en el Termociclador ABI Prism 7000 SDS y correr 45 ciclos bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

La cuantificación relativa de la expresión génica se obtiene usando el Método Comparativo C_T (Applied Biosystems, User Bulletin no. 2, 2001) en tubos separados para los genes de interés y el control endógeno.

El cálculo de la eficiencia se hizo conforme a la siguiente fórmula: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$, en donde la pendiente se calculó a partir de la curva estándar realizada para cada sonda y tipo de muestra con diluciones de 1:10 de cDNA, desde 0.3 ng hasta 3000 ng.

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{[(E_{\text{gen interés}})^{\Delta CT_{\text{gen de interés (control - muestra)}}}]}{[(E_{\text{gen endógeno}})^{\Delta CT_{\text{gen endógeno (control - muestra)}}}]}$$

10. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE HÍGADO DE RATA. Método de extracción con buffer de lisis RIPA (Kurien y Scofield, 2006).

- Agregar en un tubo 10 mL de buffer de lisis RIPA, 200 μ L de ortovanadato de sodio 100 mM, 100 μ L NaF 100mM y pastilla de inhibidores de proteasas (1 por cada 10mL de buffer).
- Homogeneizar y mantener en hielo.
- Descongelar el tejido manteniéndolo en hielo.
- Pesar 1 g de hígado (0.20 g de cada una de las 5 ratas que se sacrificaron al mismo tiempo) y colocarlo en el tubo con buffer de lisis RIPA.
- Homogeneizar en un Politrón a máxima velocidad durante 20 minutos, manteniendo en hielo los tubos.
- Incubar durante 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo limpio y homogeneizar con vortex por un minuto.
- Tomar alícuotas del extracto y conservar en tubos eppendorf a -70°C.

Cuantificación de proteína

- Descongelar las muestras en hielo.
- De ser necesario hacer una dilución de los extractos de proteína de hígado. En este caso la dilución fue de 1:50 con buffer de lisis.

- Tomar 10 µL de cada una de las diluciones, por duplicado, y colocarlas en tubos eppendorf, mantenerlas en hielo.
- Tomar 10 µL de cada una de las diluciones del estándar de albúmina sérica bovina (0.2 a 5.0 mg/mL), por duplicado, para usar como curva de referencia.
- Agregar a cada tubo 50 µL de reactivo A´: 20 µL de reactivo S (Bio Rad Protein Assay) por cada 1 mL de reactivo A (Bio Rad Protein Assay) y mezclar en vortex.
- Agregar a cada tubo 400 µL de reactivo B (Bio Rad Protein Assay) y mezclar en vortex.
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción es estable por 1 hora.
- Colocar en celdas para leer en espectrofotómetro a 750nm.

11. WESTERN BLOT (kurien y Scofield, 2006).

Preparación de gel desnaturalizante de poliacrilamida.

- Montar los vidrios (Bio Rad) completamente limpios en los soportes y verificar que no haya fugas.
- Preparar el gel separador y parte del gel concentrador en tubos falcon en el orden y las cantidades indicadas en la siguiente tabla:

REACTIVO	GEL SEPARADOR AL 8% DE POLIACRILAMIDA	GEL CONCENTRADOR AL 4% DE POLIACRILAMIDA
Agua (mL)	3.72	2.69
Tris 1.5 M pH 8.8 (mL)	2	-
Tris 0.5 M pH 6.8 (mL)	-	1.13
SDS 10% (µL)*	80	45
Poliacrilamida 30% (mL)	2.16	0.5
APS 10% (µL)**	40	40
TEMED (µL)***	8	8

*SDS: dodecilsulfato sódico.

**APS: persulfato de amonio, agregar hasta que el gel este listo para vertirse entre los vidrios.

***TEMED: tetrametilendiamina, agregar hasta que el gel este listo para vertirse entre los vidrios.

- Vaciar el gel separador con ayuda de una pipeta evitando que se formen burbujas y hasta 2 cm debajo del límite del vidrio corto. Agregar encima etanol al 70% frio para aplanar y dejar que polimerice por 20 minutos.
- Vaciar el etanol, una vez que polimerizó.
- Terminar de preparar el gel concentrador, agregando APS y TEMED.

- Vaciar sobre el gel separador con ayuda de una pipeta, colocar el peine y dejar que polimerice por 20 minutos.
- Quitar el peine y lavar los pozos con agua desionizada.
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis (Bio Rad), agregar buffer de corrida 1x (Tris base, glicina, SDS, pH 8.3) cuidando que cubra por completo los vidrios.

Preparación de la muestra

- Determinar la cantidad de proteína requerida a partir de la cuantificación que se hace después de la extracción con buffer de lisis RIPA.
- Hacer una curva de concentraciones, desde 20 µg hasta 100 µg de proteína y elegir la concentración que sea directamente proporcional a la expresión.
- Agregar en un tubo la alícuota de proteína requerida y buffer RIPA en proporción 1:1 con β-mercaptoetanol 5% y Loading Buffer (glicerol 10.5%, azul de bromofenol 0.5%), estos últimos deben guardar una relación entre sí de 1:20 respectivamente.
- Mezclar con vortex, dar un ligero spin e incubar 80°C por 5 minutos.
- Cargar 25 µL de cada muestra en el pozo correspondiente.
- Cargar 15 µL de marcador de peso molecular directamente en el gel.

Electroforesis

- Correr el gel a 75 volts por 30 minutos, tiempo en el cual se observa el alineamiento de las bandas en todos los carriles.
- Continuar la electroforesis a 100 volts por 2.5 horas, cuidando de no perder las bandas de interés al final del gel durante la separación.

Transferencia

- Cortar membranas de PVDF (9 x 6 cm) y filtros.
- Colocar las membranas 15 segundos en metanol y 5 minutos en agua desionizada para hacerlas hidrófilas.
- Mantener por 30 minutos las membranas y filtros en buffer de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM glicina, 0.00375 % SDS, 20% metanol, pH 9.2) a 4°C.
- Terminada la electroforesis desmontar los vidrios y separar el gel, marcar el carril número uno.
- Sumergir por 30 minutos el gel en el buffer de transferencia junto con las membranas y los filtros.
- Limpiar la cámara de transferencia con etanol y papel kimwipes.

- Colocar en la placa del transblot el gel en el siguiente orden: filtro-membrana-gel-filtro. Pasar rodillo cada vez que se coloca un componente para evitar la presencia de burbujas.
- Calcular el límite de corriente (amperaje): Suma de áreas de todas las membranas que se van a colocar multiplicarlas por 5.5 y el resultado dividirlo entre 1000.
- Programar la fuente de poder, en este caso fue de 15 volts por 30 minutos y el amperaje calculado.
- Al termino desmontar la membrana y lavarla dos veces por 5 minutos en agua desionizada.

Tinción de la membrana

- Sumergir la membrana 20 segundos en metanol.
- Incubar la membrana por 2 minutos en 2 mL de reactivo de Ponceau S, con agitación.
- Lavar con agua desionizada hasta que aparezcan las bandas de proteína, en este momento es fácil cortar la emembrana si se requiere.
- Lavar la membrana con TBS-Tween.

Bloqueo

- Incubar la membrana con solución de bloqueo (Leche 5%, TBS-Tween 0.1%) con agitación suave de 120 rpm por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana con TBS-tween tres veces por 5 minutos a 150 rpm.

Incubación con anticuerpos

- Para cada anticuerpo que se va a usar se hace una curva de concentraciones para determinar cual es la concentración de anticuerpo con la cual la expresión es directamente proporcional y no hay saturación.
- Preparar la disolución del anticuerpo primario en la solución de bloqueo, mezclar suavemente.
- Incubar la membrana con esta disolución con agitación suave a 120 rpm durante toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente continuar la incubación a temperatura ambiente con agitación suave a 120 rpm durante una hora.
- Lavar la membrana con TBS-tween tres veces por 10 minutos a 150 rpm.
- Preparar la disolución del anticuerpo secundario en la solución de bloqueo, mezclar suavemente.

- Incubar la membrana con la disolución de anticuerpo secundario con agitación suave a 120 rpm durante 2.5 horas a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana con TBS-tween tres veces por 10 minutos a 150 rpm.

Revelado

- Mezclar los dos reactivos quimioluminiscentes ECL Inmobilon Western (millipore) en relación 1:1 y equilibrar a temperatura ambiente.
- Empapar la membrana con esta solución durante 5 minutos.
- Escurrir el exceso de reactivo y colocar la membrana entre los plásticos del cassette de revelado.
- Dentro del cuarto oscuro colocar la placa autoradiográfica Kodak MIN-R2000 sobre el plástico que cubre la membrana, el tiempo de exposición varía según las proteínas que se desean identificar.
- Dentro del cuarto oscuro sumergir la placa fotográfica dentro de la solución reveladora Kodak, enjuagar con agua y sumergir en la solución fijadora Kodak de 3 a 5 minutos.
- Enjuagar nuevamete con agua y dejar secar.
- Rotular la placa: fecha, proteínas de interes, pesos moleculares, etc.

Reusar la membrana (Para las proteínas fosforiladas: Primero se hace la determinación de la proteína fosforilada y después la proteína total)

- Lavar la membrana con TBS-tween tres veces por 10 minutos.
- Incubar la membrana con stripping buffer (Tris base 60 mM, β -mercaptoetanol, SDS 2%, pH 6.7) a 50 °C por 30 minutos.
- Lavar la membrana por 10 minutos con TBS-tween dos veces, bloquear y continuar con el proceso de incubación con los anticuerpos de interes.

ANEXO IV

PRIMERS PARA PCR-CUANTITATIVA UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Ensayos Fluorogénicos Taqman® de Applied Biosystems :

SREBP-1c (No. de ensayo: Rn01495769-m1)

FAS (No. de ensayo: Rn00569117-m1)

mTOR-C1 (No. de ensayo: Rn00693900-m1)

SNAT2 (No. de ensayo: Rn0071042-m1)

beta-actina (No. de ensayo: Rn0067869-m1).

GEN	PRIMERS (5´-3´)	TAMAÑO (bp)	ESPECIE
SERBP-1c			
Forward	TCCCAGAGTAGCCCCTTGTC	1009	Hamster
Reverse	CCAGTCCCCATCCACGAA		
FAS			
Forward	GCTTTGCTGCCGTGTCCTTCT	793	Rata
Reverse	GTGTCTGCTGGGGTCCTCGTT		
mTOR-C1			
Forward	ACTGAGGAGGGAGAACAGCA	153	Rata
Reverse	TGGCTCCATCTGCTAGTGIG		
SNAT2			
Forward	GAGGGATAATAGAGAGGGT	365	Rata
Reverse	CTTCTTCATACTAAACACTA		
β-ACTINA			
Forward	ACCCACACTGTGCCCATCTA	289	Rata
Reverse	CGGAACCGCTCATTGCC		

ANEXO V

GANANCIA EN PESO PROMEDIO DE LAS RATAS QUE SE ALIMENTARON CON LAS TRES DIFERENTES FUENTES DE PROTEÍNA

día	CASEÍNA (g)	EE caseína	SOYA (g)	EE soya	ESPIRULINA Solarium B. (g)	EE espirulina
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	3.49	0.68	8.64	1.32	0.43	1.71
3			15.08	0.87	5.35	1.84
4	17.72	1.45			9.76	2.26
5			4.38	1.14		
6	1.02	1.05			-12.06	1.83
7			2.67	1.30		
8	3.89	0.99			-14.39	1.71
9			5.31	1.73		
10	10.00	1.06			-12.29	1.99
11			9.95	2.23		
12	18.57	1.31			-7.19	1.93
13			16.29	2.93		
14	26.41	1.60			-4.44	2.80
15			20.72	2.87		
16	31.96	2.09			3.08	2.39
17			29.18	2.94		
18	41.84	1.66			11.17	2.88
19			36.84	2.99		
20	48.80	1.88			20.92	2.81
21			43.34	3.12		
22	55.17	1.96			28.77	2.83

EE: error estándar.

ANEXO V
CONSUMO DE ALIMENTO PROMEDIO DE LAS RATAS QUE SE ALIMENTARON
CON LAS TRES DIFERENTES FUENTES DE PROTEÍNA

Día	Caseína (g)	EE caseína	Soya (g)	EE soya	Espirulina Solarium B. (g)	EE espirulina
1	17.7408	0.6995	16.1028	0.8372	8.9148	0.6667
2	17.4088	0.6010	17.5876	0.7418	14.8128	0.7041
3	18.3829	0.5596	20.2584	1.0369	14.7512	0.7648
4	1.1288	0.1994	3.5036	0.9108	1.5748	0.1225
5	9.4758	0.6299	10.1396	2.4187	5.1512	0.2560
6	11.6329	0.6538	9.6212	0.4380	7.6100	0.2177
7	14.5079	0.9209	10.5704	0.6854	9.2748	0.3587
8	12.6025	0.9013	11.6796	0.3558	9.6872	0.2968
9	13.9467	1.2520	14.4412	1.0657	11.0784	0.3002
10	14.3788	0.4722	14.9852	0.5435	11.4132	0.2988
11	16.3325	1.8074	15.2056	0.8371	12.4268	0.3087
12	18.4546	1.4523	18.4048	0.9365	13.3148	0.3753
13	17.4438	0.6121	15.9704	1.3762	14.2112	0.3842
14	17.4438	0.6121	16.6884	0.7135	13.4724	0.4566
15	17.0129	0.7825	17.3388	0.7040	14.3024	0.4160
16	17.8122	0.4565	16.6608	0.5360	15.0568	2.0877
17	19.4113	0.6859	18.5544	1.7530	16.1828	0.4952
18	18.1600	0.6096	17.7324	0.6131	16.3928	0.3334
19	17.0642	0.5513	17.0804	0.5289	17.0560	0.3589
20	20.5550	0.9907	17.6852	0.8430	16.8956	0.4033
21	18.9879	0.9238	16.8196	0.7814	16.0924	0.7132

EE: error estándar.

ANEXO VI

GRÁFICAS DE DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE ADIPOCITOS

Distribución de tamaño de adipocitos en ratas que consumieron caseína, soya y espirulina (promedio \pm EE, $n=5$, $P<0.05$).

