



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL TIPO DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA RECUPERACIÓN NUTRICIA
SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS A TRAVÉS DE LA RUTA DE mTORC1
DESPUÉS DE UN PERIODO DE DESNUTRICIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Cinthya Itzél Rodríguez Gaytán



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Lucía Cornejo Barrera
VOCAL: Dra. Iliana Elvira González Hernández
SECRETARIO: Dra. Nimbe Torres y Torres
1er. SUPLENTE: M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas
2° SUPLENTE: M. en C. Tania Gómez Sierra

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nimbe Torres y Torres _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Claudia Cecilia Márquez Mota _____

SUSTENTANTE:

Cinthya Itzél Rodríguez Gaytán _____

RECONOCIMIENTO

Esta tesis de Licenciatura se llevo a cabo bajo la dirección de la Dra. Nimbe Torres y Torres y la M. en C. Claudia Cecilia Marquez Mota, en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Se reconoce la asesoría de la M. en C. MVZ Esperanza Itzel Yáñez Muñoz y la Licenciada en Investigación Biomédica Básica Valeria López Salazar por la interpretación de los resultados de histologías para este trabajo.

El jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente:	M. en C. Lucía Cornejo Barrera.	Facultad de Química UNAM
Vocal:	Dra. Iliana Elvira González Hernández	Neuropsicofarmacología INNN
Secretario:	Dra. Nimbe Torres y Torres	Fisiología de la Nutrición, INCMSZ
Suplente:	M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas.	Facultad de Química UNAM
Suplente:	M. en C. Tania Gómez Sierra.	Facultad de Química UNAM

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Desnutrición	4
3.1.1. Tipos de desnutrición:.....	4
3.1.2. Consecuencias de la desnutrición en la salud.	5
3.1.3. Situación de la desnutrición en México	7
3.2. Recuperación nutricional	7
3.3. Proteínas de origen vegetal	9
3.3.1. Soya.....	9
3.3.2. Maíz.....	10
3.3.3. Frijol	10
3.4. Aminoácidos	11
3.5. Los nutrimentos como sensores y sus posibles blancos	14
3.5.1. mTOR (MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN).....	16
3.6. Síntesis de proteínas en el hígado	22
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. OBJETIVOS	24
5.1. Objetivo general	24
5.2. Objetivos específicos	24
6. HIPÓTESIS	25
7. METODOLOGÍA	26
7.1. Animales de experimentación	27
7.2. Diseño de las dietas	27
7.2.1. Diseño de dietas con 20% de proteína.....	28
7.2.2. Cambio de la dieta.....	29
7.3. Eutanasia	30
7.4. Medición de parámetros bioquímicos e insulina en suero	30
7.5. Extracción y cuantificación de RNA	31
7.5.1. Cuantificación de RNA.....	32
7.5.2. Reacción de transcripción reversa para la generación de cDNA a partir del RNA extraído.....	32
7.5.3. PCR en tiempo real.....	33
7.6. Determinación y cuantificación de proteína por Western Blot	33
7.6.1. Extracción de proteína.....	34
7.6.2. Western Blot.....	34
7.7. Aminogramas	35
7.8. Estudio histomorfológico	35

7.9. Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS	37
8.1. Análisis de aminoácidos de las diferentes proteínas	37
8.2. Efecto de los tratamientos dietarios en el peso corporal y consumo de alimento.....	39
8.3. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO	43
8.3.1. Glucosa en suero	44
8.3.2. Insulina en suero	46
8.3.3. Albúmina en suero.....	48
8.3.4. Triglicéridos en suero	50
8.3.5. Colesterol en suero.....	52
8.4. EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO	54
8.4.1. Expresión génica de mTOR.....	55
8.4.2. Expresión génica de S6K.....	57
8.4.3. Expresión génica de eIF4e	59
8.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEÍNICA	60
8.5.1. Densitometría de mTORC1	60
8.5.3. Densitometría de 4E-BP1	65
8.6. ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICO	66
8.6.1. Grupo Caseína al 0.5%	67
8.6.2. Caseína 20%	68
8.6.3. Soya.....	70
8.6.4. Frijol.	72
8.6.5. Maíz	74
8.6.1. Frijol/Maíz.....	76
8.6.1. Soya/Maíz	78
9. DISCUSIÓN.....	80
10. CONCLUSIONES.....	86
11. PERSPECTIVAS.....	88
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de mTORC1	17
Tabla 2. Composición de la dieta con un contenido de 0.5% de caseína	27
Tabla 3. Análisis proximal de los diferentes tipos de proteínas	28
Tabla 4. Composición de las dietas.....	29
Tabla 5. Sondas SYBR Green I empleadas	33
Tabla 6. Anticuerpos empleados	35
Tabla 7. Aminogramas de las diferentes proteínas o combinación de proteínas ..	38
Tabla 8. Valores promedios de peso corporal y consumo de alimento durante todo el estudio.	39
Tabla 9. Valores normales de los parámetros bioquímicos	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Catabolismo de los aminoácidos (31).	13
Figura 2. Mecanismos por los cuales los aminoácidos modulan la señalización celular.	16
Figura 3. Representación de los componentes de los complejos de mTORC.....	17
Figura 4. Factores externos que activan a la vía de mTORC1 y mecanismos que regula. En azul se indican los factores que activan a mTORC1, en verde se indican las rutas que activan y e rojo se denotan los factores que inhiben a mTORC1 y las rutas que inhibe (36).....	19
Figura 5. Blancos de mTORC1.	22
Figura 6. Esquema del metabolismo de aminoácidos en hígado (29).....	23
Figura 7. Diagrama del diseño del estudio.	26
Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios sobre la ganancia de peso corporal de los animales.	41
Figura 9. Consumo de alimento.	42

Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de glucosa en suero (mg/dL).	44
Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de insulina en suero (ng/dL).	46
Figura 12. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de albúmina en suero (g/dL).	48
Figura 13. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de triglicéridos en suero (mg/dL).	50
Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de colesterol en suero (mg/dL).	52
Figura 15. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de mTOR en hígado, a través de PCR en tiempo real.	55
Figura 16. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de S6K en hígado, a través de PCR en tiempo real.	57
Figura 17. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de eI4E en hígado a través de PCR en tiempo real.	59
Figura 18. Análisis densitométrico del western blot de mTORC1 en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación.	61
Figura 19. Análisis densitométrico del western blot de S6K en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación.	63
Figura 20. Análisis densitométrico del western de 4E-BP1 en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación.	65
Figura 21. Histologías de hígado ratas alimentadas con 0.5% caseína 20X.	67
Figura 22. Histologías de hígado de ratas alimentadas con caseína 20% al día 1, día 7 y día 14 20X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).	68
Figura 23. Histologías de hígado ratas alimentadas con soya 20% en el día 1, día 7 y día 14 20X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).	70

Figura 24. Histologías de hígado de ratas alimentadas con frijol 20% día 1, día 7 y día 14 20X y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).....	72
Figura 25. Histologías de hígado de ratas alimentadas con maíz 20% día 1, día 7 y día 14 20X y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).....	74
Figura 26. Histologías de hígado de ratas alimentadas con frijol 10% / maíz 10% día 1, día 7 y día 14, 40X y 20X.Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).	76
Figura 27. Histologías de hígado de ratas alimentadas con soya 10%/ maíz 10% día 1, día 7 y día 14 20X y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).	78

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Actualmente existe una gran variedad de concentrados proteínicos que podrían ser utilizados como estrategias dietarias para combatir problemas de desnutrición tanto en niños, como en personas de la tercera edad o en pacientes hospitalizados en el proceso de recuperación nutricia. **OBJETIVO GENERAL** Estudiar el efecto de la calidad nutrimental de diferentes tipos de proteínas de origen vegetal (frijol, maíz, soya y la combinación de estas), sobre la síntesis de proteínas por medio de la ruta de mTORC1 en hígado después de un periodo de desnutrición en ratas macho Sprague Dawley. **JUSTIFICACIÓN.** Actualmente, no se tiene conocimiento específico de los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes tipos de proteínas vegetales sobre la recuperación nutricia, es por eso que en el presente estudio se analizará la calidad nutrimental de diferentes proteínas vegetales sobre la recuperación nutricional después de un periodo de desnutrición. **HIPOTESIS.** Las ratas que consuman dietas con proteínas de alta calidad (caseína, soya, soya/maíz, frijol/maíz) tendrán una mejor recuperación después del periodo de desnutrición, esto se verá reflejado en la ganancia de peso, en la concentración de albúmina y probablemente inducirá la expresión de mTORC1 y sus blancos S6K y 4E-BP1. **RESULTADOS.** Los grupos que presentaron una mayor ganancia de peso fueron los que consumieron las dietas con caseína, soya, soya/maíz y frijol/maíz que presentaron una ganancia de peso del 74.43%, 66.70%, 66.80% y 64.09% respectivamente. El grupo que tuvo una menor ganancia de peso fue el de maíz con un 19.28%. Respecto a los parámetros bioquímicos que se midieron (glucosa, insulina, albúmina, triglicéridos y colesterol), con la mayoría de los tratamientos dietarios de recuperación, los animales mantuvieron niveles normales de éstos durante los tres días de recuperación, a excepción de insulina, debido a que el consumo de caseína al 20% provocó alteraciones principalmente en el día siete. La expresión génica de mTOR tiende a aumentar después de un día de consumir las dietas de recuperación y disminuye en los días siete y catorce a excepción de las ratas alimentadas con soya, en donde la expresión aumenta conforme pasa el

tiempo, en el caso de S6K y eIF4e no se observa una tendencia en su expresión génica en relación con el consumo de las dietas de recuperación. Se determinó la relación entre la expresión de proteína total/proteína fosforilada de mTORC, S6K y 4E-BP1, en las tres proteínas se observó una mayor expresión después de haber consumido las dietas de recuperación al primer día por una hora de consumo, aunque los únicos tratamientos que lograron mantener la fosforilación tanto de S6K como de 4E-BP1 fueron las mezclas de frijol/maíz y soya/maíz. El análisis histomorfológico del tejido hepático mostró una degeneración hidrópica y acumulación de grasa en todos los grupos experimentales, siendo los grupos que consumieron caseína al 20% y maíz los que presentaron más daño (ya que conforme pasaban los días de recuperación la ingesta de estas proteínas provocó que la acumulación de grasa fuera incrementando). Por otro lado, el consumo con frijol/maíz y soya favoreció la recuperación de los daños desarrollados a consecuencia de la desnutrición. **CONCLUSIÓN.** Se logró desarrollar un tipo de desnutrición severa en las ratas Sprague Dawley, (al mostrar un 50% de peso menor con respecto a las ratas que fueron alimentadas con caseína al 20% durante la recuperación). Las mejores proteínas para la recuperación de peso de las ratas después de un periodo de desnutrición fueron caseína, soya, soya/maíz y frijol/maíz. El tratamiento dietario con maíz, fue el peor para la recuperación. La dieta con caseína es buena para la recuperación de peso, sin embargo origina picos elevados de insulina. Aunque todos los tratamientos dietarios activaron la ruta de mTORC1 al día 1, los únicos tratamientos que mantuvieron la activación de los dos blancos durante los tres días de recuperación fueron las mezclas frijol/maíz y soya/maíz. Respecto al análisis histomorfológico se puede concluir que el periodo de desnutrición al cual fueron sometidas las ratas, fue suficiente para ocasionar signos de esteatosis. Y los tratamientos dietarios, con los cuales los animales fueron disminuyendo la acumulación de grasa fueron con frijol/maíz y soya.

2. INTRODUCCIÓN

La desnutrición de tipo primario es el resultado del consumo insuficiente de alimentos. Una opción para combatir el problema de desnutrición es el consumo de alimentos que contengan proteínas de alta calidad; sin embargo, el costo de estas proteínas que por lo general son de origen animal, los hace inaccesibles a la población en riesgo, por lo cual la industria farmacéutica ha incrementado el interés en el estudio de ciertas proteínas o de combinaciones de proteínas para su posible utilización en la recuperación nutricional tanto en niños, como en personas de la tercer edad debido a su posible papel en un aumento en la síntesis de proteínas durante el proceso de recuperación (1).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la calidad nutricional de diferentes proteínas de origen vegetal: frijol, maíz, soya, y la combinación de estas (soya/maíz y frijol/maíz) en la recuperación nutricional de ratas después de un periodo de desnutrición severa. Se eligieron estas proteínas debido a que son las de mayor acceso a la población en comparación con las proteínas de origen animal y se ha reportado que la combinación de proteínas vegetales mejora su calidad nutricional. Es de gran importancia conocer los mecanismos de acción a nivel molecular de las diferentes proteínas de origen vegetal sobre la recuperación nutricional después de un periodo de desnutrición. Se ha reportado que los aminoácidos de cadena ramificada principalmente leucina, regulan la expresión del blanco mecanístico de rapamicina mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex1), proteína involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas (2).

3. ANTECEDENTES

3.1. *Desnutrición*

La OMS define la desnutrición “como el desequilibrio entre aporte y necesidades de nutrimentos y calorías que aseguren el crecimiento, el mantenimiento y las funciones específicas”(3); por otro lado, la FAO la define como una condición patológica inespecífica, sistémica y que puede ser reversible siempre y cuando sea diagnosticada a tiempo y adecuadamente. La desnutrición generalmente se asocia a la ingesta insuficiente de alimentos con respecto a los requerimientos de energía, proteínas, o ambas, así como a la calidad de los mismos, trayendo como consecuencia afectaciones en el desarrollo de los individuos y la aparición de enfermedades (4), (5) (6).

3.1.1. *Tipos de desnutrición:*

La desnutrición se puede diagnosticar inicialmente mediante la observación directa, ya que permite identificar si la persona presenta delgadez extrema o piernas hinchadas. Es posible clasificarla a través de la medición de talla, peso corporal y la evaluación de diferentes medidas antropométricas con lo cual se puede determinar el grado de desnutrición mediante el uso de estándares de referencia (5).

La desnutrición se presenta con más frecuencia en la población infantil, debido a que es la población más vulnerable, principalmente porque es ahí, donde la etapa de crecimiento puede ser afectada, así como también el desarrollo físico y mental. Las principales características de la desnutrición infantil son las siguientes:

- a) El infante es más pequeño de lo que respecta a su edad.
- b) El peso corporal es poco para la altura.
- c) El peso corporal es menor de lo que le corresponde a su edad (5).

Por lo general las manifestaciones que se presentan, corresponden al tipo específico de carencia. Por ejemplo la altura baja refleja carencias nutricionales durante un tiempo prolongado, mientras que el peso bajo es un indicador de

carencias agudas (5). Por lo tanto, dependiendo el estado en el que se encuentre el niño, será el tipo de desnutrición que tenga. A continuación se presentan los tipos de desnutrición:

- I. **Desnutrición crónica:** se caracteriza por tener un retraso en el crecimiento, se mide comparando la talla con el estándar recomendado para la edad. Este tipo de desnutrición es un indicador de carencia de nutrimentos necesarios durante un tiempo prolongado, lo cual afecta principalmente el desarrollo físico y mental.

- II. **Desnutrición aguda moderada:** la característica principal de este tipo de desnutrición es que el peso es menor de lo que corresponde a su talla. Los parámetros antropométricos que se miden son la altura, el perímetro del brazo y el peso corporal, los cuales están por debajo del estándar de referencia. Es importante que este tipo de desnutrición sea atendido lo más pronto posible ya que de no ser así puede agravarse.

- III. **Desnutrición aguda grave o severa:** es el tipo más crítico, el riesgo de muerte es nueve veces más que para un infante sano. La característica más común es que el peso se encuentra muy por debajo del estándar de referencia para la talla. De forma similar al diagnóstico de la desnutrición aguda moderada, las medidas que se realizan son el peso corporal, la talla y el perímetro del brazo (5).

3.1.2. Consecuencias de la desnutrición en la salud.

Una alimentación deficiente de forma crónica, especialmente en energía y proteína, además de una cantidad insuficiente de todos los nutrimentos trae como consecuencia una desnutrición energética proteínica (DEP). Esta desnutrición se caracteriza por un consumo progresivo del músculo y del tejido adiposo, sin afectar el tejido visceral y ocasiona una disminución en la producción y tamaño de las células, afectando el desarrollo del crecimiento y la inmunidad celular.

La desnutrición energética proteínica a un nivel severo tiene dos formas clínicas graves: el marasmo y el Kwashiorkor. Los cuales no solo se atribuyen a una alimentación inadecuada, también están muy relacionadas con enfermedades infecciosas, debido a que los individuos desnutridos son muy susceptibles a este tipo de enfermedades (7).

El marasmo, es un padecimiento originado a consecuencia de una ingestión inadecuada de energía, proteínas, vitaminas y nutrientes inorgánicos por largo tiempo y donde el metabolismo se ha adaptado a esas condiciones, a fin de prolongar la vida protegiendo los órganos esenciales y la función cerebral. El marasmo se caracteriza por un retraso severo en el crecimiento y por la pérdida de más del 10% de peso corporal, principalmente de masa muscular (emaciación), causando daño renal y problemas con la homeostasis hidroelectrolítica y ácido-base (8) (9) (7).

Cuando hay una prolongada alimentación carente de proteína, vitaminas y nutrientes inorgánicos con una aparente adecuada ingestión de energía, principalmente se produce una desnutrición del tipo proteínica, la que en lugar de un consumo progresivo de tejido adiposo, es el tejido muscular el que se ve más afectado, además de causar daño a nivel hepático con la formación de hígado graso (esteatosis) y aumento del tamaño del mismo. También se presenta una disminución importante de proteínas plasmáticas, principalmente de la albúmina, que si desciende a 2.5 mg/dL o menos, ocasiona una alteración importante en la osmolaridad plasmática que llega a producir un síndrome edematoso agudo, conocido mejor como kwashiorkor, este padecimiento se llega a producir en corto plazo incluso en un periodo de semanas (9). Comparado con el marasmo, el Kwashiorkor es a consecuencia de la interacción entre la carencia de nutrientes y la respuesta al daño, infección y estrés oxidativo (7).

De forma general, la desnutrición se acompaña de diferentes manifestaciones dentro de las cuales se encuentran alteraciones bioquímicas como disminución en las concentraciones de albúmina en suero y alteraciones a niveles funcionales y anatómicos (6).

Este padecimiento también daña funciones celulares de manera progresiva, afectando en primer lugar el depósito de nutrientes y posteriormente la reproducción, el crecimiento, la capacidad de respuesta al estrés, el metabolismo energético, los mecanismos de comunicación y de regulación intra e intercelular. Además provoca una depleción en los depósitos proteínicos corporales, ocasionando debilidad por sarcopenia y riesgo de caídas en los adultos mayores (10).

3.1.3. Situación de la desnutrición en México

En México, aunque se ha avanzado en los últimos años por combatir la desnutrición infantil, las cifras siguen siendo alarmantes en algunos sectores de la población. En el grupo de edad de entre cinco a catorce años, la desnutrición crónica es de 7.25% en las poblaciones urbanas y la cifra se duplica en las rurales, debido a la poca disponibilidad de alimentos de buena calidad. El riesgo de que un niño o niña indígena se muera por diarrea, desnutrición o anemia es tres veces mayor que entre la población no indígena (11).

Según datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012), la prevalencia de desnutrición crónica (baja talla para la edad) en población indígena es de 33.1%, siendo los estados de Guerrero, Tabasco, San Luis Potosí, Edo de México, Chiapas y Campeche los de mayor carencia en el acceso a la alimentación (4).

La prevalencia de desnutrición en adultos mayores es del 1 al 15% en ancianos ambulatorios, de 17 a 70% en adultos que se encuentran en hospitalización y hasta 85% de los que se encuentran en los asilos (10).

3.2. Recuperación nutricional.

En la recuperación nutricional es importante prestar mucha atención a la alimentación, no sólo porque ocupa un lugar central en el tratamiento, sino porque una alimentación inadecuada puede contribuir a la muerte del paciente con desnutrición aguda, particularmente en los primeros días del tratamiento. Para el

tratamiento nutricional en la fase de urgencia deben emplearse fórmulas líquidas que le aseguren al paciente, el aporte proteínico y energético necesarios para su recuperación, ya que si se da menos de lo requerido, el estado de desnutrición empeorará. En contraste, si el aporte es mayor al requerimiento, se puede experimentar un desequilibrio metabólico grave. Por esta razón es fundamental conocer que alimentos pueden ser la mejor opción para una recuperación satisfactoria. Es importante tomar en cuenta que el tratamiento nutricional debe de llevarse a cabo complementándolo gradualmente con otros alimentos, especialmente con los que puedan estar disponibles en el hogar (12).

En distintos países de América Latina, las medidas que se están llevando a cabo para la recuperación nutricional de personas con desnutrición, se basan en la complementación alimentaria; por ejemplo, en Colombia se emplea la Bienesterina la cual está hecha a base de harina de trigo, fécula de maíz, harina de soya y leche entera en polvo suplementada con vitaminas y minerales. De igual manera se encuentra la Incaparina empleada en los países de América central, ésta es elaborada a base de harina de maíz y de soya (13), (14).

En México los complementos alimenticios que se dan son el Nutrisano para los niños y el Nutrivida para mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, los cuales están elaborados a base de concentrado de soya y/o leche en polvo, adicionados con todas las vitaminas y nutrimentos inorgánicos indispensables en la dieta que son necesarios para esas etapas. Sin embargo, en estudios previos se ha observado que las personas prefieren flexibilidad en uso (variabilidad de alimentos) y en cantidad de alimentos por consumir (15).

La mejor manera de enfrentar la desnutrición, es teniendo mayor acceso a los diferentes tipos de alimentos; sin embargo, no toda la población lo tiene, debido al elevado costo que tienen, principalmente los alimentos de origen animal, que se caracterizan por tener proteínas de buena calidad, las cuales cubren el requerimiento de aminoácidos indispensables (16). Una opción para cubrir el requerimiento de aminoácidos indispensables es a través del consumo de proteínas de origen vegetal, las cuales son muy heterogéneas en su calidad

química. Las proteínas derivadas de algunas leguminosas, como la de la soya, son de mediana calidad, en tanto que algunas otras, como las proteínas de cereales presentan deficiencia de varios aminoácidos, lo que las hace proteínas de baja calidad. Se sabe que al combinar proteínas de leguminosas con proteínas provenientes de los cereales, éstas se complementan entre sí generando una proteína de buena calidad. Adicionalmente, 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 (17), (18).

3.3. Proteínas de origen vegetal.

Uno de los nutrimentos básicos para la recuperación de la desnutrición, es la proteína. El valor nutrimental de las proteínas depende principalmente de la composición de aminoácidos indispensables en la dieta que contengan y de su valor biológico (19),(20).

Las proteínas de origen vegetal contribuyen aproximadamente con el 65% del suministro per cápita de proteína (21). Se han realizados diferentes estudios en donde se demuestra que la soya, tiene un alto valor biológico de 78% PDCAAS (22).

Por otro lado, existen proteínas vegetales que por sí solas son de muy baja calidad; sin embargo, con la combinación de otra proteína se puede llegar a obtener una de buena calidad, tal es el caso del maíz (23). Es por eso que en el presente estudio se evaluará el efecto que tienen las proteínas de soya, maíz y frijol negro y la combinación de estas en la recuperación nutricional.

3.3.1. Soya.

La soya es una leguminosa de la familia de las papilionáceas, a la que pertenecen el chícharo y el ejote. La proteína de soya contiene todos los aminoácidos indispensables requeridos en la nutrición humana: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina e histidina. Sin embargo, su contenido de metionina es ligeramente bajo por lo que se complementa al

combinarse con cereales generando una proteína de buena calidad. En México la soya es un grano de bajo consumo, en comparación con el de frijol y el de maíz. (24),(25).

3.3.2. Maíz.

El maíz (*Zea mays*), además de poseer un fuerte contenido socio-cultural, es el alimento básico en nuestro país, que de forma tradicional se consume como tortilla. Pertenece a la familia de las gramíneas (planta anual alta llena de un amplio sistema radicular fibroso), la cual es una especie que se reproduce por polinización cruzada, donde la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se distribuyen en distintos lugares de la planta (26).

La composición del maíz es muy similar a la de otros cereales; sin embargo su proteína es mejor comparada a la del trigo y ligeramente inferior a la del arroz. Sin embargo para que tenga una mejor calidad proteínica, es necesaria la complementación con otro alimento, ya que por sí sólo no cubre los requerimientos de aminoácidos indispensables, es rico en leucina pero no en lisina. Para obtener una mejor calidad nutricional del maíz se debe consumir junto con otras fuentes de proteínas que complementen su deficiencia en aminoácidos, como por ejemplo las leguminosas como el frijol y la soya (27).

3.3.3. Frijol

Al igual que el maíz, el frijol es considerado un producto tradicional mexicano estratégico para el desarrollo rural del país. Taxonómicamente, el frijol corresponde a la especie del género *Phaseolus*, su nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L. Se ha reconocido que probablemente el centro principal de diversificación del frijol haya sido México. El cultivo de esta leguminosa se considera uno de los más antiguos. Existen más de 70 variedades entre negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados (28), (29).

Diversas investigaciones han destacado las propiedades nutritivas que posee el frijol, principalmente por su alto contenido de proteína, vitaminas, minerales y en menor medida en hidratos de carbono. Dependiendo del tipo de frijol, el contenido

de proteínas puede variar del 14 al 33%, siendo rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), aunque es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína). Sin embargo, de acuerdo a evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína del frijol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% , comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100% (29), (30).

Los resultados de dichos estudios indican las razones del por qué las culturas mesoamericanas, desde tiempos inmemoriales basaron su alimentación en el frijol y el maíz, al igual que la razón del por qué en la actualidad continúan siendo complementos básicos entre la población de Mesoamérica (30). En todo el mundo, y especialmente en los países en desarrollo, la dieta se basa normalmente en el consumo de un cereal, por lo general maíz, sorgo o arroz, y de una leguminosa, como los frijoles o la soya. Diversos estudios han mostrado que estos dos grupos de alimentos fundamentales, se complementan en términos de aminoácidos indispensables entre sí, ya que el frijol es carente de leucina, mientras que el maíz es de triptófano y lisina (27). Sin embargo, aun no se estudia a nivel de la nutrigenómica como es que estas proteínas tienen un impacto sobre la síntesis de proteínas.

3.4. Aminoácidos.

Los aminoácidos tienen diferentes funciones en el organismo, pero principalmente sirven como unidades básicas de los péptidos que posteriormente darán origen a las proteínas corporales, que son fundamentales para el proceso de crecimiento, principalmente en los niños. También los aminoácidos forman parte de péptidos que son importantes a nivel fisiológico, y son precursores de todas las sustancias nitrogenadas del organismo como porfirinas, purinas, pirimidinas, creatina, carnitina, amino azúcares, entre otros (31).

En el código genético solo se consideran veinte aminoácidos, los cuales son los que se encuentran regularmente en las proteínas y en algunos casos sufren modificaciones después de su incorporación a éstas. Los aminoácidos entran a la

células de los diferentes tejidos, a través de diferentes transportadores específicos (32).

La fuente principal que provee los aminoácidos indispensables para el organismo, son las proteínas de la dieta ya sean de origen animal o vegetal. Al ingerirse, se hidrolizan en el tracto gastrointestinal, dando lugar a la liberación de aminoácidos y péptidos de pequeño peso molecular que son absorbidos por las células de la mucosa. Algunos aminoácidos son utilizados en este tipo de células para funciones energéticas y para el recambio tisular, mientras que otros sufren ciertas modificaciones metabólicas para otro tipo de funciones en otros órganos (31) (32).

Todas las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el organismo provienen de los aminoácidos, razón por la cual, metabólicamente los aminoácidos tienen diferentes rutas; por ejemplo, participan en la síntesis de glucosa, de aminoácidos no esenciales, de péptidos y proteínas, así como la formación de otros compuestos nitrogenados (31).

Por lo general cuando se ingieren cantidades adecuadas de aminoácidos, el proceso de anabolismo es llevado a cabo de forma adecuada, pero si la ingesta es alta o baja el catabolismo es el que se activa. Las tres situaciones metabólicas en las cuales los aminoácidos sufren degradación oxidativa son:

- a) Algunos aminoácidos que son liberados en la degradación normal de proteínas celulares, se catabolizan si no se necesitan para la síntesis de nuevas proteínas.
- b) Cuando se exceden las necesidades corporales de aminoácidos para la síntesis de proteínas, el exceso se cataboliza ya que los aminoácidos no se pueden almacenar.
- c) Al padecer estados de inanición y/o diabetes mellitus, las cantidades de glucosa son bajas o no pueden ser utilizados adecuadamente por lo que se recurre a las proteínas celulares como fuentes de energía (33).

Cada uno de los 20 aminoácidos al tener diferente grupo R, tienen diferentes rutas metabólicas; sin embargo, las 20 rutas catabólicas convergen para formar sólo seis productos principales, que entran en el ciclo de ácido cítrico. A partir de aquí, los esqueletos carbonados se pueden desviar hacia la gluconeogénesis o la cetogénesis o se pueden oxidar completamente a CO₂ y H₂O (33).

Diez de los esqueletos carbonados de aminoácidos se degradan, total o parcialmente, dando como producto final acetil-CoA. Cinco aminoácidos se convierten en α-cetoglutarato, cuatro en succinil-CoA, dos en fumarato y dos en oxalato. Partes, o la totalidad de seis aminoácidos se convierten en piruvato, que puede convertirse en acetil-CoA o en oxalacetato (33). Hay algunos aminoácidos que se degradan en diversos compuestos a la vez, esto debido a que diferentes partes de sus esqueletos carbonados tiene distintos destinos. A continuación se muestra un diagrama general del catabolismo de los diferentes aminoácidos.

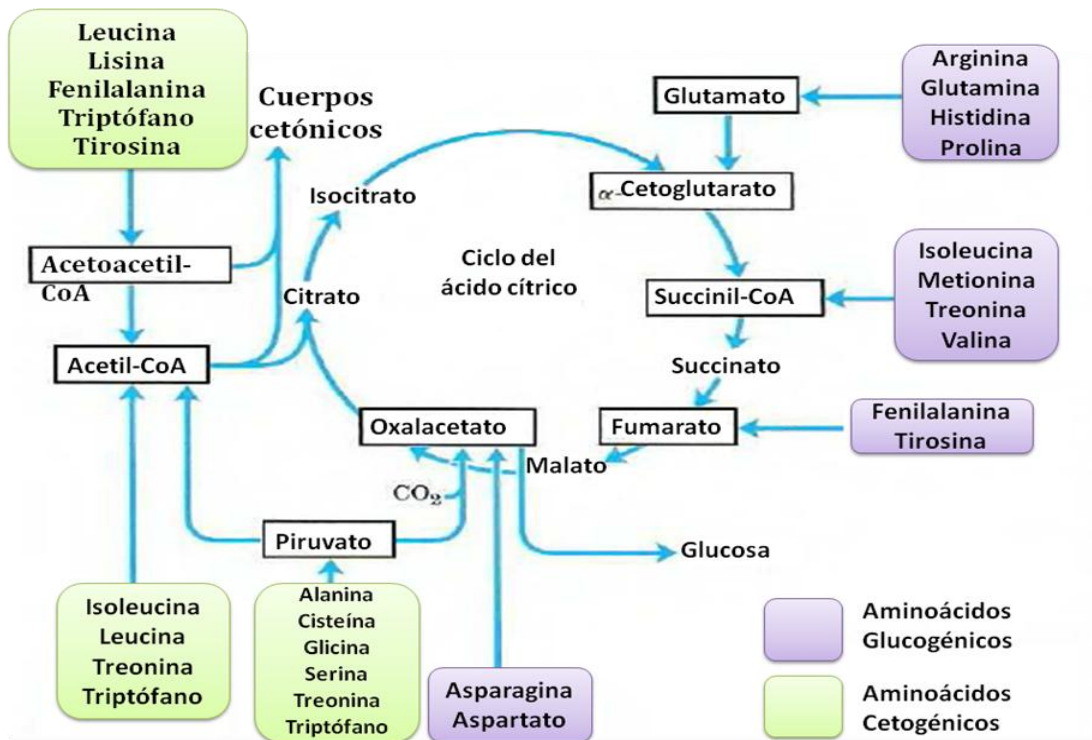


Figura 1. Catabolismo de los aminoácidos (33).

El requerimiento de proteína dietaria consta de dos componentes: 1) el requerimiento nutricional de aminoácidos indispensables (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina) para todas las funciones y los aminoácidos dispensables (cistina , tirosina, taurina, glicina, arginina, glutamina, prolina) para funciones fisiológicas y patológicas específicas y 2) la necesidad de nitrógeno no específico para la síntesis de los aminoácidos dispensables en la dieta (ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, alanina, serina) y para otros compuestos fisiológicamente importantes que contienen nitrógeno tales como ácidos nucleicos, creatina, y porfirinas. Con respecto al primer componente, es generalmente aceptado que los valores nutrimentales de varias fuentes de proteínas dietarias son determinadas en gran medida por la concentración y disponibilidad de los aminoácidos indispensables, debido a que la disponibilidad puede regular la expresión de genes, los transportadores de aminoácidos y los factores de traducción que dan lugar a la síntesis proteínica (20) (21).

3.5. *Los nutrimentos como sensores y sus posibles blancos.*

Ciertos nutrimentos tienen la capacidad de regular la función de las células más allá de su papel esencial en el metabolismo. En eucariotes, se ha considerado que los sistemas endocrino y neuronal desempeñan un papel importante en el control de la respuesta de los tejidos hacia la disponibilidad de nutrimentos. Actualmente se conoce que ciertos nutrimentos actúan a través de su receptor o “sensor” para activar y regular mecanismos de señalización celular como por ejemplo la expresión de genes.

Estos nutrimentos incluyen aminoácidos, glucosa, ácidos grasos, esteroides y el hierro, los cuales pueden contribuir a la regulación de ciertos mecanismos endocrinos. Por ejemplo la glucosa y los aminoácidos son moduladores potentes de la secreción de insulina y glucagón además de poder participar en la liberación de hormonas, recientemente identificadas, tales como los péptidos similares al glucagón (34).

En eucariotes la regulación de la función celular por los aminoácidos, se ha convertido en foco de interés, y actualmente es conocido que algunos miembros de este grupo heterogéneo de moléculas orgánicas ejerce un control regulador importante sobre los procesos celulares fundamentales, tales como la síntesis y degradación de proteína (35). Numerosos estudios han demostrado que la disponibilidad elevada de aminoácidos, sostiene por lo general el anabolismo, e inhibe el catabolismo en células eucariotas a través de incrementos en la abundancia de mRNA y la síntesis de proteínas (36), (37). Cuando los aminoácidos son escasos, los efectos anteriores se invierten, aunque la síntesis y la estabilidad de la traducción de genes específicos (en particular, los que participan en la biosíntesis o transporte de aminoácidos), puede aumentar mediante mecanismos específicos (36).

En contraste, aun no se logra comprender cómo es la naturaleza de la maquinaria celular que participa en la detección de aminoácidos y la iniciación de señales. Por ejemplo, aunque la señalización de la proteína cinasa mTOR es sensible a la disponibilidad de aminoácidos, no hay evidencia de que la cinasa es regulada directamente por los aminoácidos, lo que implica que la detección inicial y la señalización de éstos se encuentra regulada inicialmente por algún otro mecanismo antes de llegar a activar a esta proteína (34).

En la figura 2 se muestra un panorama general del efecto que tienen los aminoácidos en la célula, ya sea cuando hay suficiente disponibilidad o cuando hay una restricción de los mismos.

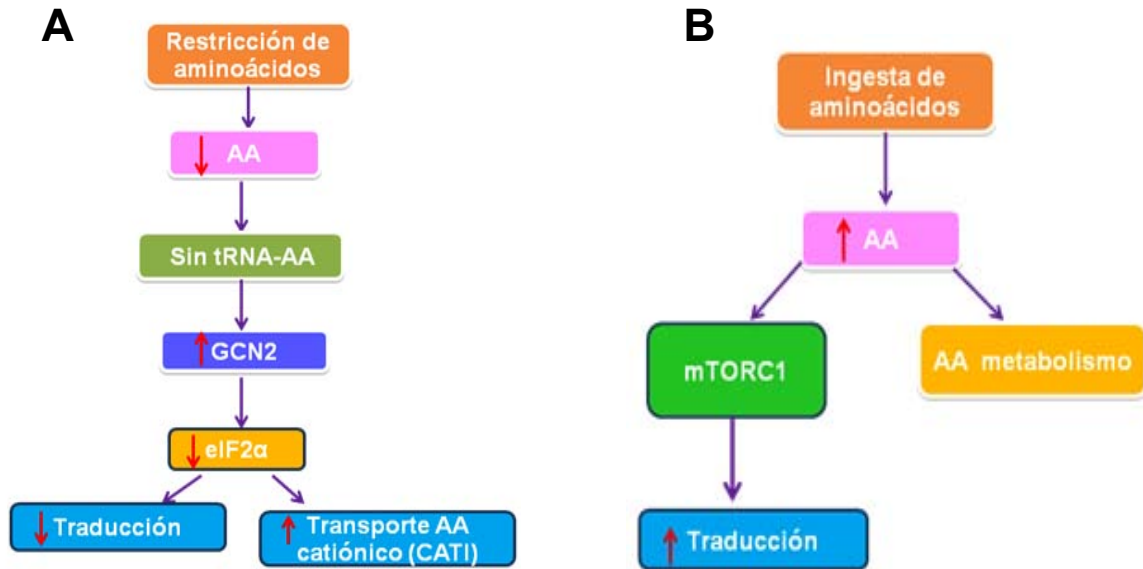


Figura 2. Mecanismos por los cuales los aminoácidos modulan la señalización celular (AA= aminoácidos; GCN2= General Control 2; eIF= Eukaryotic Initiation Factor; tRNA= Transfer Ribonucleic Acid.).

A. Mecanismo cuando hay una restricción de aminoácidos. En el momento en el que no hay una suficiente concentración de aminoácidos en la célula, hay una disminución en el contenido de RNA de transferencia cargado con aminoácidos, lo que disminuye el inicio de la traducción, sin embargo, como un mecanismo de rescate se favorece la síntesis de transportadores de aminoácidos catiónicos, para captar la mayor cantidad de aminoácidos disponibles. **B.** Mecanismo cuando hay suficiente disponibilidad de aminoácidos en la célula. Al haber un aumento en la concentración de aminoácidos, se favorece su metabolismo y se activa la ruta de señalización de mTORC1 (34).

3.5.1. mTOR (MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN).

La vía de mTOR, responde a diversos estímulos ambientales, controla muchos procesos que generan o utilizan grandes cantidades de energía y nutrientes. Cada vez es más evidente que la señalización de mTOR tiene impactos más importantes en lo que respecta a las funciones celulares, dándole un papel relevante a la regulación de los comportamientos celulares básicos como el crecimiento y la proliferación (38).

mTOR es una proteína cinasa serina/treonina de 289-kDa que pertenece a la familia PI3K que interactúa con varias proteínas para formar dos complejos distintos, nombrados complejos 1 (mTORC1) y 2 (mTORC2) (39).

Estos complejos tienen diferentes sensibilidades a la rapamicina, así como diferentes mecanismo de activación. mTORC1 está conformado por cinco componentes de proteína y mTORC2 por seis (40). En la figura 2 se ilustran los componentes de ambos complejos.

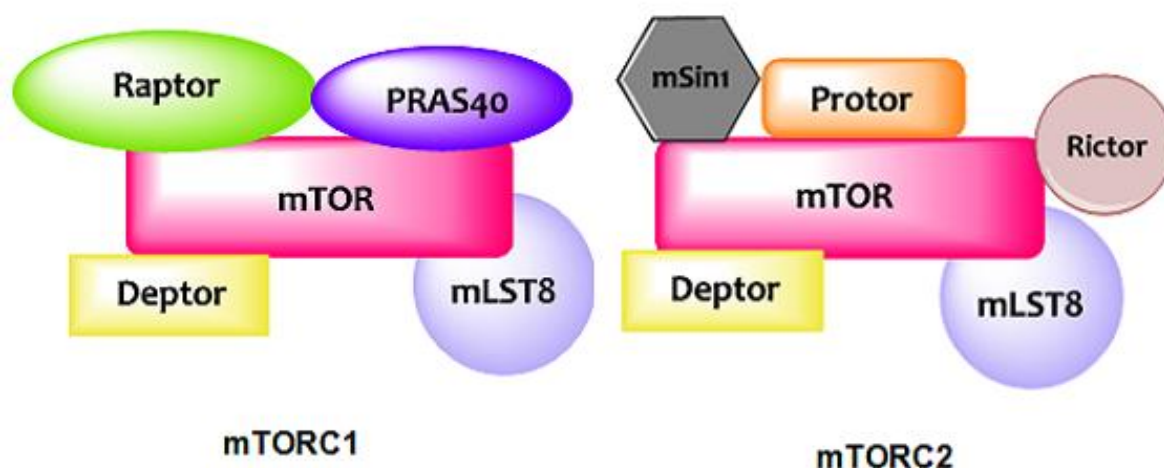


Figura 3. Representación de los componentes de los complejos de mTORC. El complejo 1 está conformado por cinco proteínas y el complejo 2 está formado por seis proteínas

Aunque la función exacta de todos los componentes de mTORC1 aun no es clara en la siguiente tabla se presentan en que podrían estar involucrados cada uno de los componentes de mTORC1 (38), (39).

Tabla 1. Componentes de mTORC1

Complejo	Descripción
Mtorc	Subunidad catalítica del complejo
Raptor	Proteína-regulador asociada a mTORC1, encargada de la regulación de unión de mTORC1 con sus sustratos (39).
	Sustrato de AKT abundante en prolina

PRAS 40	de 40 kDa. Es un inhibidor directo de mTORC. Su función se puede asociar, junto con Deptor, a promover la inhibición de mTOR cuando la actividad de éste disminuye (39).
mLST8 (también conocida como GβL)	Mammalian lethal. Con la proteína SecT18, actúa para estabilizar a mTOR (39)
Deptor	Contiene DEP-dominio. Inhibidor directo que regula la actividad quinasa de mTORC1 y mTORC2 (39).

Tras la activación de mTORC1, éste fosforila directamente PRAS40 y DEPTOR, lo que reduce su interacción física, activando su señalización (39).

3.5.2. Reguladores de mTORC1.

De los dos complejos de mTORC, el complejo 1 es el mejor conocido, una característica notable de esta ruta de señalización es el número y la diversidad de señales ascendentes que detecta. La vía mTORC1 responde a diferentes factores externos como: el estrés, los factores de crecimiento (como insulina), los niveles de energía, oxígeno y aminoácidos los cuales al activarlo favorecen la síntesis de proteínas, lípidos y la biosíntesis ribosomal e inhiben la autofagia (41), (38).

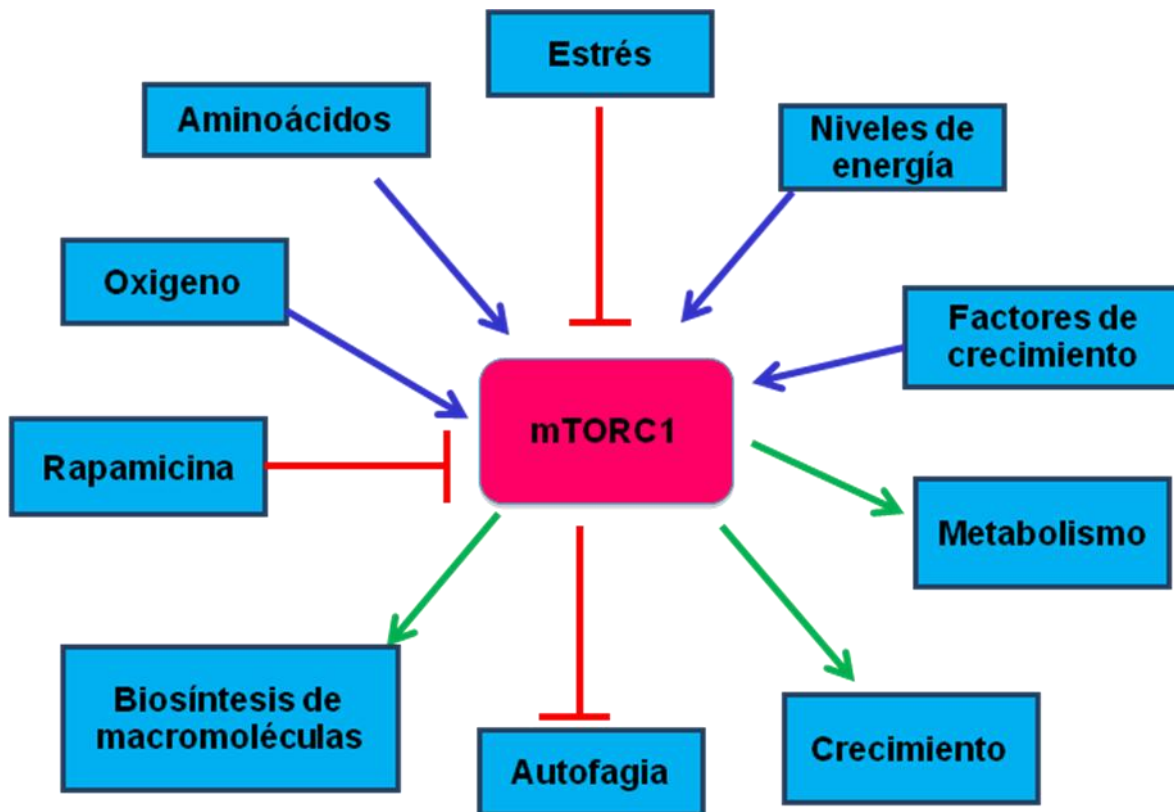


Figura 4. Factores externos que activan a la vía de mTORC1 y mecanismos que regula. En azul se indican los factores que activan a mTORC1, en verde se indican las rutas que activan y rojo se denotan los factores que inhiben a mTORC1 y las rutas que inhibe (38).

Uno de los reguladores claves de mTORC1 es el heterodímero que consta de esclerosis tuberosa 1 (TSC1; también conocido como hamartina) y TSC2 (también conocido como tuberina), TSC1 / 2 transmite muchas de las señales ascendentes que activan a mTORC1, incluyendo factores de crecimiento, tales como la insulina y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), que estimulan las vías PI3K y Ras (42), (38).

Otro de los factores externos que activan a mTORC1, el cual es el más importante para este estudio, son los aminoácidos, que aunque aún no se conocen cuales son los aminoácidos específicos necesarios para la activación de mTORC1, sí se sabe que si se eliminan aminoácidos como es el caso de la leucina, trae como consecuencia un impacto negativo sobre la activación de mTORC1 (41). La leucina contribuye a la activación de mTORC1; sin embargo, este aminoácido

debe estar presente junto con factores de crecimiento. Es importante destacar que los aminoácidos son indispensables porque aunque estén presentes los factores de crecimiento y otros estimuladores de mTORC1, la activación de esta proteína no es eficiente cuando los aminoácidos son limitados (41), (38).

Recientemente se ha demostrado que el metabolismo de la glutamina también puede estar involucrado en el control de mTORC1, además de que se requiere para que la leucina extracelular pueda activar a mTOR (41). Aunque se ha conocido durante algún tiempo que los aminoácidos actúan independientemente de TSC1/2, el mecanismo molecular mediante el cual mTORC1 detecta aminoácidos intracelulares aun sigue siendo un campo de investigación, pues aun se están encontrando nuevos componentes que ayudan a explicar de mejor manera esta señalización (41), (38).

3.5.3. Síntesis de proteínas regulada por mTORC1.

El mecanismo por el cual son sintetizadas las proteínas se llama traducción. Este consta de tres fases, la iniciación, la elongación y la terminación, siendo la fase de iniciación la más importante. Para poder llevarse a cabo, se necesita que distintos complejos multiproteicos regulen el proceso así como de estímulos externos, como los aminoácidos (36), (43). Básicamente el proceso de inicio de la traducción del mRNA, consta de dos pasos: el primero es la formación del complejo de pre-iniciación 43S, que contiene metilnionil-tRNA, eIF2 α , GTP y la subunidad 40 S ribosomal. El segundo paso (y en el que se tendrá más enfoque) es la unión del mRNA con el complejo de pre-inicio, por medio de un conjunto de proteínas eIF4 (factor de iniciación eucariotico 4), las cuales están compuestas por la E, A y G. La eIF4e es la primera que se une a la estructura 5'-cap del RNAm a través de la unión con la proteína eIF4G, posteriormente se le une la helicasa eIF4A y finalmente se une el complejo de pre-inicio 43 S ribosomal, dando inicio a la traducción (36), (44). Este paso está regulado principalmente por medio de la ruta de mTORC1, a través de sus blancos que controlan indirectamente este proceso.

Para que la unión entre el complejo eIF4e y la estructura 5'-cap del RNAm se lleve a cabo, es necesario que sucedan dos cosas: la primera, que eIF4e se encuentre fosforilada y la segunda que esté disponible, es decir que la proteína de unión 1 (4E-BP1) no esté unida a eIF4e, ya que si esto ocurre, no es posible que eIF4e se una al complejo eIF4G y por ende tampoco al 5'-cap del RNAm. Para esto es necesario que 4E-BP1 sea fosforilada (activada), lo cual es a través de mTORC1, la cual es activada por medio del estímulo de aminoácidos (36).

Otro elemento importante que forma parte del proceso de traducción, es la proteína S6K1 (S6 kinase 1) y el factor-2 de elongación eucariótico (eEF-2). Para que el mecanismo de elongación se lleve a cabo, es necesario que S6K este fosforilada para inactivar a la cinasa eEF-2. Principalmente, la activación de S6K es regulado por mTORC1, al estar activada S6K promueve la fosforilación de otra proteína ribosómica, S6, que conlleva al aumento de la traducción de subconjuntos de mRNA que contiene oligopirimidina en la parte terminal (TOP) en sus extremo 5', que están involucrados en la síntesis de proteínas ribosomales y son necesarias para llevar a cabo la traducción (36), (45).

Mediante el uso de inhibidores específicos del sitio activo de mTORC1, se ha demostrado que disminuye de manera global la tasa de síntesis de proteínas, lo cual indica que la ruta de mTORC1 tiene un papel importante en la regulación de la traducción (38). En la figura 6 se muestra como mTORC1 regula la iniciación de la traducción, mediante la activación de sus blancos.

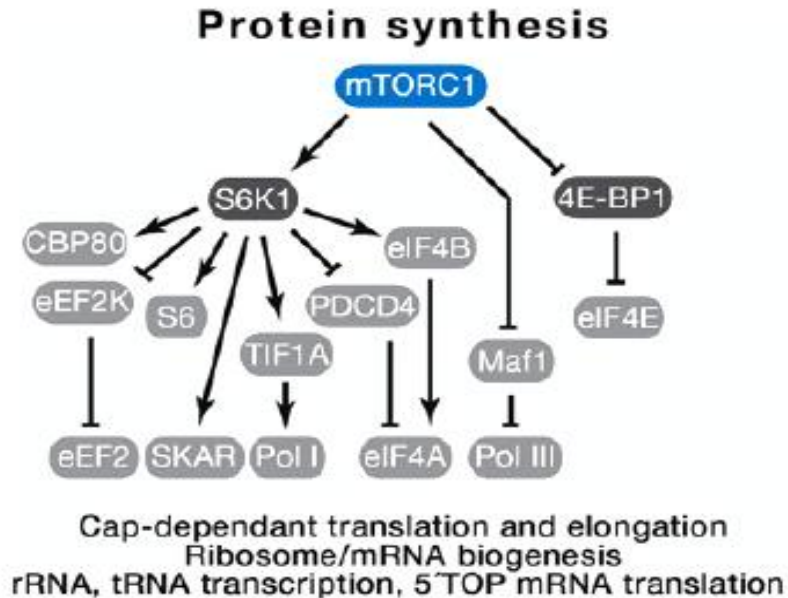


Figura 5. Blancos de mTORC1.

Los blancos mejor estudiados de mTORC1 son 4E-BP1 y S6K, los cuales están involucrados en el proceso de iniciación de la traducción. Tomada de Lapante y Sabatini 2012 (38).

3.6. Síntesis de proteínas en el hígado.

El hígado es un órgano con un papel esencial en la síntesis de proteínas y metabolismo de nutrimentos y además se encarga de múltiples funciones sintéticas, reguladoras y desintoxicadoras.

Este órgano participa en el metabolismo de la mayoría de nutrimentos. Su función consiste en regular las variaciones de la concentración de los nutrimentos en el plasma y mantener un suministro constante de los mismos a los tejidos periféricos.

En el metabolismo de hidratos de carbono, el hígado es el encargado del metabolismo y almacenamiento de la glucosa. En el metabolismo de lípidos, el hígado es el encargado de la síntesis de apoproteínas, fosfolípidos, colesterol, degradación y liberación de ácidos grasos así como de la cetogénesis. Con respecto al metabolismo de aminoácidos, el hígado es responsable de metabolizar gran parte de estos; lleva a cabo la síntesis de las principales proteínas plasmáticas como la albúmina, globulinas, fibrinógeno, entre otras, de la

degradación de proteínas y de la liberación de aminoácidos a la circulación para la síntesis proteínica.

El exceso de aminoácidos es degradado por medio del ciclo de la urea, convirtiendo al nitrógeno en urea, la que es excretada por los riñones. El esqueleto carbonado de los aminoácidos llega hasta el metabolismo intermedio, donde es transformado para la síntesis de la glucosa. (32), (46).

A continuación, se presenta de forma general un esquema del metabolismo de los aminoácidos en el hígado.

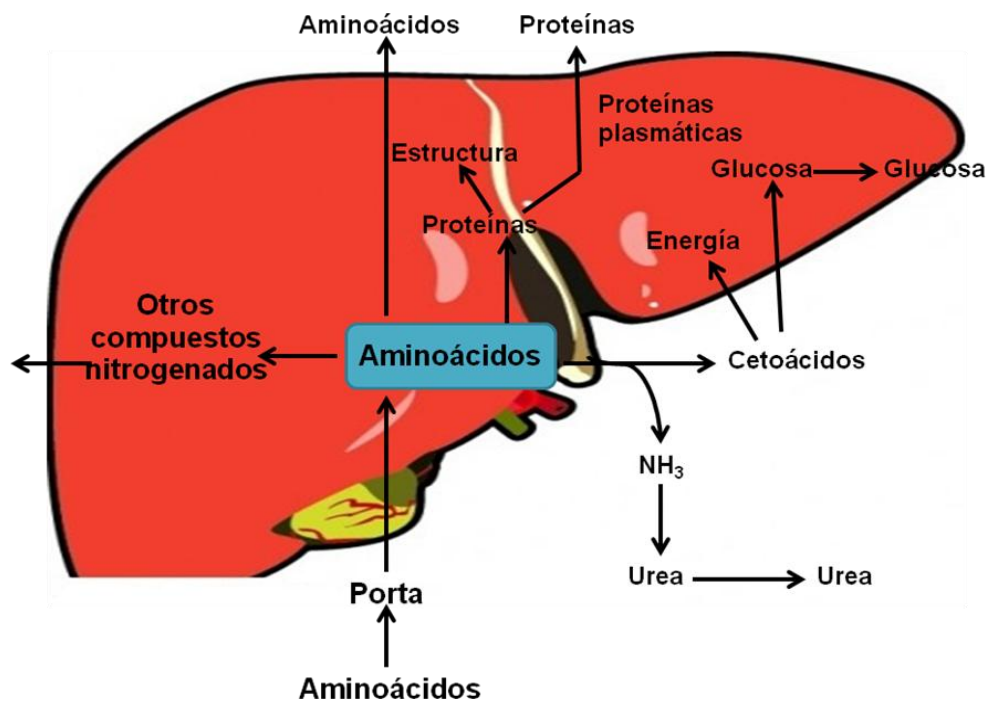


Figura 6. Esquema del metabolismo de aminoácidos en hígado (31).

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad México se encuentra en una situación de transición nutricional muy grave, por un lado la desnutrición y por el otro, problemas de obesidad. La primera afecta principalmente a la población infantil, adultos mayores y personas en hospitalización. Con el fin de combatir la desnutrición se ha propuesto como estrategia el empleo de diferentes tipos de proteínas (47).

Actualmente, no se tiene conocimiento específico de los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes tipos de proteínas vegetales sobre la recuperación nutricional, es por eso que en el presente estudio se analizará la calidad nutricional de diferentes proteínas vegetales, ya sean solas o en combinación, sobre la recuperación nutricional después de un periodo de desnutrición.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general.*

Estudiar el efecto de la calidad nutrimental de diferentes tipos de proteínas de origen vegetal, sobre la síntesis de proteínas por medio de la ruta de mTORC1 en hígado después de un periodo de desnutrición en un modelo en ratas.

5.2. *Objetivos específicos.*

- a) Desarrollar un modelo de desnutrición de ratas macho de la cepa Sprague Dawley, a través del consumo de una dieta con un contenido de proteína del 0.5% durante 21 días en horario restringido de 9 horas.
- b) Evaluar la recuperación de la desnutrición de las ratas desnutridas, empleando una dieta con un contenido de 20% de proteína, (caseína, aislado de proteína de maíz, soya, frijol, maíz/soya, maíz/frijol), en horario restringido de 9 horas.
- c) Determinar la expresión génica de mTOR, S6K y eIF4e, por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

- d) Determinar la abundancia de proteínas por Western Blot en hígado mTORC1, pmTORC1, S6K, pS6K, 4E-BP1 y p4E-BP1.
- e) Realizar el análisis histomorfológico de los hígados de las ratas en estudio.

6. HIPÓTESIS

Las ratas que consuman dietas con proteínas de alta calidad proteínica (caseína, soya, soya/maíz, frijol/maíz) tendrán una mejor recuperación después del periodo de desnutrición, lo cual se verá reflejado en la ganancia de peso, en la concentración de albumina y probablemente inducirá la expresión de mTORC1 y sus blancos S6K, pS6K, 4E-BP1 y p4EBP1.

7. METODOLOGÍA

Diagrama de flujo del experimento

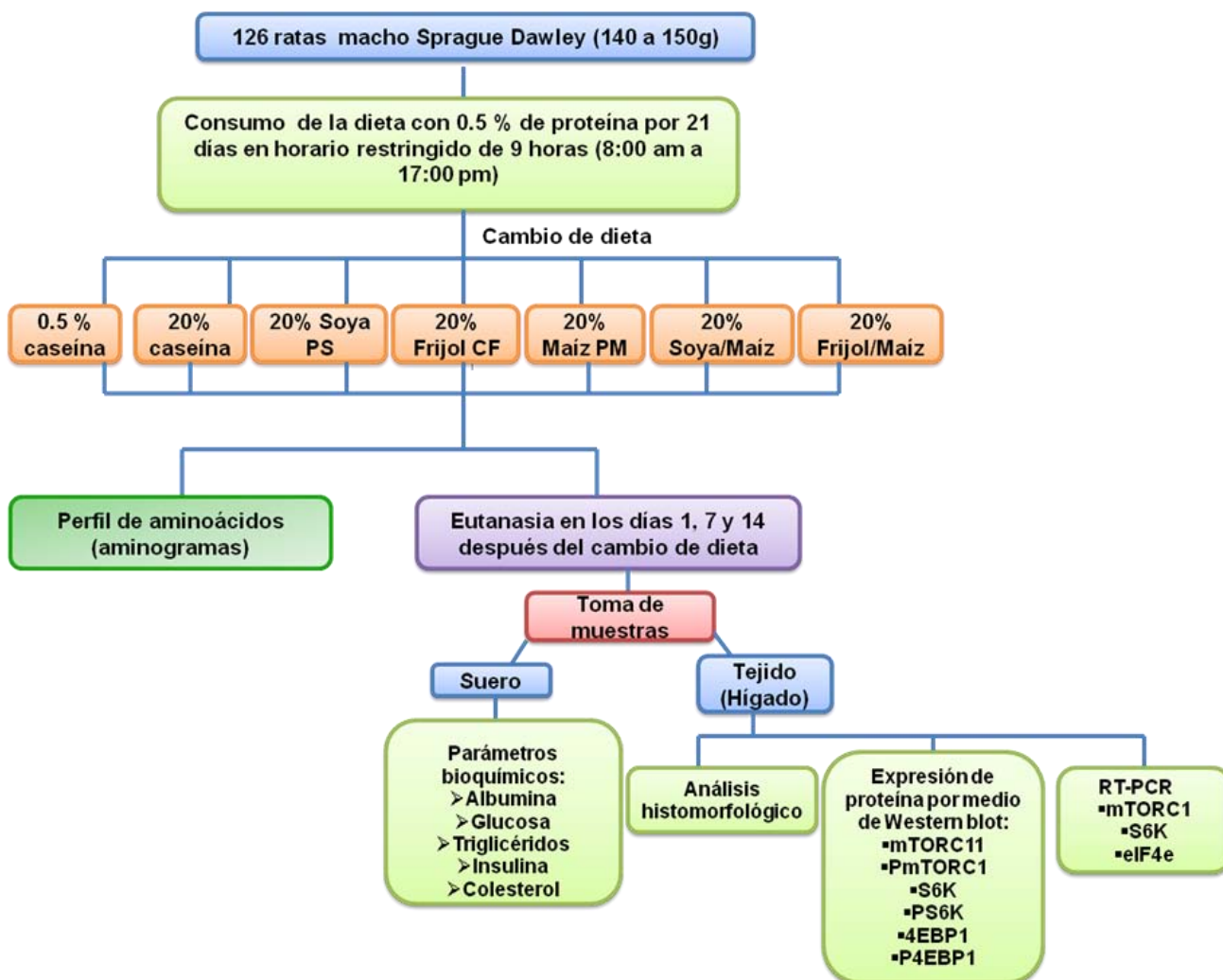


Figura 7. Diagrama del diseño del estudio.

PS (proteína de soya), CF (concentrado de frijol), PM (proteína de maíz)

7.1. Animales de experimentación

Para este estudio se utilizaron 126 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso inicial de 140 a 150 g (Harlan México), las cuales estuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en jaulas individuales con piso de malla, con temperatura controlada y con acceso libre a agua. Las ratas se alimentaron en horario restringido de nueve horas de las 8:00 horas a las 17:00 horas durante todo el tratamiento, por 21 días con una dieta al 0.5% de caseína y por 14 días con una dieta al 20% de diferentes tipos de proteínas.

El monitoreo de la ganancia de peso y el consumo de alimento se realizó durante los 35 días de estudio, midiendo el consumo de alimento todos los días y la ganancia de peso dos días a la semana.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán de acuerdo con los lineamientos internacionales para el uso de animales de experimentación.

7.2. Diseño de las dietas.

La dieta con 0.5% de caseína se realizó, ajustando las recomendaciones de la AIN-93 (American Institute of Nutrition) y es isoenergética con respecto a las otras dietas que más adelante se describen. En la tabla 2 se muestra la composición de la dieta (48).

Tabla 2. Composición de la dieta con un contenido de 0.5% de caseína

Componente	g/100 de dieta
Proteína	0.6
Almidón	52.0
Maltodextrinas	17.3
Sacarosa	13.1
Aceite de soya	7.0
Fibra	5.0
Mezcla de Minerales	3.5

AIN-93 MP	
Mezcla de vitaminas AIN-93 MP	1
L-cistina	0.3
Citrato de Colina	0.25
Terbutilhidroquinona	0.0014
Aporte energético kcal/100g de dieta	394.74

7.2.1. Diseño de dietas con 20% de proteína.

Las dietas con 20% de proteína se elaboraron con las diferentes fuentes de proteínas: caseína, proteína aislada de soya, proteína de maíz, concentrado de frijol, y mezclas de dos proteínas: proteína aislada de soya (10%) con proteína de maíz (10%) y la otra de concentrado de frijol (10%) con proteína de maíz (10%) (Tabla 4). Para su elaboración se tomó en cuenta el análisis proximal de cada fuente de proteína (Tabla 3) y con ello realizar el ajuste al 20% de proteína, las dietas se formularon de acuerdo a los lineamientos de la AIN-93G, las dietas con un contenido de proteína del 20% permite el crecimiento óptimo de animales de laboratorio(48).

Tabla 3. Análisis proximal de los diferentes tipos de proteínas

Componente	Caseína *	Proteína**	Concentrado***	Proteína****
	20%	de soya 20%	de frijol 20%	de maíz 20%
	g/100g de la fuente de proteína			
Proteína	90.6	90	68.52	59.06
Lípidos	0.1	0.5	4.56	1
Hidratos de carbono	7.4	5	20.67	37.56
Cenizas	1.9	4.5	5.26	2.13
Fibra	0	0	0.99	0.25
Total	100	100	100	100

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

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

***Análisis químico proximal de maíz y frijol de acuerdo a los métodos de AOAC 1990 (laboratorio de análisis químicos para alimentos en el departamento de nutrición animal y bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)

La composición química proximal del concentrado de frijol y la proteína de maíz fueron llevadas a cabo por el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Respecto a los análisis proximales de caseína y la soya se emplearon los datos de la ficha técnica de los aislados comerciales.

Tabla 4. Composición de las dietas

Componente	CAS 20%	SOY 20%	FRIJOL 20%	MAÍZ 20%	Mezcla de dos fuentes de proteína			
					SOY 10%	MAÍZ 10%	FRIJOL 10%	MAÍZ 10%
	g/100g de dieta							
Proteína	22.08	22.22	29.18	33.86	11.11	16.9	14.59	16.93
Almidón	39.21	39.38	37.74	35.51	36.62		37.44	
Maltodextrinas	12.66	12.83	11.19	8.96	10.07		10.89	
Sacarosa	9.46	9.63	7.99	5.76	6.87		7.69	
Aceite de Soya	6.98	6.89	5.67	6.66	6.17		6.78	
Fibra	5.00	5.00	4.71	4.92	4.81		4.96	
Mezcla de Minerales AIN-93 MP	3.50	3	3.50	3.50	3.50		3.50	
Mezcla de Vitaminas AIN-93 MP	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00	
L-cistina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30		0.30	
Citrato de Colina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		0.25	
Terbutilhidroquinona	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014		0.0014	
Aporte energético kcal/100g de dieta	396.4	398.2	395.4	396.3	397.3		395.9	

CAS: caseína, SOY: proteína de soya, FRIJOL: concentrado de frijol, MAÍZ: Proteína de maíz

7.2.2. Cambio de la dieta.

Después de que las 126 ratas estuvieron sometidas al tratamiento de desnutrición consumiendo 0.5% de proteína por 21 días, se les dividió en siete grupos diferentes con 18 ratas cada uno, los cuales se alimentaron con las dietas con un

contenido de 20% de proteína y un grupo que continuó consumiendo la dieta con 0.5% de proteína. A su vez cada grupo se dividió en tres grupos (día 1, día 7 y día 14), cada uno con 6 animales.

7.3. Eutanasia.

La eutanasia se realizó después de los 21 días de desnutrición, a un día, siete y catorce días después de haber consumido las dietas de recuperación. Las ratas tuvieron acceso al alimento durante una hora antes del sacrificio. La eutanasia se llevó a cabo colocando las ratas en una cámara saturada con CO₂ con la finalidad de sedarlos y después decapitarlos. Se recolectó la sangre de cada rata en tubos de 5 mL con anticoagulante y gel separador (BD Vacutainer®, BD Franklin, Lakes NJ, USA) para la medición de parámetros bioquímicos y hormonales. Se realizó la necropsia para obtener el hígado para extracción de proteína y de RNA total. El tejido se colocó en tubos de microcentrifuga Eppendorf (Microtube, Axigen, Union City, USA), se congeló en seguida en nitrógeno líquido y se mantuvo a -70°C en ultracongelador. Paralelamente, también se tomaron muestras frescas de hígado de aproximadamente 1 cm x 1 cm, las cuales fueron colocadas en cassetes para los análisis histológicos (Shandon Cassete, REF 1000957, Thermo Fisher Scientific, Runcom Cheshire, UK). Los cassetes con el tejido se conservaron en formalina al 10% con el fin de prevenir la autólisis del tejido.

7.4. Medición de parámetros bioquímicos e insulina en suero.

Esta determinación se realizó a cada una de las 126 ratas después de concluido el estudio. Con las muestras de sangre, se obtuvo el suero, centrifugando a 3000 rpm por 10 minutos a 6°C. Se tomaron 150 µL de suero de rata para cuantificar niveles de glucosa, albumina, triglicéridos, colesterol total (mg/dL), por método de colorimetría indirecta enzimática mediante el autoanalizador cobas c111 de Roche®.

Se determinó la concentración de insulina mediante radioinmunoensayos (Millipore Rat Insulin RIA KIT, #Cat RI-13K, Millipore, St Charles, Missouri, USA), los cuales contienen un antígeno con marca radiactiva. En esta prueba se mezcla una cantidad constante de antígeno marcado radiactivamente y una cantidad constante de anticuerpo, para que se produzca la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac) y sea cuantificado en un contador de radiaciones gammas (Quantum D5002, Packard, Luman, USA).

7.5. Extracción y cuantificación de RNA.

La extracción de RNA total de los 126 hígados de las ratas en estudio se realizó empleando el reactivo trizol (invitrogen), él cual es una solución monofásica que mantiene la integridad del RNA al mismo tiempo que altera la estabilidad de la célula disolviendo sus componentes.

Ensayo para extracción de RNA

Se agregó 1 mL de trizol en tubos eppendorf PCR (Clean cetrifugation) que contenían un balín (Stainless Steel Beads QIAGEN); se tomaron muestras del tejido hepático, los cuales fueron introducidos en los tubos que posteriormente se colocaron en el equipo Tissuelyser programándolo en Star-P1 30 Fr por dos minutos para homogeneizar el tejido; después de transcurrido ese tiempo se sacaron los tubos del equipo y se le agregaron 200 µL de cloroformo al 100%, se homogeneizaron, se dejaron incubando por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5804R, USA, rotor F45-30-11). Las muestras se separaron entonces en dos fases, una acuosa en donde permanece el RNA y una orgánica donde se encuentran proteínas y lípidos; por lo tanto, se recuperó la fase superior acuosa y se transfirió a tubos Eppendorf nuevos de 1.5 mL en donde se mezcló con 500 µL de isopropanol al 100% para precipitar el RNA. Se volvió a incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y se realizó un lavado a la pastilla de RNA obtenida con 1 mL de etanol frío (4°C) al 75% y se centrifugó a 1400 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se desechó por inversión y la pastilla se resuspendió agregando

150 μ L de agua libre de DNasas y RNasas (Sigma) y se incubó en hielo por 15 minutos. Las muestras de RNA se guardaron a -80°C . (Thermo Scientific TSE series).

7.5.1. Cuantificación de RNA.

Se cuantificó cuantificación al RNA obtenido para llevar a cabo la reacción de RT-PCR.

Ensayo

Se descongelaron las muestras en hielo, posteriormente se calentaron 5 minutos a 65°C con el fin de desnaturalizar las cadenas de RNA y se cuantificaron en un espectrofotómetro de micro volumen (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) a 260 nm.

Para corroborar la pureza del RNA se tomó la lectura a 260 y 280 nm para obtener la relación de 260/280 que debe ser de 1.9 a 2.2. Si el valor de la lectura no se encuentra en este intervalo, se puede considerar que el RNA se encuentra contaminado con proteínas

7.5.2. Reacción de transcripción reversa para la generación de cDNA a partir del RNA extraído.

En la medición de la expresión génica es necesario realizar la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) por medio de la reacción de transcripción reversa (RT), la cual se denomina así debido a que se utiliza un molde de RNA para sintetizar una cadena de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Ensayo

Para la síntesis de cDNA, se realizó la transcripción reversa empleando el RNA a la concentración deseada, la transcriptasa reversa y el oligo dT. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, el cual se programó primero a 60°C por 42

minutos, posteriormente a 94°C por 5 minutos y al término de este tiempo, las muestras se mantuvieron a 4°C.

7.5.3. PCR en tiempo real.

Este ensayo permite amplificar los niveles de cDNA mediante ciclos de altas y bajas temperaturas, usando ensayos fluorogénicos Sybergreen específicos para cada gen de interés.

Ensayo

Se preparó una mezcla que contenía: 5 µL de mezcla maestra, 1 µL de primer SYBR Green I®, 2 µL de agua Sigma, y 2 µL de cDNA. La reacción se hizo por triplicado en un volumen de 10 µL. El equipo utilizado fue Light Cycler® 48011 Roche. En la siguiente tabla se enlistan los primers utilizados.

Tabla 5. Sondas SYBR Green I empleadas

Gen	Secuencia
mTOR_F mTOR_R	GAGATGAGGAAGTGGGTGGA GCAGCACTTCAAGCAGAGTG
rRps6ka2_F rRps6ka2_R	ATACCCCGAGGAGATTCTG AGATGGACGTCCTGTCTGCT
rEIF4e_F rEIF4e_R	GACGTGGTGGAGCTGTTGT GAGCGCTCTTTGTAGCTGT

Con la curva de amplificación se determinó el ciclo al corte (Ct) y se determinó el valor de la expresión con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores obtenidos se normalizaron empleando el valor de amplificación del gen estructural (ciclofilina). Se empleó como control al grupo de ratas que fue alimentado con la dieta de 0.5% de proteína.

7.6. Determinación y cuantificación de proteína por Western Blot

El Western Blot es un método para identificar proteínas en una mezcla compleja de las mismas, transfiriendo las proteínas separadas mediante el peso molecular, de un medio gelificado a una membrana de nitrocelulosa de unión de las proteínas para su respectivo análisis (49).

7.6.1. Extracción de proteína.

Para la extracción de proteína, se tomaron muestras de cada hígado de entre 100 a 500 mg, las cuales se agregaron a tubos Eppendorf de 2 mL y se homogeneizaron con buffer de lisis RIPA (PBS 1X, NP40 al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5%, SDS 0.1%, azida de sodio al 0.006%), el cual contiene SDS que es un detergente que contribuye a la ruptura de membranas celulares. A este buffer se le agrega un inhibidor de proteasas Complete (Roche Applied Science), Na_3VO_4 2mM y NaF 1mM para evitar la degradación de las proteínas. Los homogeneados se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, para precipitar restos celulares. Se recolectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. La proteína se cuantificó por el método de Lowry (BioRad). Éste es un ensayo colorimétrico que se basa en la reacción de ciertos residuos de aminoácidos con una solución de tartrato de cobre la cual es reducida con el reactivo Folina produciendo una coloración azul en donde la intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. La concentración de proteína se determinó mediante una curva estándar de albúmina en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

7.6.2. Western Blot.

Los extractos de proteína se trataron con agentes reductores (β -mercaptoetanol) y calor (80°C por 5 minutos) para provocar la pérdida de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas para que de este modo la conformación tridimensional de las proteínas no interfiera con la electroforesis y las proteínas se puedan separar en función de su tamaño. Para que las proteínas problema pudieran ser accesibles a la detección por anticuerpos, se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (Immobilon transfer membranes, Millipore) por electrotransferencia húmeda. Las membranas se bloquearon incubándolas en solución blotto (TBS 1X-tween 0.1% con leche entera en polvo 5%) por 60 minutos para evitar uniones de anticuerpo inespecíficas; se lavaron con TBS-t (TBS 1X-tween 0.1%) e incubaron con el anticuerpo primario por 12 horas a 4°C y 120 minutos a temperatura

ambiente (tabla 5). Finalmente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (tabla 5) por 120 minutos a temperatura ambiente y las bandas se visualizaron con un reactivo quimioluminiscente (Reactivos ECL Immobilion western, millipore 1:1) que contiene el sustrato de la enzima presente en el anticuerpo secundario catalizando una reacción colorimétrica que permite la visualización de la proteína problema en la membrana. Como control de carga se evaluó la expresión proteínica de tubulina.

Tabla 6. Anticuerpos empleados

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Tubulina (50kDa)	Tubulina Santa Cruz, SC7396	Anti-cabra IgG-HRP (sc 2768)
mTORC1 (289kDa)	mTORC1 Cell signaling 29725	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)
pmTORC1 (289kDa)	pmTORC1 Ser 248, Cell signaling 29745	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)
S6K1 (70kDa)	S6K1 α (c18) Santa Cruz 230	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)
pS6K1 (70kDa)	pS6K1 Thr 389 108 D2, Cell signaling 92345.	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)
4E-BP1 (15-20kDa)	4E-BP1 (53H11) Cell signaling 9644	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)
p4E-BP1 15-20kDa)	p4E-BP1 Thr 37/46, Cell signaling 9459	Anti-conejo IgG-HRP (sc 2004)

7.7. Aminogramas.

El perfil de aminoácidos de las diferentes proteínas empleadas, fueron realizados por el laboratorio Siliker Ibérica.

7.8. Estudio histomorfológico.

Los tejidos de hígado que se encontraban en los cassetes conservados en formalina 10% se embebieron en parafina (Paraplast Plus, Cat-23-021-400, Fisher Scientific Company, Houston, Tx). Este proceso se inició con la deshidratación del tejido mediante lavados de alcohol; posteriormente, se removió el agente deshidratante con xilol, que es miscible con la parafina la cual se utiliza al final

para embeber el tejido. Se realizaron cortes con el micrótomo de 4 μm (Leica RM 2235, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany). Finalmente, los cortes se tiñeron por el método hematoxilina-eosina. Se utilizó este tipo de tinción, debido a que es el más adecuado para observar mejor las características estructurales generales del hígado, entre ellos los hepatocitos (50).

7.9. Análisis estadístico.

Los resultados experimentales, están expresados en promedio \pm S.E.M. Los resultados de peso corporal y consumo de alimento fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías considerando como factores el tiempo y el tratamiento dietario. Las determinaciones de parámetros bioquímicos, RT-PCR y Western Blot se evaluaron por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Posteriormente se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, y las diferencias significativas entre grupos se señalaron con diferentes letras en cada figura, siendo "a" el de valor mayor ($a>b>c>d$), considerando en todos los casos una $P<0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico Graph Pad Prism 6 para Windows.

8. RESULTADOS

8.1. *Análisis de aminoácidos de las diferentes proteínas*

La proteína dietaria ya sea de origen animal o vegetal, es la principal fuente de aminoácidos para llevar a cabo el proceso de síntesis de proteínas. Sin embargo, no todas las fuentes de proteínas tienen la misma calidad nutricional, debido a que algunas son deficientes en aminoácidos indispensables en la dieta, lo cual puede repercutir en que algunos mecanismos no se lleven a cabo satisfactoriamente o que haya alguna alteración, ya sea a nivel fisiológico o molecular. Por ejemplo, una baja ingesta de lisina está relacionada con un bajo o lento crecimiento y con un bajo nivel de proteínas sericas como la albúmina (51). En el caso del triptófano, éste es un aminoácido que además de ser precursor de la síntesis de serotonina y melatonina, también está involucrado en el proceso de síntesis de proteínas plasmáticas como la albúmina (52). Por otro lado, se encuentran otros aminoácidos que su consumo está relacionado con padecimientos como hipercolesterolemia (53).

Por lo anterior, es importante conocer el perfil de aminoácidos de las diferentes fuentes de proteínas dietarias. En la **Tabla 7** se muestra los aminogramas de las distintas proteínas empleadas, donde los valores son comparados con los valores estándar de la FAO para la proteína ideal para la alimentación de preescolares de 2 a 5 años.

Tabla 7. Aminogramas de las diferentes proteínas o combinación de proteínas

AMINOÁCIDOS	PROTEÍNA						
	FAO	CASEÍNA	SOYA	FRÍJOL	MAÍZ	FRÍJOL + MAÍZ	SOYA+ MAÍZ
	mg/g de proteína						
Ácido Aspártico		73.95	115.67	151.84	76.53	108.35	100.16
Ácido Glutámico		224.72	187.78	164.48	254.32	187.70	214.14
Serina		58.94	55.56	86.34	69.08	69.68	60.92
Histidina	19	26.60	24.78	29.88	23.03	24.34	24.08
Glicina		19.32	41.00	47.60	35.05	37.84	38.64
Treonina	34	44.70	38.11	59.09	40.81	45.17	39.18
Arginina		37.31	76.33	70.26	42.16	51.01	62.79
Alanina		32.01	43.22	53.84	105.99	68.34	68.09
Tirosina		56.95	36.67	47.44	62.14	47.67	46.76
Valina	35	56.84	39.00	57.45	46.73	47.84	42.06
Metionina		26.16	12.67	13.95	28.11	18.84	18.78
Metionina + cistina	25	29.36	23.22	20.68	47.92	28.67	33.01
Fenilalanina		57.17	54.44	81.75	80.93	69.01	64.94
Fenilalanina + tirosina	63	114.13	91.11	129.19	143.07	116.69	117.09
Isoleucina	28	45.47	38.44	50.56	40.64	43.01	39.31
Leucina	66	95.58	77.00	104.40	192.01	130.36	122.57
Lisina	58	77.70	61.11	78.14	19.81	47.17	44.75
Prolina		116.45	54.11	49.90	115.31	73.85	78.36
Cistina		3.20	10.56	6.73	19.81	9.83	14.22
Triptófano	11	12.36	12.00	15.59	7.62	10.34	10.26
Score químico		100	93	82	34	81	77
Aminoácido limitante		Ninguno	Triptófano	Metionina + cistina	Lisina	Lisina	Lisina

Aminogramas de los diferentes tipos de proteínas, en color morado se encuentran marcados los aminoácidos indispensables que tiene cada proteína.

En la tabla anterior se puede observar que la proteína de maíz es altamente deficiente en lisina (19.81 mg/g proteína) y triptófano (7.62 mg/g proteína), lo cual coincide con lo reportado en la literatura (54), (20). Lo que indica que al alimentar a los animales con esta proteína, probablemente tendrán un menor crecimiento y los niveles de albúmina no serán elevados después de la recuperación de la

desnutrición, debido a que cuando existe una deficiencia constante de uno o varios aminoácidos indispensables en las proteínas ingeridas, el crecimiento y desarrollo se llevan a cabo de manera lenta (20). Una manera de poder comprobar lo anterior en nuestro estudio, es a través del monitoreo del peso corporal y consumo de alimento de las ratas, antes y durante la recuperación nutricional con los diferentes tratamientos dietarios.

8.2. Efecto de los tratamientos dietarios en el peso corporal y consumo de alimento.

A continuación, se muestran los valores promedios de peso corporal al inicio y al final del periodo de desnutrición y durante los días de recuperación, así como el consumo de alimento que tuvieron los animales durante todo el estudio (**Tabla 8**).

Tabla 8. Valores promedios de peso corporal y consumo de alimento durante todo el estudio.

Tratamiento Dietario	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal día 21 (g)	Periodo de recuperación			Alimento consumido (g/día)
			Peso corporal día 1 (g)	Peso corporal día 7 (g)	Peso corporal día 14 (g)	
Caseína 0.5%	150.34 ± 1.54	118.87±1.39	116.13 ± 1.74	114.71 ± 1.53	104.37 ± 1.58	7.76±0.63
Caseína 20%	147.53 ± 1.68	117.52±1.32	119.55 ± 1.74	157.73 ± 1.89	205.405 ± 5.44	16.70±0.96
Soya 20%	142.88± 6.68	114.29±2.42	107.18 ± 2.19	140.90 ± 2.45	190.5 ± 5.58	15.19±0.80
Frijol 20%	151.88 ± 1.56	121.23±1.45	121.51 ± 1.38	140.30 ± 2.60	174.16 ± 4.07	14.77±0.86
Maíz 20%	147.18 ± 1.68	118.59±0.95	114.81 ± 0.34	133.36 ± 2.10	141.45 ± 3.31	11.00±0.77
Frijol + Maíz (20%)	150.31± 1.28	122.78±1.23	119.11 ± 1.60	157.77 ± 4.08	201.48 ± 3.58	17.44±0.92
Soya + Maíz (20%)	155.65 ± 2.15	120.32±1.53	118.14 ± 2.67	149.16 ± 2.51	200.7 ± 3.99	16.81±1.1

Se muestran los valores promedio ± SEM del peso corporal y consumo de alimento (n=6).

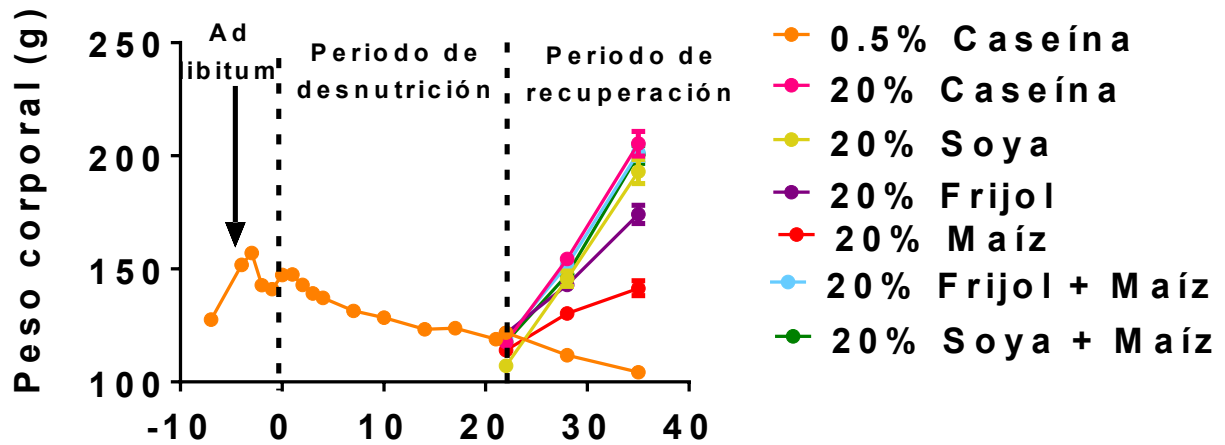
El peso corporal promedio inicial de todos los grupos, fue de 150.30 g ± 2.02. Después de los 21 días de desnutrición, las 126 ratas tuvieron un peso corporal promedio de 118.85 g ± 1.35, lo que indica una pérdida de peso del 20.92%. Se

puede observar que durante el periodo de recuperación hasta el día 14, los animales que consumieron caseína al 0.5% continuaron con una pérdida de peso del 12.20%; mientras que los que consumieron caseína al 20% tuvieron una recuperación de peso de 74.43%, los de soya un 66.70%, soya/maíz 66.80% y frijol/maíz un 64.09%, por lo que fueron los grupos que tuvieron un mayor porcentaje de peso corporal. Los grupos que tuvieron un menor efecto sobre la recuperación de peso corporal en los animales, fueron los que consumieron frijol con un 43.70% y maíz con 19.28%. Esto era de esperarse, debido a que principalmente el maíz, es una proteína deficiente en lisina, lo que la convierte en una proteína con baja calidad proteínica.

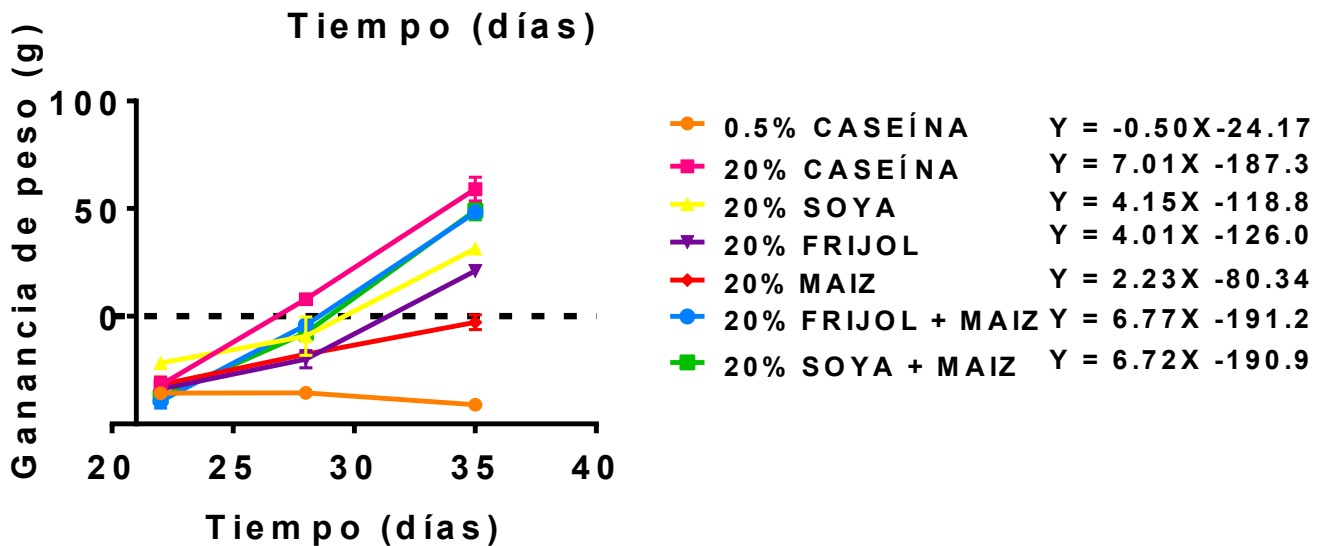
En la **Tabla 7**, se puede observar que el concentrado de frijol tiene como aminoácidos limitantes la combinación de metionina/cistina, razón por la cual no puede ser una proteína con una alta eficiencia de conversión proteínica y por ende no es posible que los animales recuperen satisfactoriamente su peso corporal.

En las siguientes gráficas (**Figura 8**), se muestra el peso corporal que tuvieron las ratas durante todo el tratamiento.

A



B



C

Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios sobre la ganancia de peso corporal de los animales.

(A) Tendencia del peso corporal (g) durante todo el experimento. (B) sección lineal de la ganancia de peso después del cambio de las dietas experimentales. N= 6 para cada grupo experimental.

Como se puede observar (Figura 8A), durante el periodo en el que los animales fueron alimentados con la dieta con un contenido de caseína del 0.5%, estos presentaron una pérdida de peso promedio de 0.5 g / día y al realizar el cambio a las dietas de recuperación, la ganancia de peso entre los tratamiento varió de

0.5% Caseína
 20% Caseína
 20% Soya
 20% Frijol
 20% Maíz
 20% F+M
 20% S+M

acuerdo a la fuente de proteína dietaria. Las ratas que presentaron la mayor ganancia de peso (**Figura 8B**), fueron las alimentadas con caseína al 20% (7.01 g/día), frijol/maíz (6.77 g/día) y soya/maíz (6.72 g/día), seguidas por las ratas que fueron alimentadas con soya (4.15 g/día) y frijol (4.01 g/día). El grupo que presentó la menor ganancia de peso fue el alimentado con maíz (2.23 g/día).

Consumo de Alimento

Enseguida se muestran las gráficas (**figura 9**) del consumo de alimento con los diferentes tratamientos dietarios.

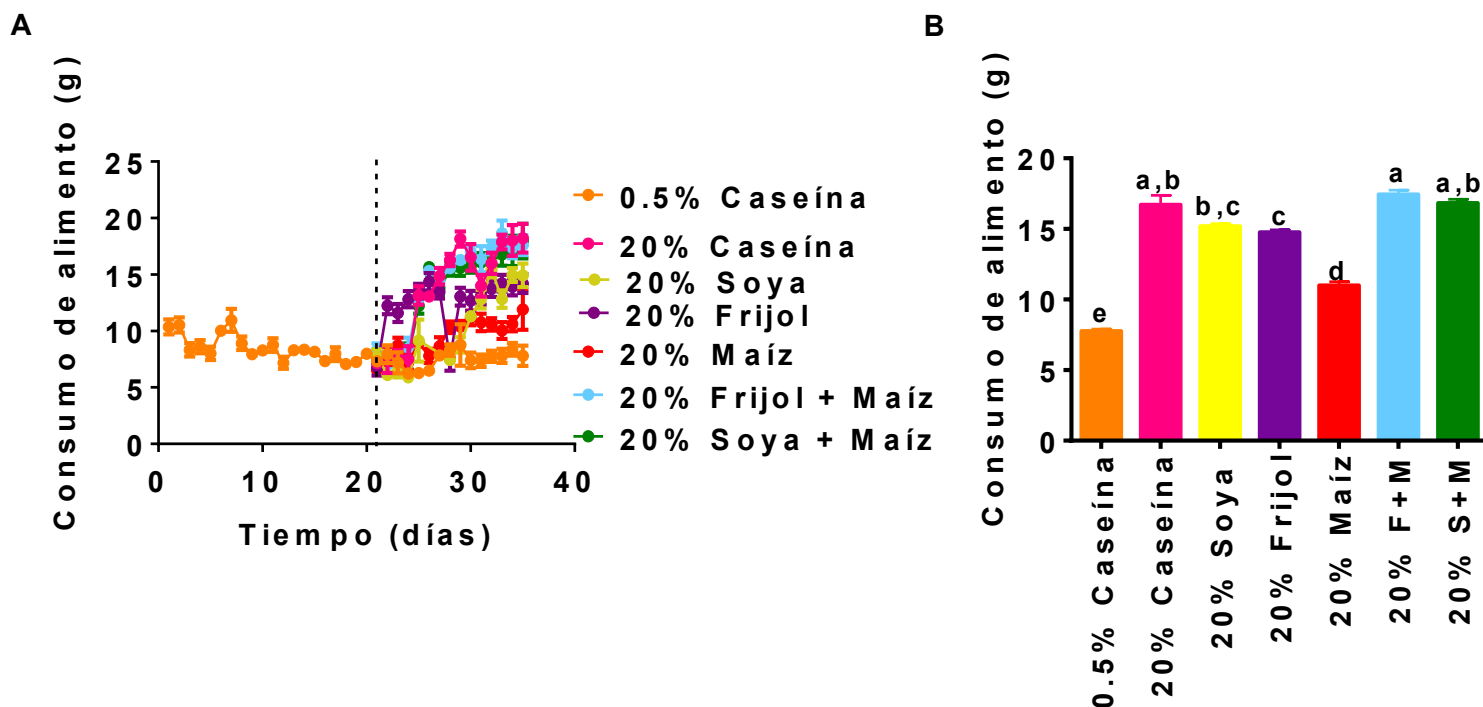


Figura 9. Consumo de alimento.

(A) Consumo de alimento (g/día) a lo largo de todo el experimento. (B) Consumo de alimento promedio. $n=18$ para cada grupo experimental. ANOVA de dos vías factores: tiempo y tratamiento dietario, diferentes letras representan diferencia significativa ($a>b>c>d>e$). $P<0.05$.

Se puede observar (**Figuras 9A y 9B**), que la ingesta de la dieta al 0.5% de caseína fue muy baja (7.76 g/día) y al realizar los cambios a las dietas de recuperación el consumo de alimento se incrementó significativamente. Las ratas que consumieron más alimento fueron las que ingirieron frijol/maíz (17.44 g/día), soya/maíz (16.81 g/día) y caseína 20% (16.70 g/día), seguidas de las ratas alimentadas con soya y frijol con un consumo de alimento de 15.19 g/día y 14.77 g/día respectivamente, mientras que las ratas que consumieron la menor cantidad de alimento fueron las que recibieron maíz como fuente de proteína (11.00 g/día).

8.3. ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO

Es importante la determinación de los parámetros bioquímicos en suero, ya que son un indicativo del efecto de las dietas de recuperación en las ratas a nivel fisiológico. Para analizar los parámetros bioquímicos obtenidos en el presente estudio, es importante conocer cuales son los valores normales de éstos en suero en ratas (Tabla 9).

Tabla 9. Valores normales de los parámetros bioquímicos

Parámetro bioquímico	Intervalo
Glucosa ¹	118-152 mg/dL
Insulina ²	0.5-2 ng/mL
Albúmina ¹	2.2-5.0 g/dL
Colesterol ²	≤200 mg/dL
Triglicéridos ²	≤150 mg/dL

Fuente: 1 Matsuzawa, 1997 (55). 2 Márquez Claudia (20)

8.3.1. Glucosa en suero

En la **Figura 10**, se muestran las concentraciones de glucosa de los tres días de recuperación después de consumir las dietas de recuperación.

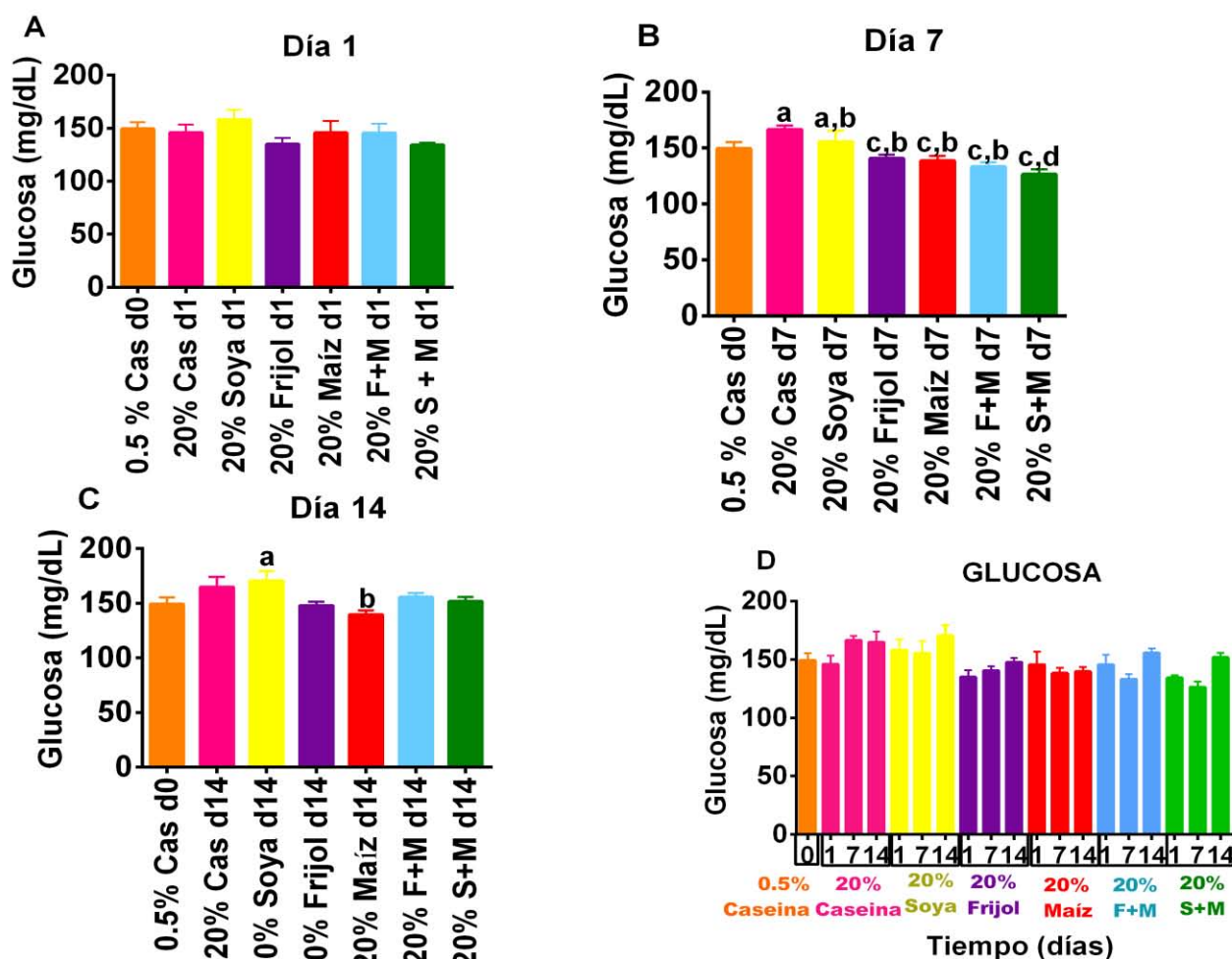


Figura 10. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de glucosa en suero.

(A). Concentración de glucosa en suero en el día 1, después de haber consumido la dieta de recuperación. (B). Concentración de glucosa en suero en el día 7 de recuperación. (C). Concentración de glucosa en suero en el día 14 de recuperación. (D). Promedio de la concentración de glucosa en suero, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c>d). P<0.05 ANOVA de una vía.

Se puede observar (**Figura 10A**) que con un día de ingesta, las concentraciones de glucosa no variaron entre los grupos experimentales y se mantuvo dentro de los niveles normales. Después de siete días de consumir las dietas de recuperación (**Figura 10B**) se observó que las ratas alimentadas con caseína al 20% y soya presentaron una concentración de glucosa ligeramente mayor al intervalo máximo reportado para ratas, 166.6 mg/dL y 155.4 mg/dL respectivamente, mientras que las ratas alimentadas con caseína 0.5% (149.4 mg/dL), frijol (140.6 mg/dL), maíz (138.5 g/dL), frijol/maíz (133.3 mg/dL) y soya/maíz (126.4 mg/dL) mantuvieron los niveles de glucosa dentro del intervalo normal.

Por último después de consumir las dietas de recuperación durante 14 días (**Figura 10C**) se observó que las ratas alimentadas con soya y caseína al 20% mantuvieron concentraciones de glucosa superiores a los niveles normales reportados para ratas (170.7 mg/dL y 164.98 mg/dL, respectivamente).

8.3.2. Insulina en suero

A continuación en la **Figura 11**, se presentan las gráficas de las concentraciones de insulina de los días 1, 7 y 14 de recuperación.

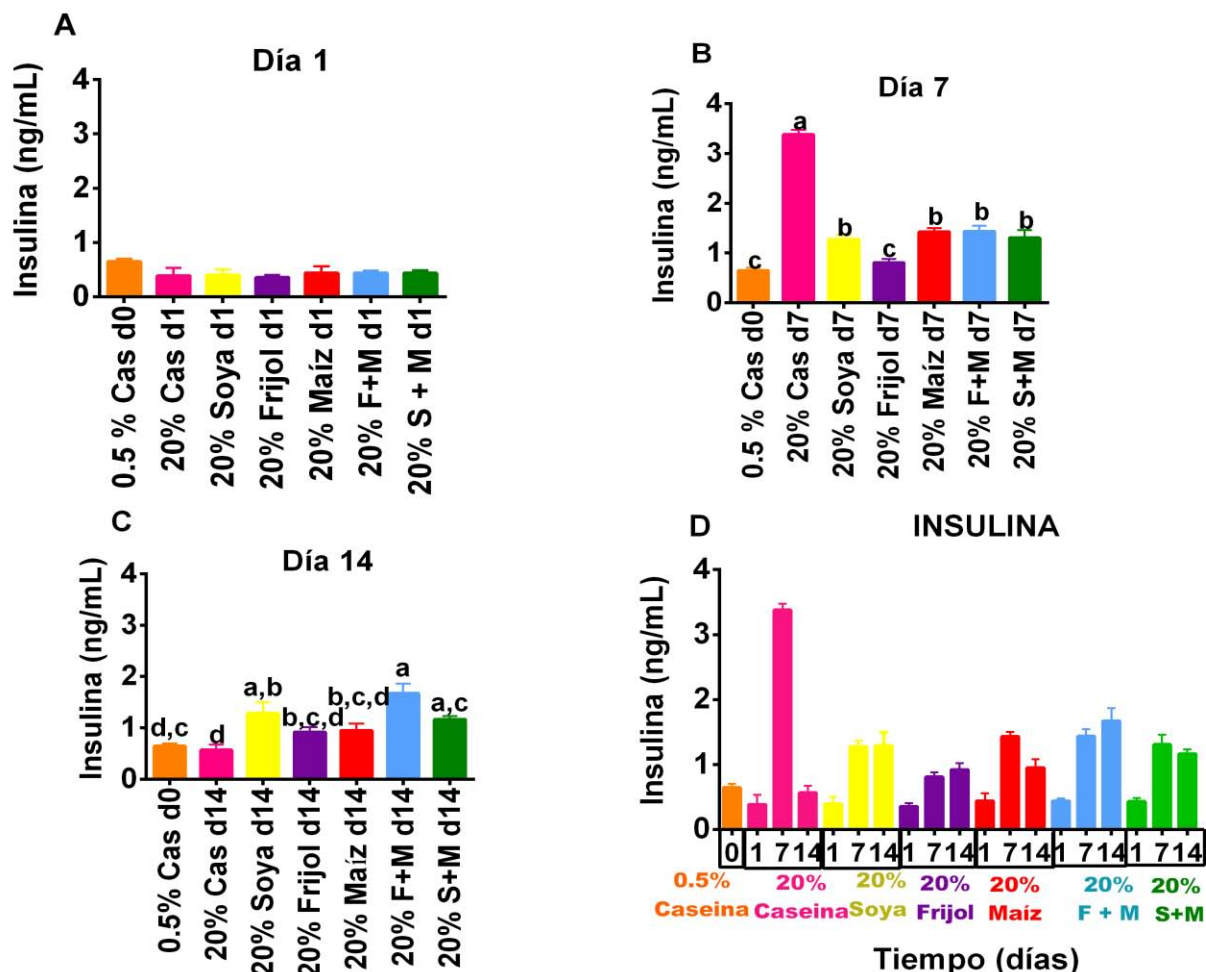


Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de insulina en suero.

(A). Concentración de insulina en suero en el día 1, después de haber consumido la dieta de recuperación. (B) Concentración de insulina en suero en el día 7 de recuperación. (C) Concentración de insulina en suero en el día 14 de recuperación. (D). Promedio de la concentración de insulina en suero, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c>d). P<0.05 ANOVA de una vía.

Al primer día (**Figura 11A**), el consumo de las diferentes proteínas no indujo cambios en la concentración de insulina, ya que los niveles en suero se mantuvieron bajos y constantes.

Es posible observar que al día siete de recuperación (**Figura 11B**) la ingesta de las diferentes proteínas dietarias comenzó a inducir cambios sobre los niveles de insulina. La dieta con caseína al 20% fue la que generó un incremento con respecto a los niveles normales (3.38 ng/mL), mientras que los demás tratamientos mantuvieron los niveles en valores normales.

De forma similar al día 14 de recuperación (**Figura 11C**), todos los grupos mantuvieron niveles normales de la hormona. El grupo que consumió caseína al 20% mostró una disminución de los niveles hasta 0.57ng/mL.

8.3.3. Albúmina en suero

Para conocer el estado nutricional de las ratas se midieron las concentraciones de albúmina en suero, a continuación (**Figura 12**) se muestran.

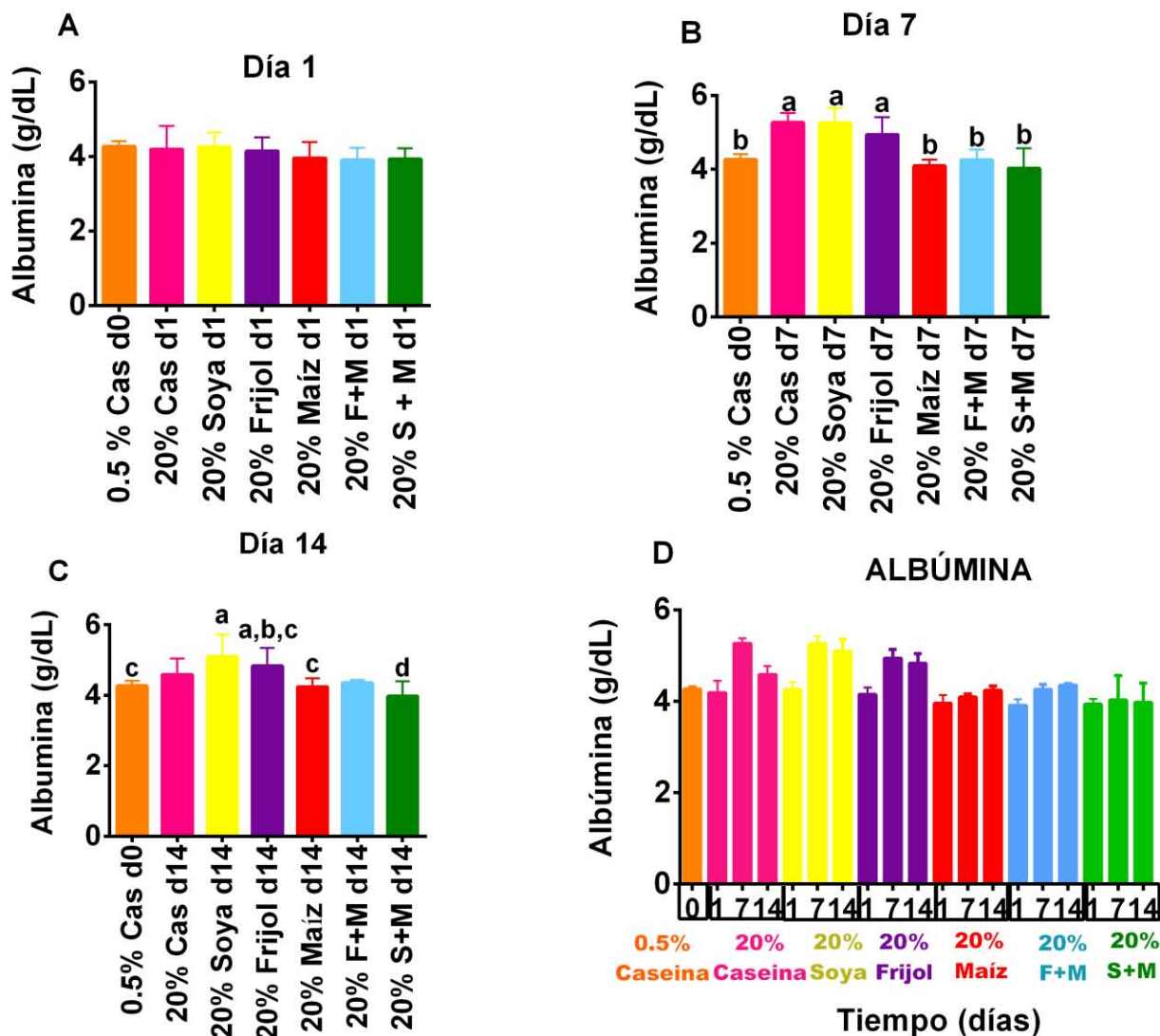


Figura 12. Efecto de los diferentes tratamientos durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de albúmina en suero.

(A). Concentración de albúmina en suero en el día 1, después de haber consumido la dieta de recuperación. (B). Concentración de albúmina en suero en el día 7 de recuperación. (C). Concentración de albúmina en suero en el día 14 de recuperación. (D). Promedio de la concentración de albúmina en suero, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa ($a>b>c>d$). $P<0.05$ ANOVA de una vía.

En el día 1, (**Figura 12A**), la ingesta de las proteínas dietarias al 20% no repercuten en un cambio significativo sobre los niveles de albúmina, en comparación con la dieta de 0.5% de proteína. El comportamiento es constante en todos los grupos experimentales y se mantienen en niveles normales.

En el segundo día de recuperación (**Figura 12B**), la ingesta de caseína al 20%, soya y frijol ocasiona un incremento en la concentración de albúmina de: 5.26 g/dL, 5.26 g/dL y 4.94 g/dL respectivamente, seguidas por los grupos alimentados con soya/maíz (4.03g/dL), maíz (4.09g/dL) y frijol/maíz (4.26g/dL) que mantienen niveles muy semejantes al día 1. Después de consumir por 14 días (**Figura 12C**) las diferente dietas se observa que los tratamientos con soya (5.09 g/dL), frijol (4.83 g/dL) y caseína al 20% (4.58 g/dL), mantuvieron los niveles de albúmina elevados. Sin embargo los tratamientos que no mostraron un cambio significativo fueron los tratamientos de frijol/maíz (4.35 g/dL), maíz (4.24 g/dL) y soya/maíz, (3.97 g/dL)

8.3.4. Triglicéridos en suero

En la **Figura 13** se ilustran las gráficas de las concentraciones de triglicéridos en suero de las ratas que consumieron los diferentes tratamientos dietarios por días 1, 7 y 14 de recuperación.

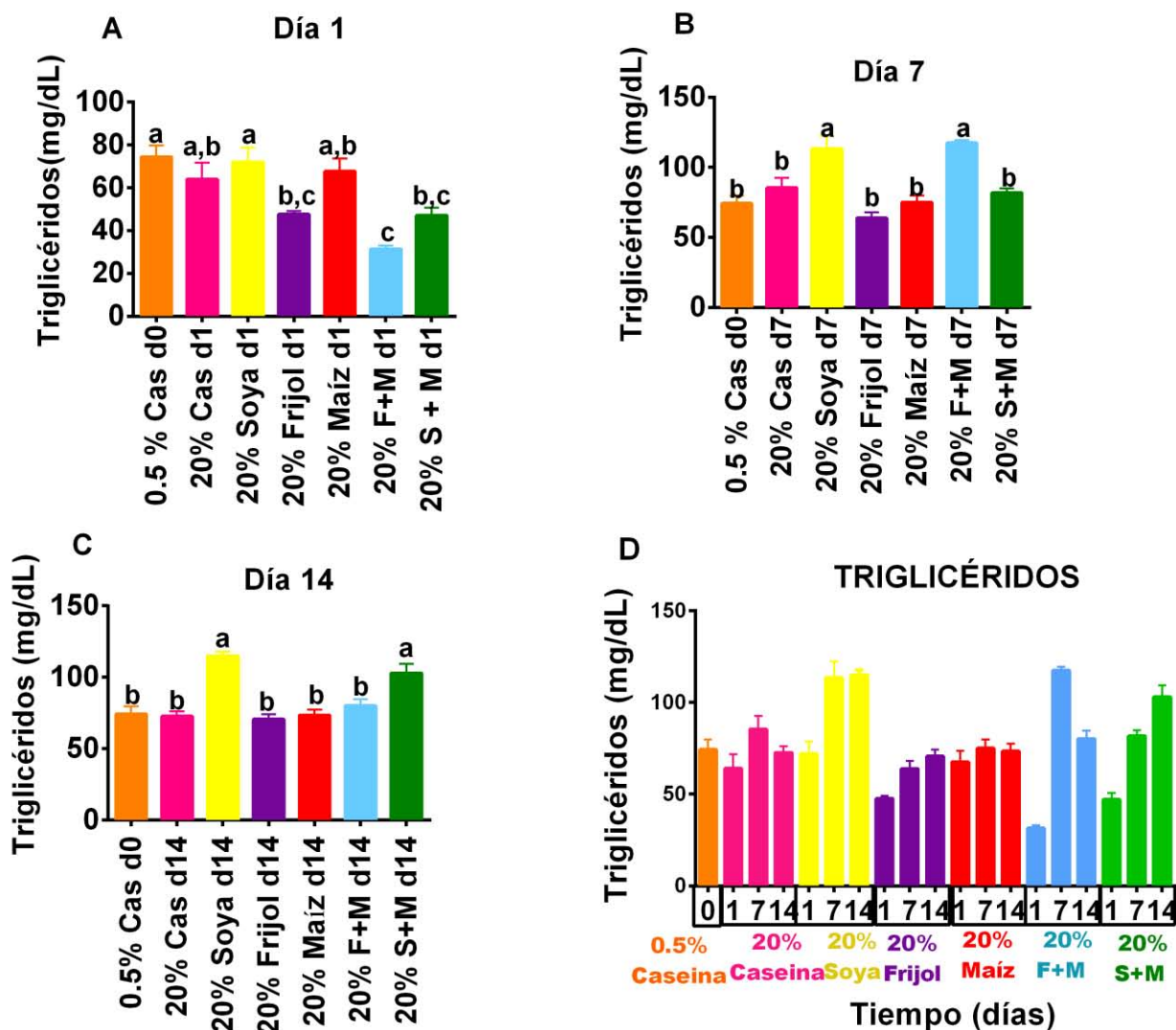


Figura 13. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de triglicéridos en suero.

(A). Concentración de triglicéridos en suero en el día 1, después de haber consumido la dieta de recuperación. (B). Concentración de triglicéridos en suero en el día 7 de recuperación. (C). Concentración de triglicéridos en suero en el día 14 de recuperación. (D). Promedio de la concentración de triglicéridos en suero, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental.

Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c). P<0.05 ANOVA de una vía.

Aunque el consumo de las diferentes dietas de recuperación al día uno (**Figura 13A**), no aumentó los niveles de triglicéridos por encima de los niveles normales, se observa que el consumo de caseína al 0.5%, soya, caseína al 20% y maíz tendió a elevar ligeramente la concentración en comparación a los otros grupos experimentales.

Después de siete días de consumo de los diferentes tratamientos dietarios, la concentración sérica de triglicéridos se mantuvo dentro del intervalo normal; sin embargo, se observa que las ratas que se alimentaron con frijol/maíz y soya (**Figura 13B**) tuvieron un mayor incremento sobre los niveles de triglicéridos en suero.

Finalmente al día 14 (**Figura 13C**), el grupo que siguió manteniendo niveles elevados de triglicéridos fue el alimentado con soya, junto con el grupo que ingirió soya/maíz. A pesar de que tuvieron niveles más altos, continuó manteniéndose dentro de parámetros normales, al igual que el resto de los otros tratamientos.

8.3.5. Colesterol en suero

A continuación en la **Figura 14** se presentan las gráficas de las concentraciones de colesterol de las ratas, en los tres días de recuperación:

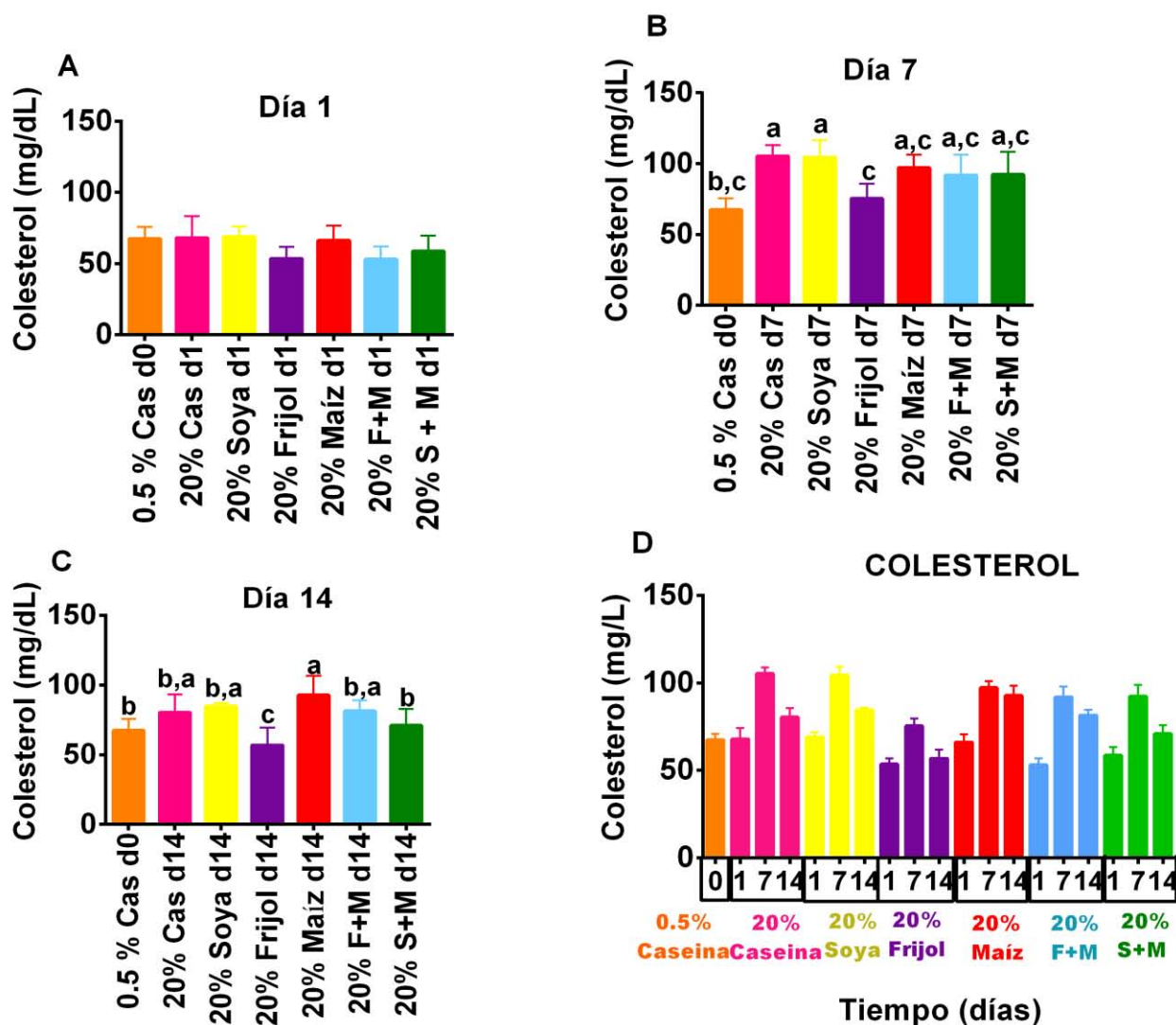


Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la concentración de colesterol en suero). (A). Concentración de colesterol en suero en el día 1 de recuperación. (B). Concentración de colesterol en suero en el día 7 de recuperación. (C). Concentración de colesterol en suero en el día 14 de recuperación. (D). Promedio de la concentración de colesterol en suero, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras

representan diferencia estadística significativa ($a>b>c$). $P<0.05$ ANOVA de una vía.

Se observó que en ninguno de los tres días, la ingesta de las diferentes dietas ocasiona una alteración en los niveles de colesterol en suero de los animales, pues se mantienen dentro de los niveles normales (≤ 200 mg/dL). En el primer día de recuperación (**Figura 14A**), ninguna dieta provocó un cambio sobre los niveles de colesterol en las ratas. Es hasta después de siete días (**Figura 14B**), cuando los tratamientos de caseína al 20% (105.38 mg/dL) y soya (104.56 mg/dL) muestran una elevación mayor con respecto a los otros tratamientos, siendo los tratamientos con frijol (75.47 mg/dL) y caseína al 0.5% (67.46 mg/dL), los que tuvieron los niveles más bajos, mientras que tratamientos con las proteínas de maíz (97.24 mg/dL), soya/maíz (92.27 mg/dL) y frijol/maíz (91.96 mg/dL) mantuvieron concentraciones muy semejantes entre sí. En el último día de recuperación (**Figura 14C**), los tratamientos de caseína al 0.5% (67.46 mg/dL), caseína 20% (80.40 mg/dL), soya (84.67 mg/dL), frijol/maíz (81.59 mg/dL) y soya/maíz (71.05 mg/dL), mantienen niveles semejantes, sin embargo se observa que las ratas alimentadas con maíz presentaron la mayor concentración de colesterol en suero (92.82 mg/dL) mientras que la dieta con frijol tuvo los niveles más bajos (56.91 mg/dL).

8.4. EXPRESIÓN GÉNICA EN HÍGADO

La medición de la expresión génica, es fundamental para tener un panorama del impacto que tiene la ingesta de los diferentes tratamientos dietarios sobre la expresión de los genes involucrados en la ruta de mTORC1 (S6K y eIF4e) en el hígado. Una diferencia importante de las proteínas empleadas es el contenido de aminoácidos que tienen, los cuales pueden ser los encargados de regular la expresión de esos genes, en la siguiente **Figura 15**, se encuentran las gráficas de la expresión génica de mTORC.

8.4.1. Expresión génica de mTOR

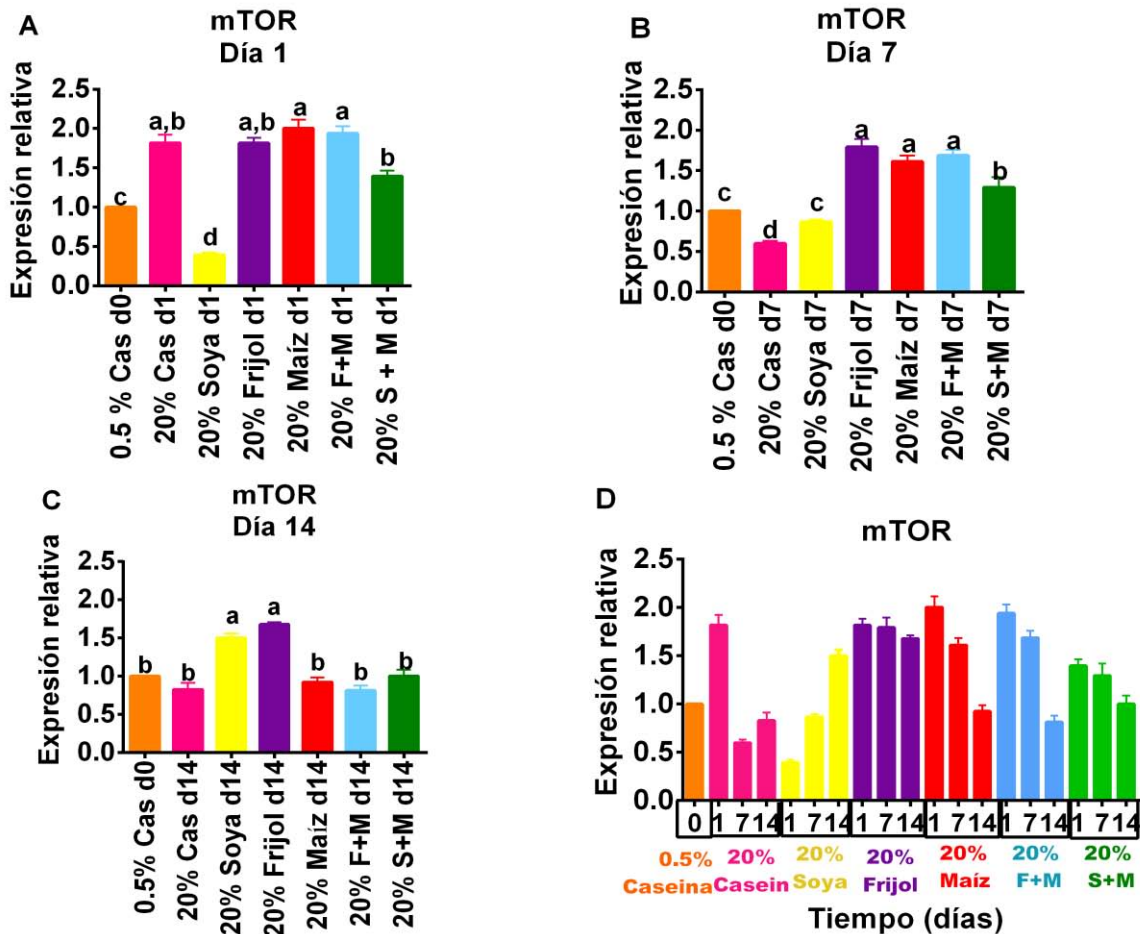


Figura 15. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de mTOR en hígado, a través de PCR en tiempo real.

(A). Expresión génica de mTOR en el día 1, en hígado. (B). Expresión génica de mTOR en el día 7. (C). Expresión génica de mTOR en el día 14. (D). Promedio de la expresión génica de mTOR, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa ($a>b>c>d$). $P<0.05$ ANOVA de una vía. Los resultados son promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Se observa (**Figura 15A**), que desde el día uno de recuperación con una hora de consumo de los diferentes tratamientos dietario la expresión génica de mTOR es más alta con caseína al 20%, frijol, maíz y frijol/maíz, comparadas con el efecto que provocarón las dietas con soya/maíz, caseína al 0.5% y soya, siendo ésta la que presenta la expresión más baja.

Al consumir por siete días las proteínas dietarias (**Figura 15B**), se observó que los tratamientos con frijol, maíz y frijol/maíz, siguen manteniendo una expresión elevada de mTOR, seguido del tratamiento con soya/maíz, soya y caseína 0.5% e interesantemente las ratas alimentadas con caseína 20% presentaron la menor expresión de mTOR.

Por último, al día 14 de recuperación (**Figura 15C**), el tratamiento con frijol siguió manteniendo un mayor efecto sobre la expresión génica, seguido por el tratamiento con soya. La expresión con los tratamientos que contenían caseína al 20%, maíz y ambas mezclas, mantuvieron niveles muy parecidos a los de caseína al 0.5%.

8.4.2. Expresión génica de S6K

La expresión génica de S6K es importante, pues es uno de los blancos que componen la ruta de señalización de mTORC, en la **Figura 16** están las gráficas de la expresión relativa de los tres días de recuperación.

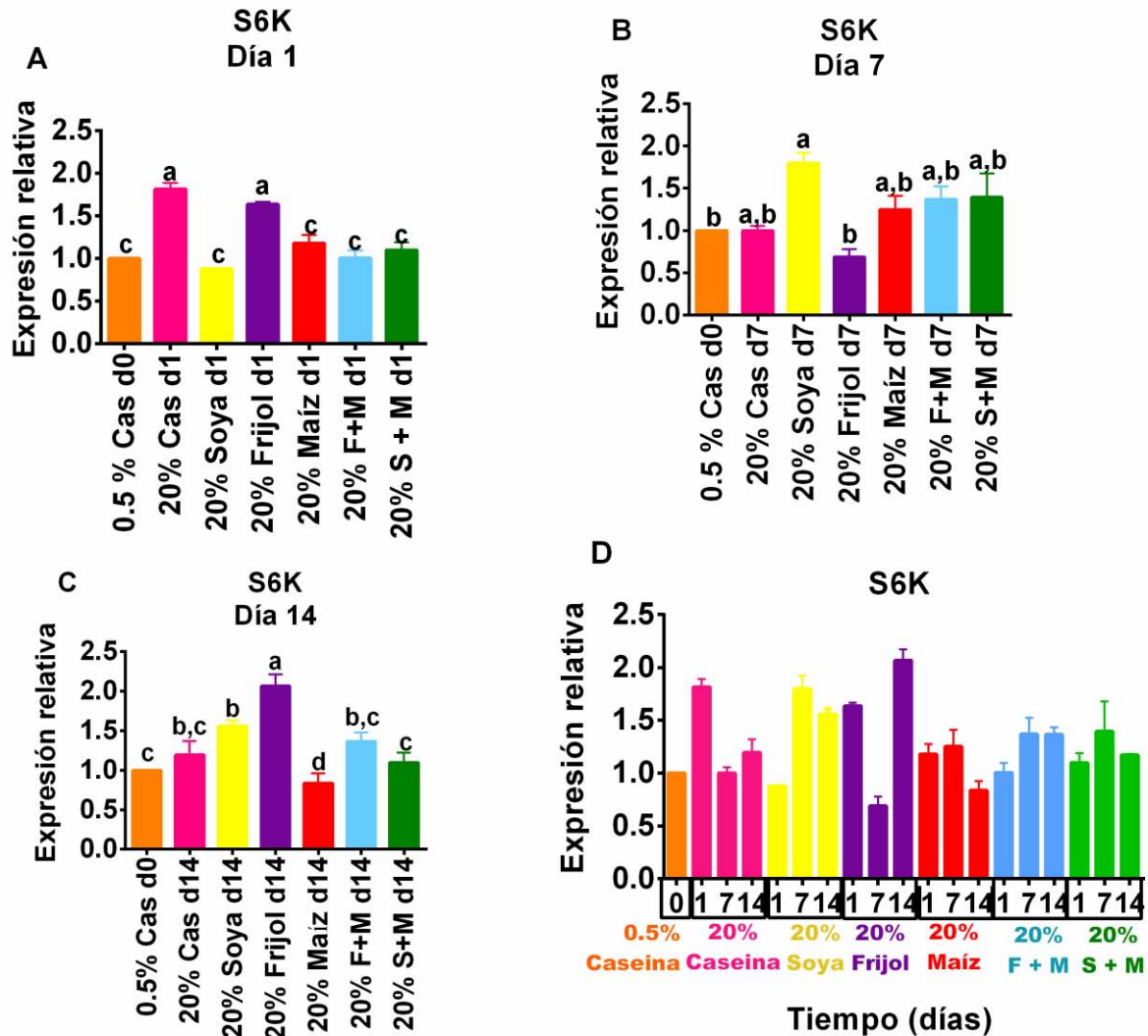


Figura 16. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de S6K en hígado, a través de PCR en tiempo real.

(A). Expresión génica de S6K en el día 1, en hígado. (B). Expresión génica de S6K en el día 7. (C). Expresión génica de S6K en el día 14. (D). Promedio de la expresión génica de S6K, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c>d). P<0.05 ANOVA de una vía. Los resultados son promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Se observó que al primer día de recuperación (**Figura 16A**), las ratas alimentadas con caseína 20% y frijol presentaron la mayor expresión génica de S6K. El consumo de soya, maíz, frijol/maíz y soya/maíz, no generó un cambio significativo con respecto al consumo de caseína al 0.5%

Durante siete días de recuperación (**Figura 16B**), la ingesta de soya provocó el mayor efecto sobre la expresión génica, seguido de los tratamientos de maíz, frijol/maíz y soya/maíz. El consumo de caseína al 20% no tuvo un efecto significativo, pues mantuvo una expresión semejante al grupo que consumió caseína al 0.5%. El grupo que fue alimentado con el concentrado de frijol, fue el que tuvo el menor efecto sobre la expresión génica de S6K en este día. Sin embargo, solo fue durante el día siete, ya que para el día 14 (**Figura 16C**), la ingesta de frijol volvió a presentar los niveles más altos sobre la expresión génica, seguido de la dieta con soya, caseína al 20% y frijol/maíz. Las dietas que no mostraron un efecto sobre la expresión fueron soya/maíz y maíz, esto debido a que no hubo cambio con respecto a la dieta con caseína al 0.5%, la cual es con la que los animales se encuentran desnutridos y la que se tomó como control.

8.4.3. Expresión génica de eIF4e

Se determinó la expresión de eIF4e, el cual es un blanco de 4E-BP1, proteína regulada por mTORC1. A continuación en la **Figura 17** se muestra la expresión relativa.

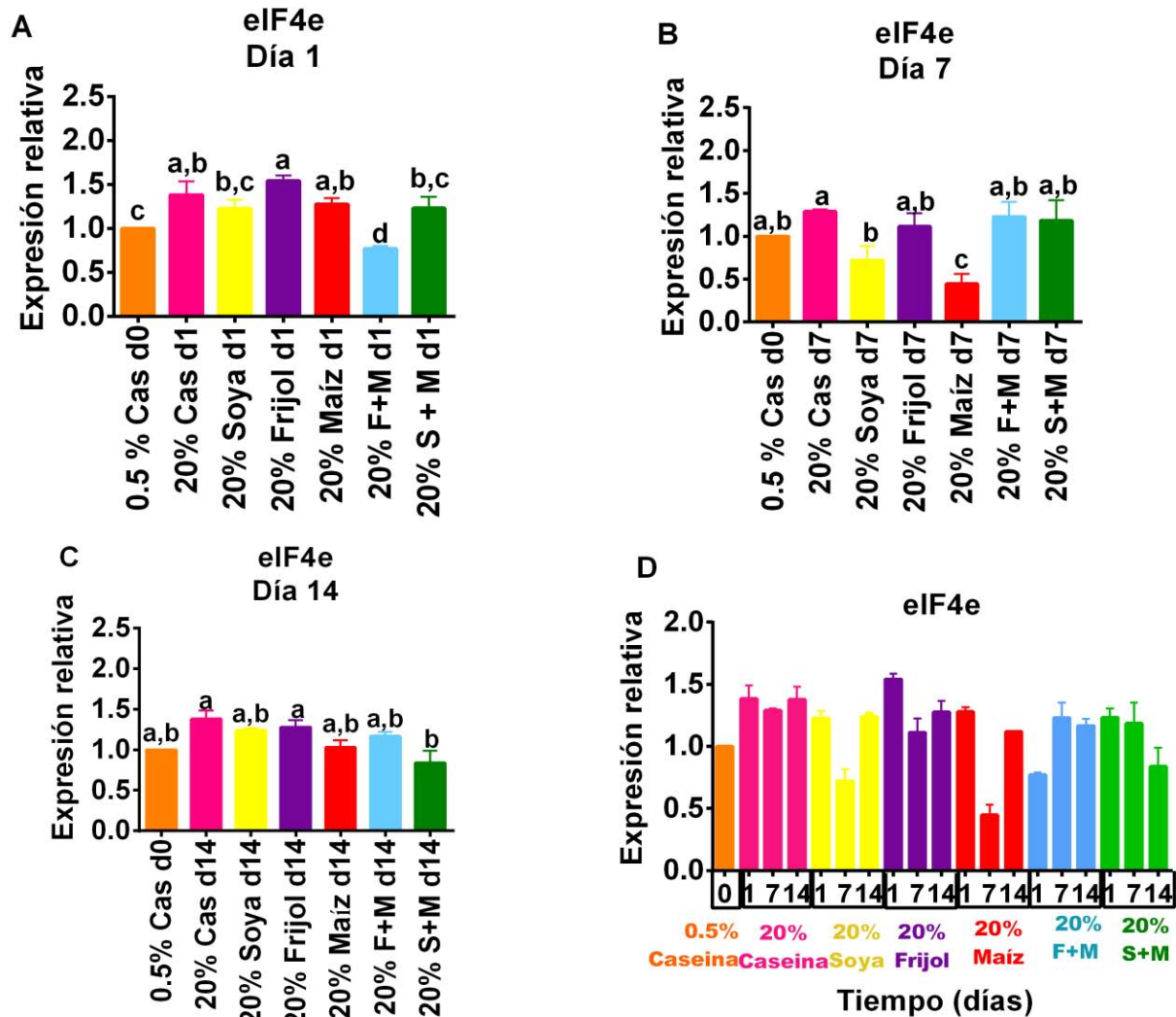


Figura 17. Efecto de los diferentes tratamientos dietarios durante los días de recuperación 1, 7 y 14 sobre la expresión relativa de eIF4E en hígado a través de PCR en tiempo real.

(A). Expresión génica de eIF4e en el día 1, en hígado. (B). Expresión génica de eIF4e en el día 7. (C). Expresión génica de eIF4e en el día 14. (D). Promedio de la expresión génica de eIF4e, en los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia

estadística significativa ($a>b>c>d$). $P<0.05$ ANOVA de una vía. Los resultados son promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes.

En el día uno (**Figura 17A**), las ratas que ingirieron los tratamientos con frijol, caseína al 20% y maíz fueron los que tuvieron una mayor expresión génica seguidos de soya, soya/maíz y caseína al 0.5%, mientras que las ratas alimentadas con frijol/maíz tuvieron la menor expresión de este gen.

Al séptimo día de recuperación (**Figura 17B**), la tendencia indica que la expresión fue ligeramente mayor con el consumo de caseína al 20%, frijol y las dos mezclas evaluadas. De manera contraria, el consumo de maíz no tuvo un efecto sobre la expresión, debido a que los niveles son muy bajos. Nuevamente el tratamiento con soya tuvo una expresión parecida a la de caseína al 0.5%. Para el último día de recuperación (**Figura 17C**), el único tratamiento con una expresión baja con respecto a los tratamientos de caseína al 20% y frijol, fue soya/maíz, mientras que entre los demás tratamientos la expresión es similar y ligeramente más elevada que el grupo que consumió caseína al 0.5%.

8.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEÍNICA.

8.5.1. Densitometría de mTORC1

La expresión de proteína asegura que la activación de las proteínas se llevó a cabo, a continuación en la **Figura 18** se muestran las densitometrias de la proteína mTORC1 en los tres diferentes días de recuperación.

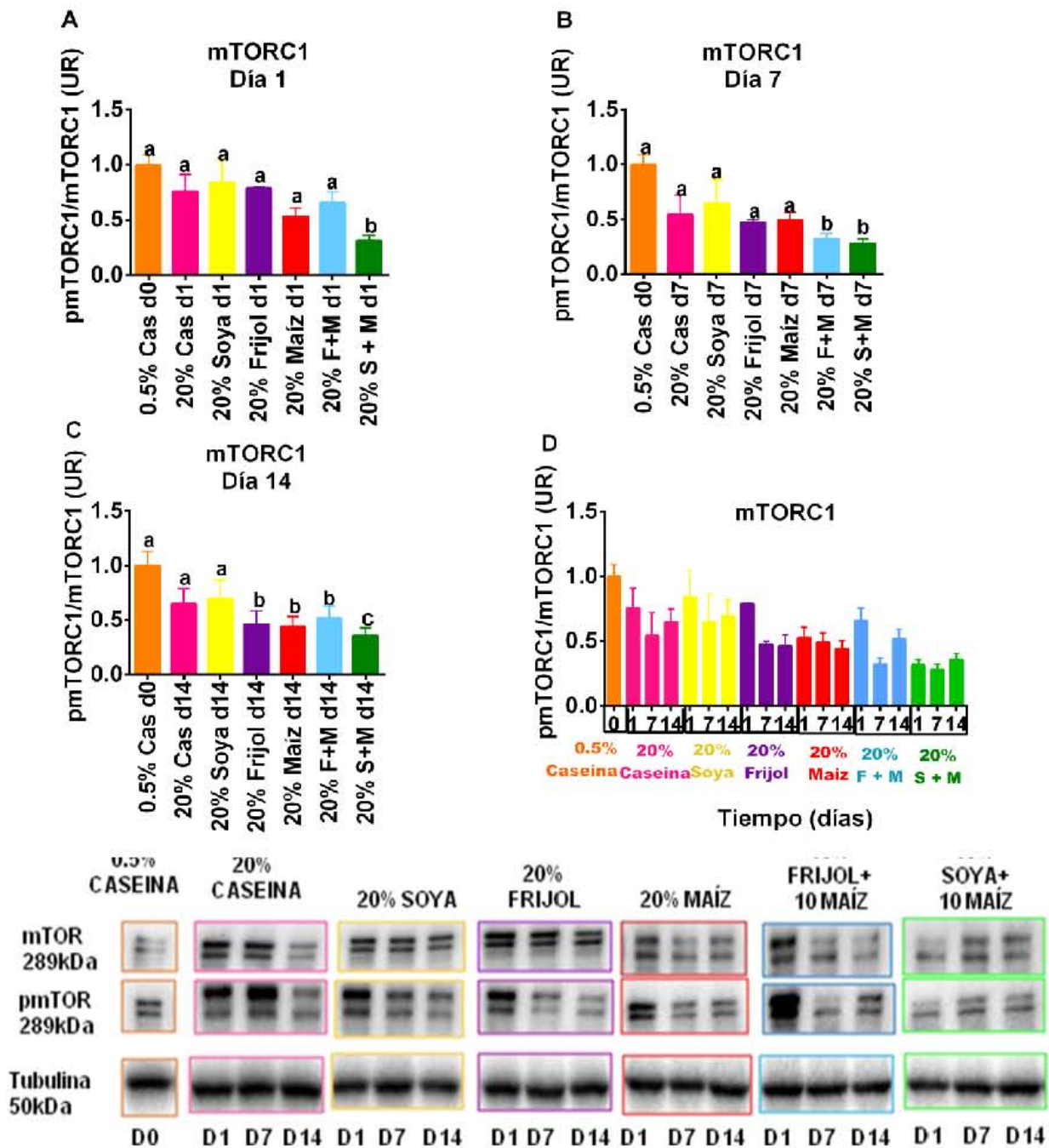


Figura 18. Análisis densitométrico del western blot de mTORC1 en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación. (A). pmTORC1/mTORC1 al día 1 de recuperación. (B). pmTORC1/mTORC1 al día 7 de recuperación (C). pmTORC1/mTORC1 al día 14 de recuperación. (D). Promedio de la relación pmTORC1/mTORC1 de los tres días de

recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c). P<0.05 ANOVA de una vía. Los resultados son promedios ± SEM de 2 experimentos independientes por construcción.

En el primer día de ingesta de las diferentes dietas (**Figura 18A**), se observó un incremento en la relación pmTORC1/mTORC1 en todos los grupos dietarios; sin embargo, ésta no fue mayor comparada con el grupo control (caseína 0.5%). Después de haber ingerido por siete días cada uno de los tratamientos (**Figura 18B**), se observó nuevamente que ningún tratamiento con el 20% de proteína, logró tener una expresión de pmTORC1/mTORC1 mayor que la de caseína al 0.5%. A pesar de ésto, el consumo de soya ocasionó ligeramente una mayor expresión comparada con el consumo de caseína al 20%, frijol, maíz, frijol/maíz y soya/maíz, siendo estos últimos tratamientos, los que presentarán una menor expresión.

A 14 días de recuperación (**Figura 18C**), se repitió el mismo efecto que en el día siete, ya que la ingesta de las proteínas dietarias sobre la expresión de la proteína fosforilada siguió sin ser superior al efecto que tiene la ingesta de caseína al 0.5%. Nuevamente el tratamiento de soya tuvo la expresión más elevada de proteína, seguido por el tratamiento de caseína al 20%. Los tratamientos que mantuvieron una expresión constante pero baja fueron frijol, maíz y frijol/maíz. Por último, el consumo de soya/maíz, presentó la expresión de proteína más baja.

8.5.2. Densitometría de S6K

En la **Figura 19** se presentan las diferentes densitometrías de S6K que se obtuvieron durante los tres días de recuperación.

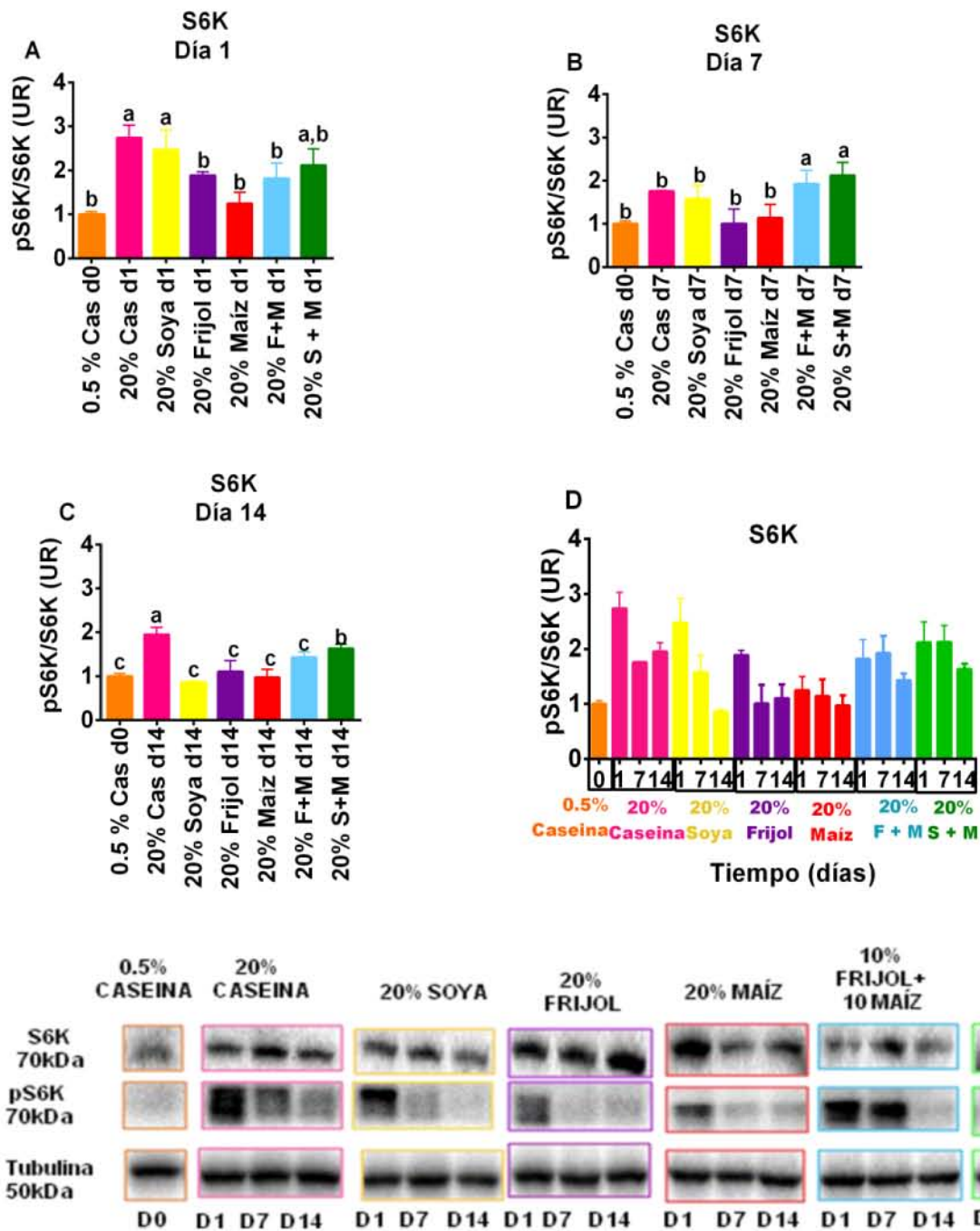


Figura 19. Análisis densitométrico del western blot de S6K en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación.

(A). pS6K/S6K al día 1 de recuperación. (B). pS6K/S6K al día 7 de recuperación (C). pS6K/S6K al día 14 de recuperación. (D). Promedio de la relación pS6K/S6K de los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c). P<0.05 ANOVA de una vía. Los resultados son promedios \pm SEM de 2 experimentos independientes por construcción.

En la expresión de la proteína pS6K en relación a la total, se puede observar, **(Figura 19A)**, que desde el día uno de la ingesta de los diferentes tratamientos dietarios, se estimuló la expresión de la fosforilación de S6K en comparación con el grupo desnutrido. Los grupos de caseína al 20%, soya y soya/maíz presentaron la mayor expresión seguidos de los los tratamientos con frijol, maíz y frijol/maíz, en comparación al grupo alimentado con caseína 0.5% La ingesta de los distintos tratamientos por siete días **(Figura 19B)**, ocasionó que la expresión de pS6K/S6K aumentara con los tratamientos de frijol/maíz y soya/maíz, mientras que los tratamientos de caseína al 20%, soya, frijol y maíz disminuyeron ligeramente la expresión. Finalmente, al día 14 **(Figura 19C)**, el único grupo con mayor expresión fue caseína al 20%, mientras que los demás grupos presentaron una disminución en su expresión.

8.5.3. Densitometría de 4E-BP1

Finalmente en la **Figura 20**, se encuentran las gráficas de la relación p4E-BP1/4E-BP1 en los tres días de recuperación.

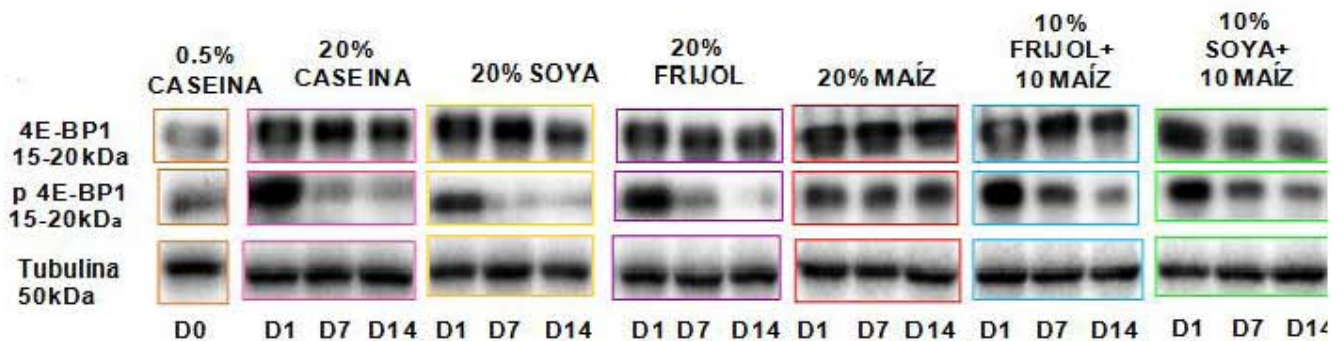
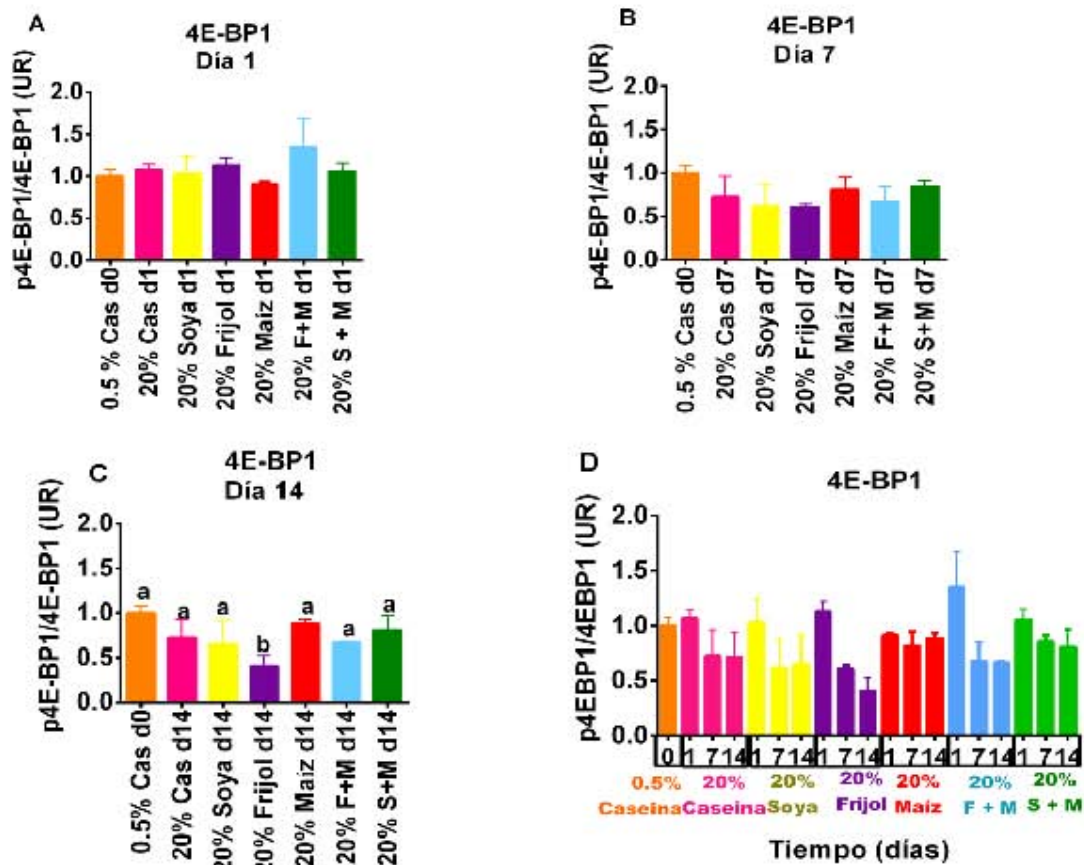


Figura 20. Análisis densitométrico del western blot de 4E-BP1 en hígado de ratas alimentadas con las diferentes dietas de recuperación.

(A). 4E-BP1/p4E-BP1 al día 1 de recuperación. (B). p4E-BP1/4E-BP1 al día 7 de recuperación (C). p4E-BP1/4E-BP1 al día 14 de recuperación. (D). Promedio de la relación p4E-BP1/4E-BP1 de los tres días de recuperación. N= 6 por cada grupo experimental. Diferentes letras representan diferencia estadística significativa (a>b>c). P<0.05 ANOVA de una vía. Los resultados son promedios ± SEM de 2 experimentos independientes por construcción.

En el primer día de ingesta de los tratamientos dietarios (**Figura 20 A**) se observó que el grupo que tuvo mayor fosforilación de 4E-BP1, con respecto a los demás grupos fue frijol/maíz. Por otro lado, los tratamientos de caseína al 20%, soya, frijol y soya/maíz tuvieron una expresión muy similar al de caseína al 0.5%. Por último, el consumo de maíz tuvo la menor expresión.

Para el día siete de recuperación (**Figura 20B**), se observó que la expresión proteínica fue constante y ningún tratamiento pudo ser superior a la expresión provocada al consumir caseína al 0.5%. Para el día catorce (**Figura 20C**) el tratamiento que disminuyó más su expresión fue frijol. Entre tanto los tratamientos de caseína al 20%, soya, maíz, frijol/maíz y soya/maíz tuvieron una expresión similar a la de caseína al 0.5%.

8.6. ANÁLISIS HISTOMORFOLÓGICO

La histología es una técnica que permite analizar primero, el impacto del daño que la desnutrición ocasionó y en segundo lugar, analizar el efecto que tuvieron las diferentes dietas de recuperación en los hígados de las ratas. Como ya se mencionó, este órgano es uno de los más afectados cuando se presenta una descompensación principalmente de proteína dietaria, pues es el encargado de sintetizar proteínas y lípidos o sustancias grasas como: triglicéridos, el colesterol y algunas lipoproteínas (56).

Es importante mencionar que la interpretación de los cortes histológicos, se llevó a cabo en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la Maestra en Ciencias Itzel Yañez Muñoz.

8.6.1. Grupo Caseína al 0.5%

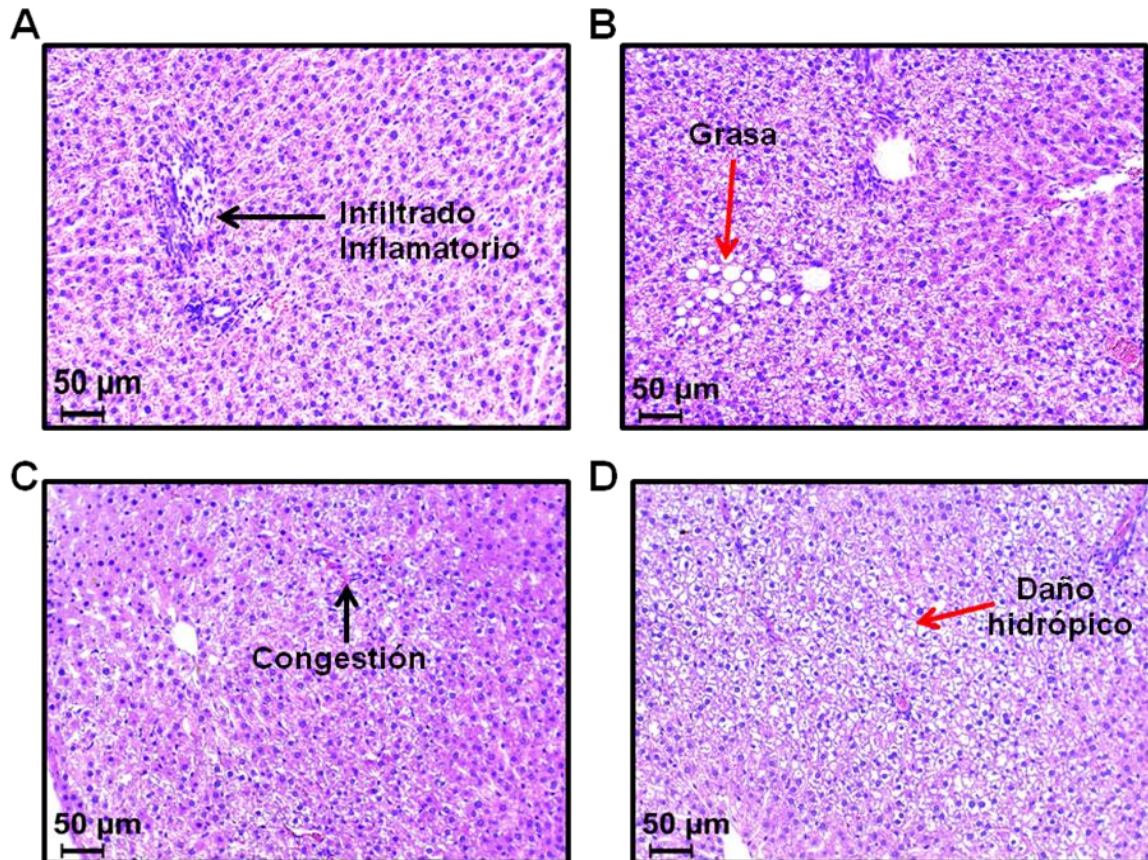
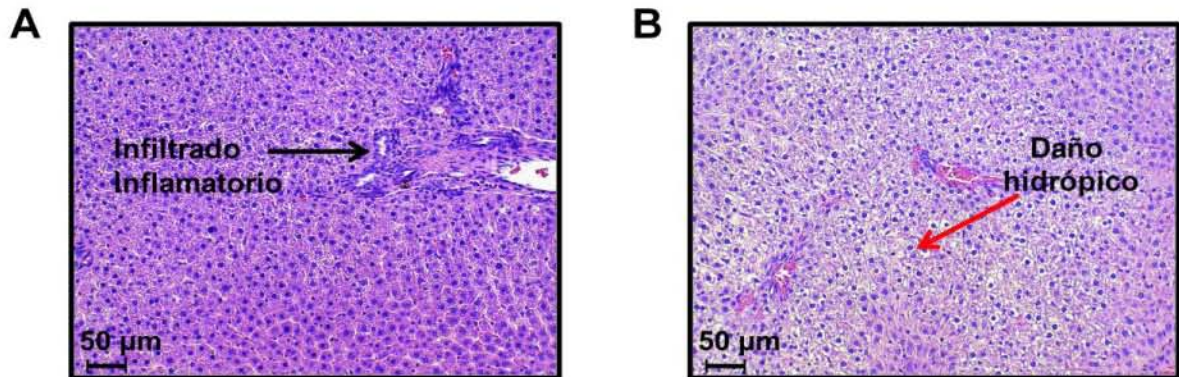


Figura 21. Histologías de hígado ratas alimentadas con 0.5% caseína 20X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina). (A). Representación del infiltrado en hígado. (B). Degeneración grasa (C). Congestión. (D). Degeneración hidrópica o daño hidrópico.

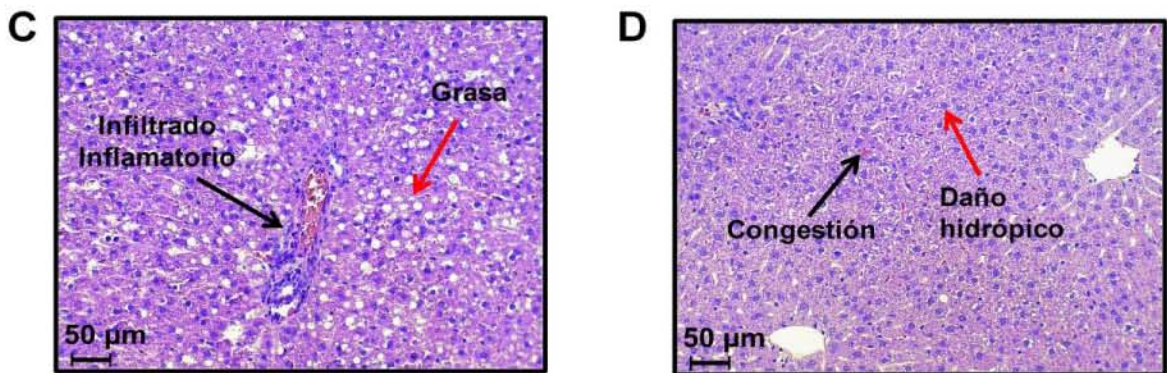
De forma general, los hígados de este grupo (**Figura 21**), presentaron dos tipos de degeneración: hidrópica y grasa. El grado del daño hidrópico que se observó fue de ligero a moderado con una distribución multifocal. El de grasa fue de moderado a severo, con distribución multifocal y difusa. Otros daños presentados fueron: infiltrado inflamatorio periportal linfocítico ligero multifocal y congestión centrolobulillar moderada.

8.6.2. Caseína 20%

DÍA 1



DÍA 7



DÍA 14

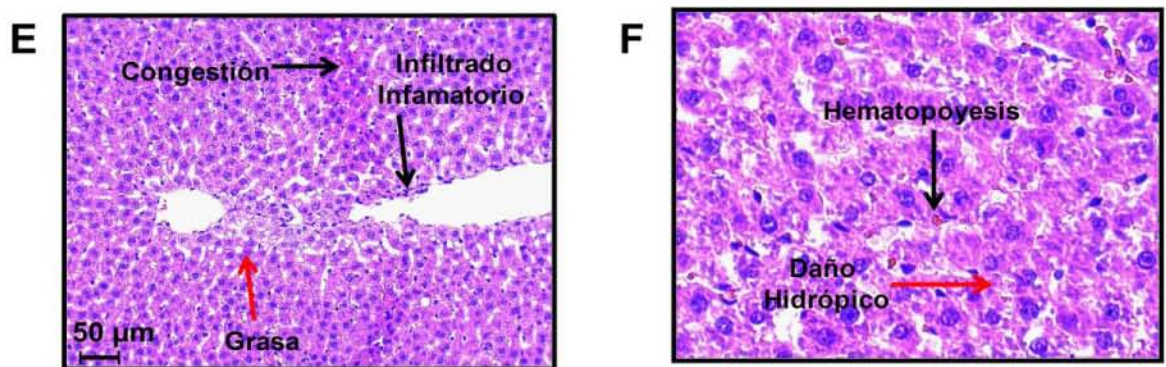


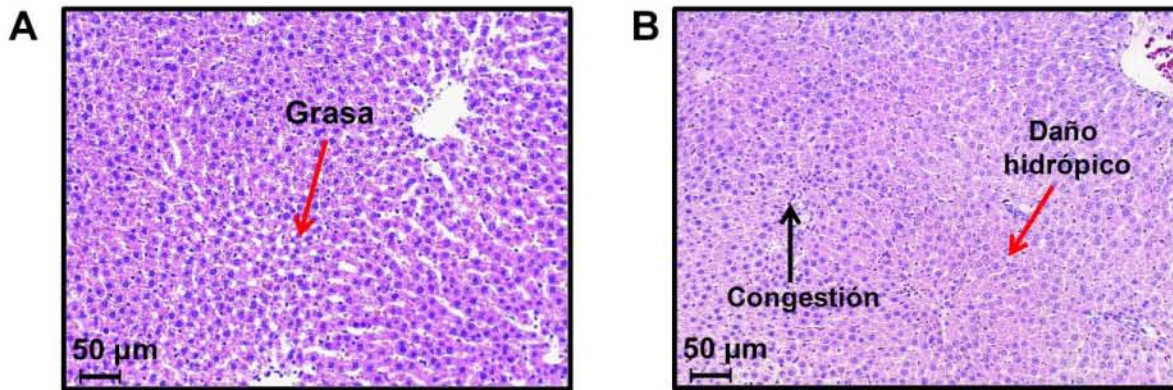
Figura 22. Histologías de hígado de ratas alimentadas con caseína 20%: (A) representación del infiltrado inflamatorio; (B) representación del daño hidrópico; (C) representación de infiltrado inflamatorio y acumulación de

grasa; (D) representación de congestión y daño hidrópico; (E) representación de congestión, infiltrado inflamatorio y acumulación de grasa; (F) representación de hematopoyesis y daño hidrópico. Imágenes tomadas con aumento de 20X y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

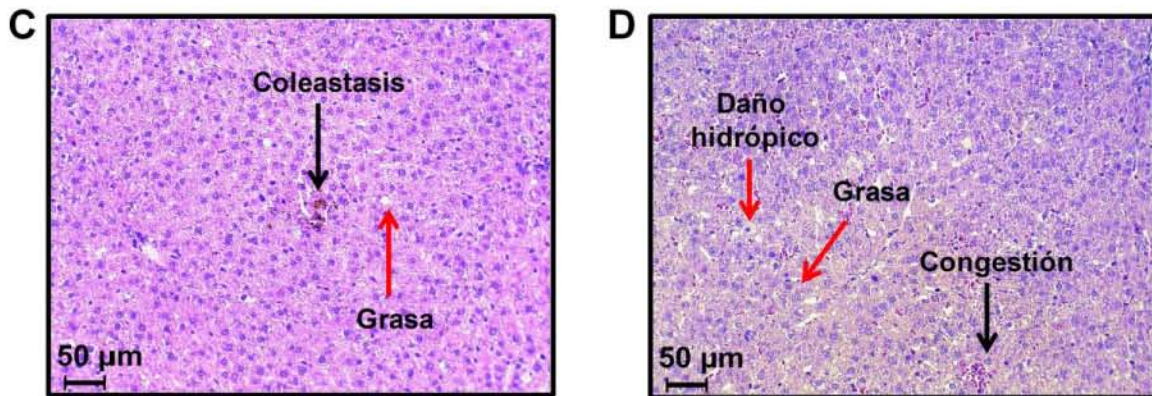
Los daños hepáticos que sufrieron los animales que consumieron caseína al 20% (**Figura 22**), al primer día de recuperación fueron: degeneración hidrópica de ligera a severa e infiltrado inflamatorio periportal linfocítico. Para los días siete y 14 los daños se incrementaron, ya que además de presentarse degeneración hidrópica, también se observó degeneración grasa, siendo el grado del daño de ligero a moderado. Otros daños en común fueron infiltrado inflamatorio periportal linfocítico ligero y congestión ligera. Además de presentar estos daños, en el día 14 hubo signos de hematopoyesis extramedular ligera.

8.6.3. Soya.

DÍA 1



DÍA 7



DÍA 14

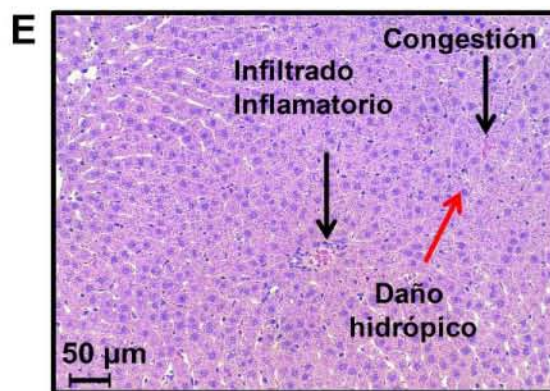


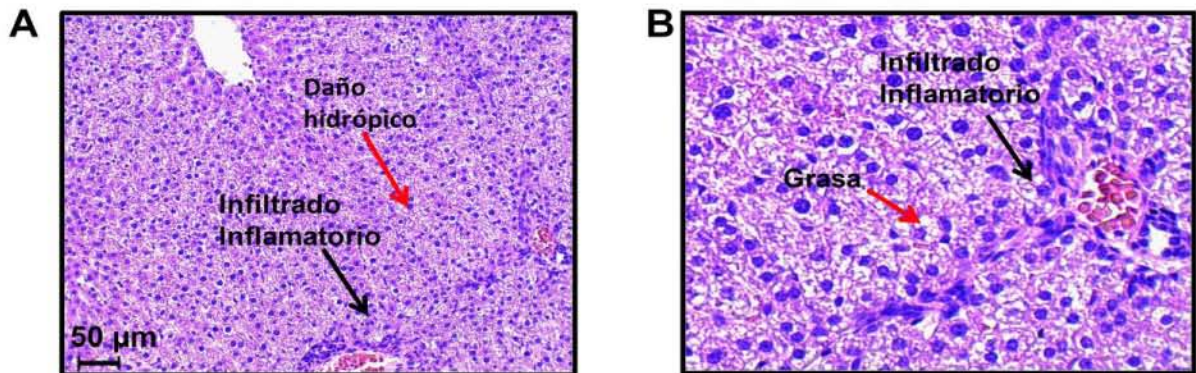
Figura 23. Histologías de hígado ratas alimentadas con soya 20%: (A) representación de acumulación de grasa; (B) representación de congestión y

de daño hidrópico; (C) representación de coleastasis y acumulación de grasa; (D) representación de congestión, daño hidrópico y acumulación de grasa; (E) representación de congestión, infiltrado inflamatorio y daño hidrópico. Imágenes tomadas con aumento de 20X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

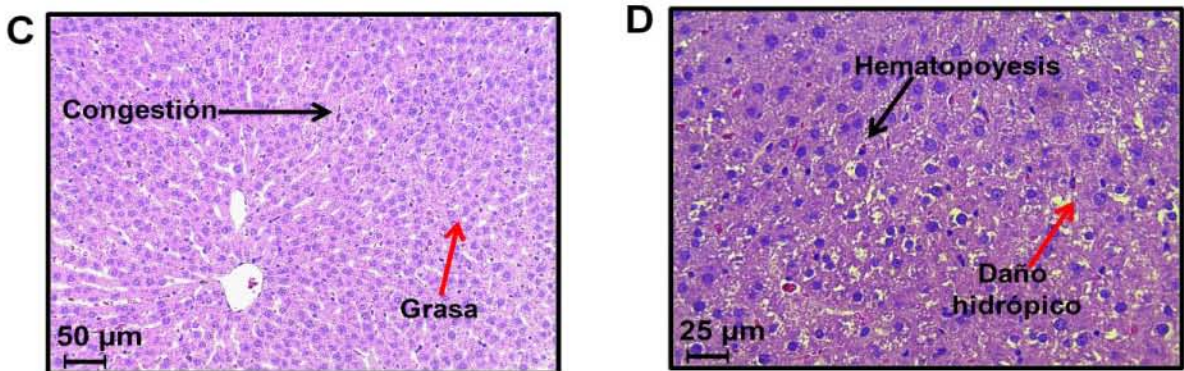
Los animales que consumieron soya al 20% por un día (**Figura 23**), presentaron los dos tipos de degeneración en hígado grasa e hidrópica. El grado de ambos tipos de degeneración fue de leve a moderada, además de presentarse una ligera congestión. Para el séptimo día de recuperación, aunque los hígados mantuvieron los dos tipos de degeneración grasa e hidrópica, el nivel del daño solo fue leve. Otros daños presentados fueron ligera congestión y presencia de pigmento ocre periporal (colestasis). En el último día de recuperación solo hubo degeneración hidrópica leve, ligera congestión e infiltrado inflamatorio linfocítico periportal leve.

8.6.4. Frijol.

DÍA 1



DÍA 7



DÍA 14

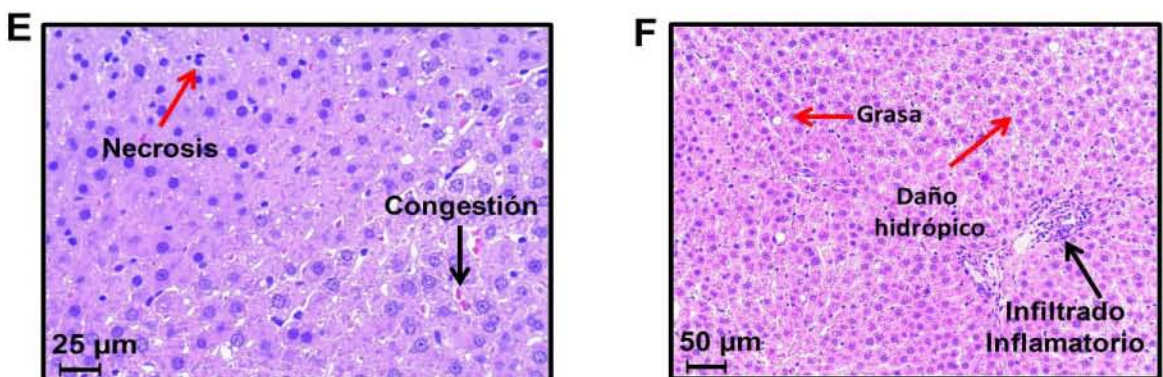


Figura 24. Histologías de hígado de ratas alimentadas con frijol 20%: (A) representación de infiltrado inflamatorio y daño hidrópico; (B) representación de infiltrado inflatorio y acumulación de grasa; (C)

representación de congestión y acumulación de grasa; (D) representación de hematopoyesis y daño hidrópico; (E) representación de necrosis y congestión y (F) representación de acumulación de grasa, daño hidrópico e infiltrado inflamatorio. Imágenes tomadas con aumento de 20 y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

En los días uno y siete de recuperación (**Figura 24**), la ingesta de frijol ocasionó en los hígados de las ratas que presentarán ambos tipos de degeneraciones, hidrópica de moderada a severa y grasa de leve a moderada. Otros daños observados en ambos días fueron: ligera congestión e infiltrado inflamatorio linfocítico periportal leve. Solo en el día siete se observó hematopoyesis extramedular. En el día 14, también se observaron los dos tipos degeneraciones ambas en grado ligero. Además, se presentaron daños como: infiltrado inflamatorio periportal, áreas de necrosis subcapsular y congestión.

8.6.5. Maíz

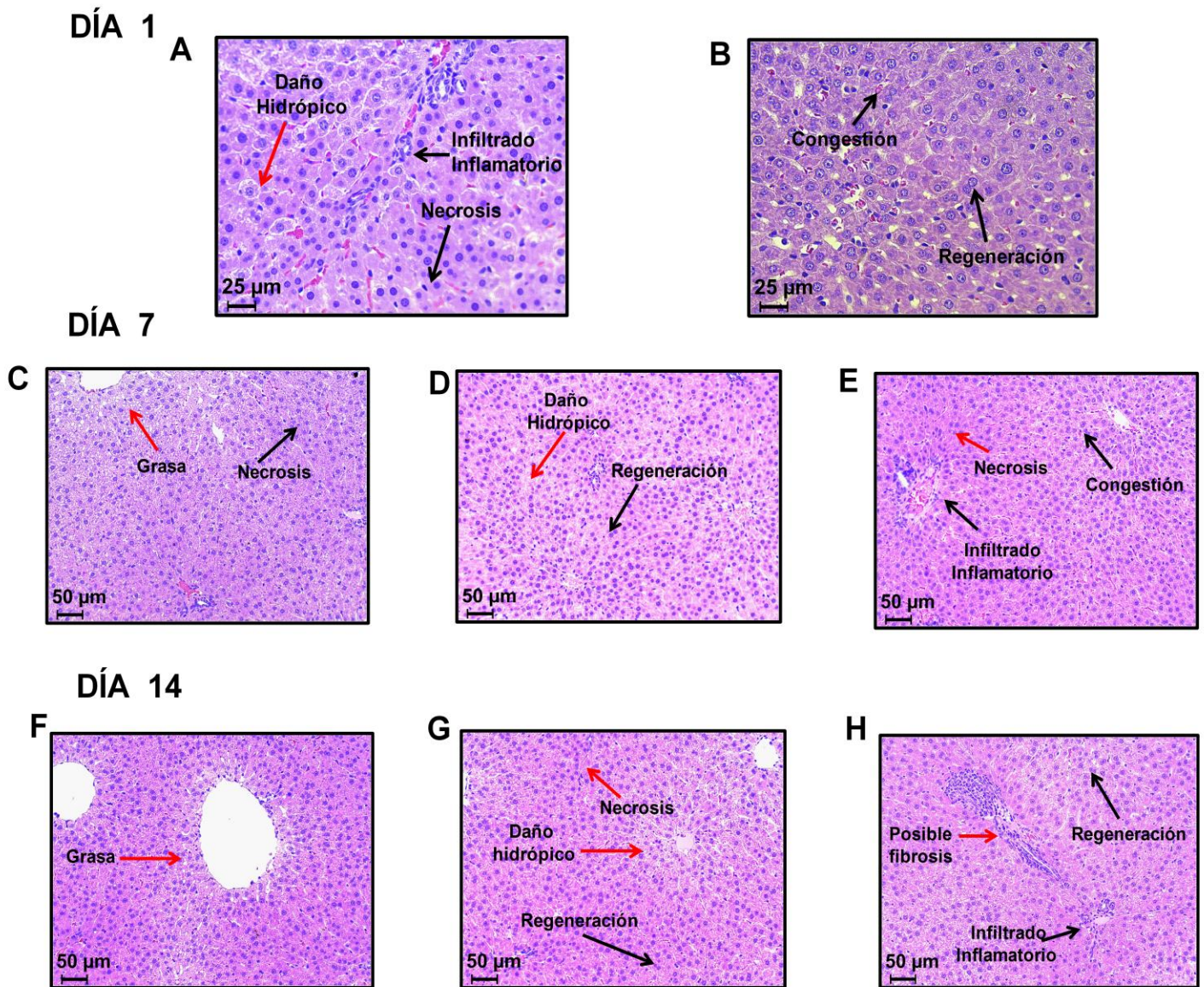
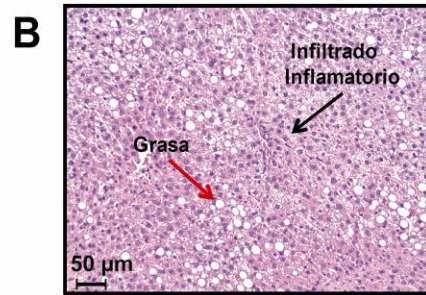
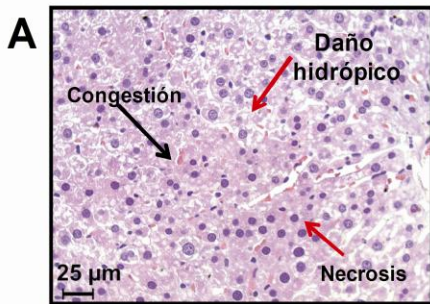


Figura 25. Histologías de hígado de ratas alimentadas con maíz 20%: (A) representación de infiltrado inflamatorio, daño hidrópico y necrosis; (B) representación de congestión y regeneración; (C) representación de necrosis y acumulación de grasa; (D) representación de daño hidrópico y regeneración; (E) representación de necrosis, congestión e infiltrado inflamatorio; (F) representación de acumulación de grasa; (G) representación de necrosis, daño hidrópico y regeneración y (H) representación de posible fibrosis, infiltrado inflamatorio y regeneración. Imágenes tomadas con aumento de 20 y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

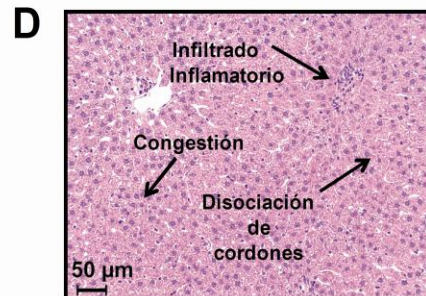
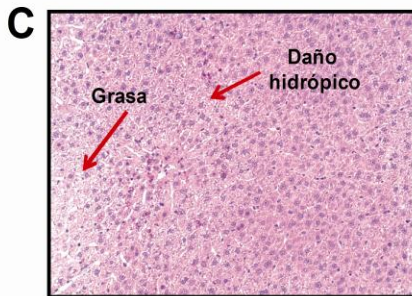
Al primer día de recuperación, (**Figura 25**) con la ingesta de maíz al 20%, todos los animales de este grupo presentaron degeneración hidrópica de leve a moderada y daños como: congestión centrolobulillar, necrosis subcapsular así como evidencia de regeneración. Para los días siete y 14, se observaron ambas degeneraciones, hidrópica y grasa de moderada a leve. Otros daños presentados fueron infiltrado inflamatorio, congestión centrolobulillar, focos de necrosis discretos multifocales y evidencia de regeneración. Únicamente en el día 14 se observaron signos muy afines a la fibrosis periportal.

8.6.6. Frijol/Maíz

DÍA 1



DÍA 7



DÍA 14

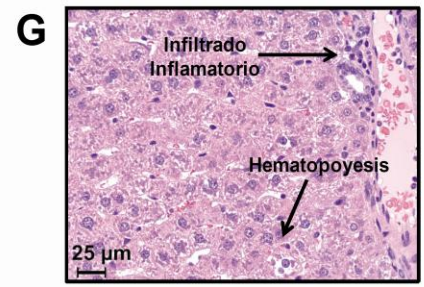
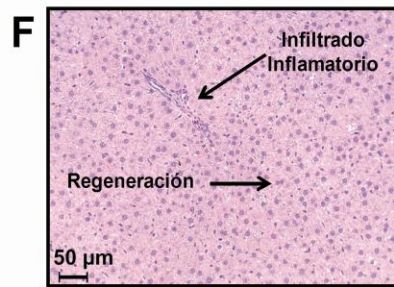
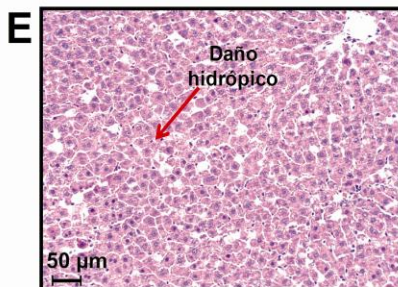


Figura 26. Histologías de hígado de ratas alimentadas con frijol 10% / maíz 10%: (A) representación de daño hidrópico, congestión y necrosis; (B) representación de acumulación de grasa e infiltrado inflamatorio; (C) representación de acumulación de grasa y daño hidrópico; (D) representación de infiltrado inflamatorio, congestión y disociación de cordones; (E) representación de daño hidrópico; (F) representación de regeneración e infiltrado inflamatorio y (G) representación de infiltrado inflamatorio y hematopoyesis. Imágenes tomadas con aumento de 20 y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

En los días uno y siete de ingesta con frijol/maíz (**Figura 26**), se observaron degeneraciones, hidrópica y grasa entre leve y moderada. Mientras que para el día 14 la degeneración que persistió solo fue la hidrópica de leve a moderada.

Con respecto a otros daños, en el día uno se detectaron: necrosis hepatocelular moderada, infiltrado inflamatorio periportal moderado y congestión centrolobulillar severa. En el día siete se observó: infiltrado inflamatorio moderado y congestión centrolobulillar con disociaciones de cordones. Para el último día de recuperación, se observó infiltrado inflamatorio periportal discreto, hematopoyesis y evidencia de regeneración.

8.6.7. Soya/Maíz

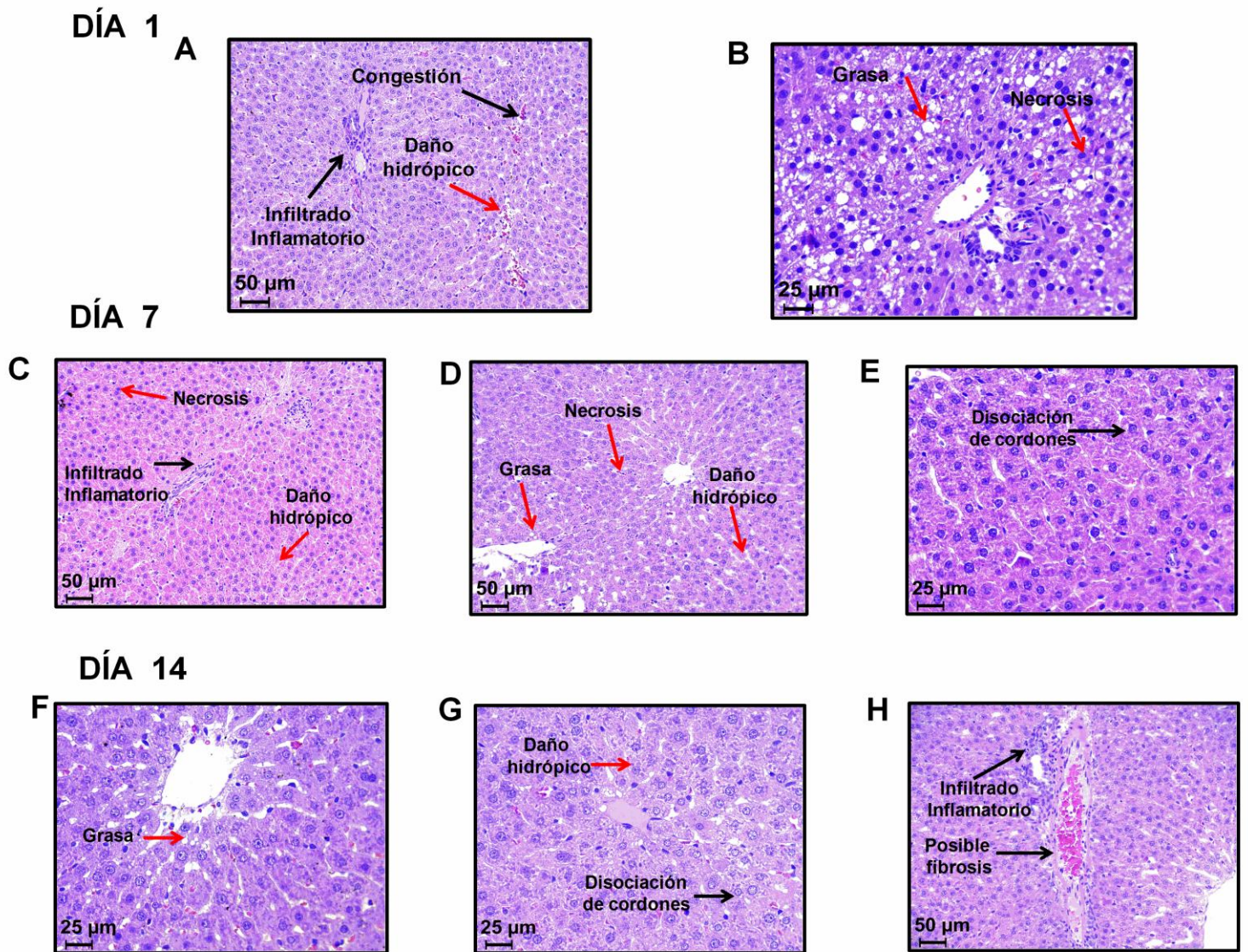


Figura 27. Histologías de hígado de ratas alimentadas con soya 10%/ maíz 10% día 1, (A) representación de daño hidrópico, congestión e infiltrado inflamatorio; (B) representación de acumulación de grasa y necrosis; (C) representación de daño hidrópico, necrosis e infiltrado inflamatorio; (D) representación de acumulación de grasa, necrosis y daño hidrópico; (E) representación de disociación de cordones; (F) representación de acumulación de grasa; (G) representación de daño hidrópico y disociación de cordones; (H) representación de infiltrado inflamatorio y posible fibrosis. Imágenes tomadas con aumento de 20 y 40X. Tinción HE (Hematoxilina-Eosina).

En los tres días de ingesta de soya/maíz (**Figura 27**), se observaron los dos tipos de degeneraciones, la hidrópica y la grasa en un nivel de daño moderado. Para el día uno otros daños observados fueron: infiltrado inflamatorio periportal leve, necrosis y congestión centrolobulillar, mientras que en los días siete y 14, se encontró disociación de cordones, infiltrado inflamatorio periportal leve y áreas de necrosis coagulativa. Solo en el día 14 hubo congestión centrolobulillar y hematopoyesis extra medular.

9. DISCUSIÓN

La desnutrición proteínica ocasiona diferentes tipos de alteraciones en el organismo no solo a nivel fisiológico sino también a nivel molecular, esto debido a que las proteínas tienen múltiples funciones, de defensa, de estructura, de enzimas en los diferentes procesos metabólicos, aporte de energía, entre otros (32).

Una posible solución para tratar el problema de desnutrición es el consumo de alimentos de buena calidad, principalmente de proteínas que aporten los aminoácidos indispensables; sin embargo, el costo de éstas (por lo general proteínas de origen animal), los hace inaccesibles a la población en riesgo, primordialmente niños, adultos mayores y personas hospitalizadas. Una opción para cubrir el requerimiento de aminoácidos indispensables, es a través del consumo de proteínas de origen vegetal, las cuales son muy heterogéneas en su calidad y composición. Sin embargo, existen proteínas derivadas de algunas leguminosas, como la de la soya, que son de buena calidad, en tanto que algunas otras como las proteínas de cereales presentan deficiencia de varios aminoácidos, lo que las hace proteínas con una bajo score químico y por consecuencia con una baja calidad proteínica. Una alternativa, consiste en combinar proteínas de leguminosas con proteínas provenientes de los cereales, ya que éstas se complementan entre sí generando una proteína de buena calidad proteínica, adicionalmente 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; por ejemplo, las proteínas de origen animal tienden a ser hipercolesterolémicas que las de origen vegetal. Por otro lado, la regulación del metabolismo de lípidos es diferente cuando se consumen proteínas de origen animal que cuando se consumen proteínas de origen vegetal (17), (18), (57).

Por esta razón en el presente estudio se evaluó el efecto de proteínas provenientes de diferentes fuentes: el frijol que en general aporta una gran cantidad de aminoácidos indispensables; sin embargo, es limitante en

aminoácidos azufrados. El maíz que posee un alto contenido de leucina pero es deficiente en lisina y triptófano. La proteína de soya, que es una proteína con un valor de score químico de 93, además de tener compuestos bioactivos que contribuyen en la regulación del metabolismo de lípidos, así como en la regulación de las concentraciones de insulina y glucagón (58), (22). También se evaluó la combinación de maíz y frijol que son las proteínas de mayor consumo en México, ya sea de manera individual o juntas y la combinación de maíz y proteína de soya. Finalmente la caseína se utilizó como proteína control. Todas estas proteínas o combinaciones de proteínas se utilizaron para evaluar el impacto que tienen sobre la síntesis de proteínas después de un periodo de desnutrición, a través de la ruta de mTORC1 en hígado de ratas Sprague Dawley.

En estudios previos, el grado de desnutrición se ha establecido a través de la evaluación del peso corporal, considerando como desnutrición severa cuando el peso corporal es 60% menor en relación a animales alimentados con dietas control (1). En el presente estudio, las ratas alimentadas con la dieta con 0.5% de caseína presentaron un peso corporal 50% menor en comparación con las ratas alimentadas con caseína al 20%, lo que indica que el modelo de alimentación empleado generó satisfactoriamente desnutrición en los animales. Otras características que presentó el grupo alimentado con caseína 0.5% fueron: agresividad, sensibilidad al tacto, pelo áspero y con coloración levemente amarillenta, lo que indica que físicamente los animales estaban sufriendo una deficiencia de nutrientes, principalmente de aminoácidos (1). Durante el periodo de recuperación nutricional, las proteínas que favorecieron en mayor proporción la recuperación de peso fueron las dietas con caseína (74.43%), proteína de soya (66.70%) y las mezclas de proteínas soya/maíz (66.80%) y frijol/maíz (64.09%). Lo anterior era de esperarse, debido a que son los tratamientos con los mayores valores de score químico que se encuentran en la **Tabla 7**, lo que indica que aportan en cantidades adecuadas los aminoácidos indispensables, por lo que se consideran proteínas de buena calidad proteica en comparación con las proteínas de maíz y frijol.

En términos generales los tratamientos no provocaron cambios significativos en los parámetros bioquímicos; sin embargo, el único parámetro alterado fue la concentración de insulina por el consumo de caseína al 20% después de siete días, disminuyendo en el día 14 a niveles normales, mientras que la concentración de glucosa se mantuvo elevada. Estos resultados concuerdan con los de un estudio en el cual se evaluó el efecto de la ingesta de diferentes proteínas como soya y caseína, en las concentraciones séricas de insulina y glucagón. Después de una hora de consumo, la caseína originó concentraciones más altas de insulina en suero y bajos niveles de glucagón, lo que se atribuyó a la relación de Lys/Arg (59). Posiblemente el consumo de caseína para el tratamiento de recuperación de la desnutrición podría no ser tan satisfactorio, ya que en nuestro estudio provocó una alteración en la secreción de insulina al generarse picos elevados de la hormona al día siete, lo cual está muy relacionado a resistencia a la insulina, trayendo como consecuencia posiblemente problemas cardiovasculares como dislipidemia, hipertensión, obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria (60). Sin embargo, fue uno de los tratamientos dietarios con el cual los animales tuvieron una mejor recuperación de peso corporal.

Otro de los parámetros bioquímicos cuya medición resultó importante, fue la concentración de albúmina sérica, principal proteína plasmática producida por el hígado que se encuentra circulante en suero y se considera como un indicador del diagnóstico de la desnutrición (61) y (23). En el presente estudio se pudo observar que a pesar que los animales perdieron peso durante el periodo de desnutrición no disminuyeron sus concentraciones de albúmina. Esto debido probablemente a que el tiempo de desnutrición no fue el suficiente para el desarrollo de un grado de desnutrición severo; sin embargo, si se prolongaba el tiempo de desnutrición, se corría el riesgo de que los animales no resistieran y murieran, ya que su aspecto físico se encontraba muy deteriorado.

Cuando las cantidades de aminoácidos en el organismo son alteradas principalmente por una baja ingesta de proteína, los sistemas encargados de la homeostasis se desestabilizan, ocasionando un desequilibrio en todo el

metabolismo de aminoácidos (36). Uno de los factores que activan a mTORC1, son los aminoácidos, principalmente leucina (41); por esta razón, una de las proteínas que se utilizó fue el maíz cuya proteína presenta tres veces el requerimiento de leucina (192.01 mg/g de proteína). Sin embargo, el maíz es deficiente en otros aminoácidos como la lisina y el triptófano, lo que ocasiona que no se active por completo la ruta de síntesis de proteínas a través de mTORC1, ya que favorece únicamente la expresión génica de mTOR. Esto indica que para llevar a cabo la síntesis de proteínas se requiere de todos los aminoácidos indispensables en cantidades suficientes, lo cual se corrobora con los tratamientos de caseína, soya, frijol/maíz y soya/maíz, ya que éstos además de activar la expresión génica de mTOR, S6K y eIF4e favorecen la fosforilación de mTORC1, S6K y 4E-BP1. Aunque en el caso particular de las ratas alimentadas con frijol y soya se observó fosforilación de S6K únicamente en el día 1, a pesar de esto, el proceso de síntesis de proteínas en estas ratas no se inhibe por completo ya que presentan una buena ganancia de peso después del periodo de desnutrición.

Otro punto a tomar en cuenta es que ni la fosforilación de mTORC1 ni la de 4E-BP1 se lograron inhibir en un estado de desnutrición, lo cual pudiera ser un indicador de que a pesar de que las células hepáticas tuvieron una deficiencia en sus niveles de aminoácidos, logran mantener cierto equilibrio metabólico y así mantener el proceso de síntesis de proteínas. Sin embargo, esto no se posible, debido a que se observó una inhibición completa de la fosforilación de S6K, y posiblemente la biogénesis ribosomal no se esté llevando a cabo y en consecuencia el proceso de inicio de la traducción tampoco. Lo anterior puede suponer que el proceso por el cual la síntesis de proteínas hepática es inhibida en un periodo de desnutrición sigue siendo indefinido o pudiera no ser posible (62).

Uno de los órganos que más se ven afectados cuando hay deficiencia de aminoácidos es el hígado, ya que se acompaña de hipoalbuminemia e hígado graso (63), (64). Una de las formas clínicas que se presentan en un estado de desnutrición severo es el Kwashiorkor, que trae como consecuencia hígado graso no alcohólico, mejor conocido como esteatosis hepática (65), que consiste en la

acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos, debido a un desequilibrio entre la síntesis hepática de éstos, su absorción y su secreción a través de lipoproteínas de baja densidad (66). Estas alteraciones son provocadas por diferentes mecanismos en donde se encuentran involucrados los ácidos grasos y el metabolismo de proteínas, principalmente de apoproteínas que son las encargadas de formar las lipoproteínas. (63), (67).

En relación a la evaluación histomorfológica del hígado se puede observar que tanto en los tratamientos de recuperación como en el grupo desnutrido, se presentan principalmente dos tipos de degeneraciones: hidrópica (acumulación intracelular de agua) y grasa (acumulación de grasa en los hepatocitos). Sin embargo dependiendo el tipo de proteína, fue el desarrollo o la recuperación de esos tipos de daños. En el caso de los grupos que consumieron caseína al 20% y maíz, se encontró que en el primer día de ingesta no se presentó acumulación de grasa; sin embargo, a partir del día siete la acumulación de grasa en los hepatocitos se fue haciendo más notoria, lo que indica que el consumo de estas proteínas contribuye a desarrollar signos de esteatosis. Otros daños ocasionados solo al consumir maíz fueron necrosis y fibrosis, la cual se presenta en la fase crónica del daño hepático, dando origen a esteatohepatitis (68). A pesar de lo anterior, también hubo presencia de signos de regeneración, lo que puede ser un indicativo de que los hepatocitos son capaces de regenerarse y seguir manteniendo las múltiples funciones a pesar del daño desarrollado.

Es importante mencionar que durante la desnutrición, en la mayoría de los hígados se detectó infiltrado inflamatorio, que es una respuesta del sistema inmune innato y de las células de Kupffer hacia la posible recuperación de los daños hepáticos (69), (63).

Se observó que un día de recuperación consumiendo los diferentes tratamientos, es muy poco el tiempo para que el hígado logre recuperarse, a pesar de ser un órgano capaz de regenerarse después de un daño, por lo que necesita de tiempo (63), (70). Esto fue posible comprobarlo únicamente con los grupos de soya y frijol/maíz, debido a que solo en el primer día de recuperación presentaron

acumulación de grasa, ya que al pasar los días de recuperación fue disminuyendo, logrando que al día 14 ya no se observara esta alteración.

Los resultados del presente estudio indican que existen otras alternativas al de las proteínas de origen animal que pueden estimular satisfactoriamente la síntesis de proteínas y que el consumo de proteínas de origen vegetal de buena calidad como la soya y la mezcla de frijol/maíz favorecen la recuperación nutricional sin causar daño hepático.

10. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar un tipo de desnutrición en ratas Sprague Dawley, al mostrar un 50% de peso menor con respecto a las ratas que fueron alimentadas con caseína al 20% durante la recuperación.
- Se comprueba la hipótesis de que las mejores proteínas para la recuperación de las ratas después de un periodo de desnutrición son caseína, soya, soya/maíz y frijol/maíz y el tratamiento dietario con maíz, fue el peor para la recuperación de peso corporal de los animales.
- Aunque la dieta con caseína logra la recuperación de peso corporal, ésta origina picos elevados de insulina, lo cual no es tan conveniente para una recuperación nutricional después de un periodo de desnutrición.
- Se comprueba que para la recuperación efectiva de una desnutrición, la combinación de dos proteínas es preferible, debido a que no ocasiona alteraciones en los parámetros bioquímicos y logran la recuperación de peso corporal de los animales.
- Aunque todos los tratamientos dietarios provocaron que la fosforilación de mTORC1 se llevara a cabo en el día uno de recuperación, los únicos tratamientos que mantuvieron la activación de los dos blancos de la ruta de mTORC1 durante los tres días de recuperación fueron caseína y las mezclas frijol/maíz y soya/maíz.
- La ruta de mTORC1 en un periodo de desnutrición no se logra inhibir por completo, pues el patrón de expresión de pmTORC1 y p4E-BP1 no se perdió por completo con el grupo de caseína al 0.5%.

- No solo se necesita de leucina de acuerdo a lo observado en el tratamiento con maíz, para inducir la activación de mTORC1 y sus blancos, es necesaria la presencia de otros aminoácidos indispensables en la dieta.
- La fosforilación de 4E-BP1 podría ser más sensible a la presencia de leucina que la fosforilación de S6K1.
- Respecto al análisis histomorfológico, se puede concluir que el periodo de desnutrición al cual fueron sometidas las ratas Sprague Dawley fue suficiente para ocasionar signos de esteatosis.
- De todos los tratamientos dietarios, con los que se obtuvo una mejor recuperación del hígado fueron frijol/maíz y soya debido a que conformen pasaban los días de recuperación la acumulación de grasa fue disminuyendo, quedando únicamente lesiones leves.

11. PERSPECTIVAS

Fisiológicamente se tiene conocimiento que la combinación de proteínas de origen vegetal pueden ser una alternativa para obtener una proteína de buena calidad; sin embargo, no se conoce el mecanismo a nivel molecular que tienen estas combinaciones. En el presente estudio se demostró la importancia de la combinación de proteínas de origen vegetal para mejorar el estado nutricional y la síntesis de proteínas en hígado a través de la ruta de mTORC1 después de un periodo de desnutrición del tipo proteínica. Sin embargo, estos resultados sólo se enfocan al efecto de las combinaciones de proteínas sobre un tejido, por lo que el estudio se puede profundizar analizando el efecto en otros tejidos como el músculo y en la generación de tejido adiposo, así como determinar la relación entre masa magra y masa grasa que se produce después de consumir las dietas de recuperación. También es relevante estudiar el efecto que tienen estas mismas proteínas pero ahora en una desnutrición del tipo energética proteínica. Por otro lado, es necesario dar seguimiento a la recuperación estado de nutrición, para saber que tipo de padecimientos pudiesen llegar a tener o si la recuperación es al 100%, sin provocar algún tipo de secuela.

Posteriormente después de probar los cambios con los dos tipos de desnutrición se podría desarrollar un suplemento alimenticio con mezclas de proteínas de origen vegetal para favorecer la recuperación nutricional de personas con altos niveles de desnutrición en nuestro país.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González Hernández IE. Efecto de la desnutrición en la biodisponibilidad y farmacocinética de axetil cefuroxima en ratas jóvenes. Tesis de Doctorado en Ciencias; Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.
2. Dodd KM, Tee a. R. Leucine and mTORC1: a complex relationship. *AJP Endocrinol Metab.* 2012;302:E1329–42.
3. Blössner M, Onis M De, Organization WH. Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels. *Environ Burd Dis Ser.* 2005;12(12):43.
4. Benitez R. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en America Latina y el Caribe 2013 [Internet]. Hambre en América Latina y el Caribe: Acercándose a los objetivos del Milenio. 2013 [cited 2015 May 25]. p. 56. Available from: <http://www.fao.org/docrep/019/i3520s/i3520s.pdf>
5. Wisbaum W. La desnutrición infantil: Causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento [Internet]. 2011 [cited 2015 May 15]. p. 32. Available from: <http://www.unicef.es/sites/www.unicef.es/files/Dossierdesnutricion.pdf>
6. Márquez-González H, García-Sámano VM, Lourdes M De, García-Villegas EA, Márquez-flores H, Villa-romero AR, et al. Clasificación y evaluación de la desnutrición en el paciente pediátrico. *El Resid.* 2012;7(271):59–69.
7. Casanueva, Esther; Kaufer-Horwitz, Martha; Pérez-Lizaur, Ana Bertha; Arroyo P. *Nutriología Médica.* 3° ed. Panamericana M, editor. México; 2008. 362 p.
8. Parra-Gámez L, Téllez-Girón JR, Escobar-Briones C. La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Rev Fac Med UNAM.* 2003;46(1):32–6.
9. Hodgson B. MI. Manual de Pediatría [Internet]. Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. 1999 [cited 2015 May 20]. Available from: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/manualped/EvalEstadNutric.html>

10. Orozco, Bernal MF Vizmanos B CDLR a J. La nutrición del anciano como un problema de salud pública. *Antropo*. 2008;16:43–55.
11. Crowley Isabel U. Alcanzar los Objetivos de Desarrollo del Milenio con equidad [Internet]. 2010 [cited 2015 May 20]. p. 99. Available from: http://www.unicef.org/mexico/spanish/UN_ODM_web.pdf
12. Ludwig O. Protocolo para el Tratamiento Nutricional de la Desnutrición Aguda Severa y Moderada sin Complicaciones. 2009;1–62.
13. Chaves L, Cadavid MA, Torres S. Conceptualización y categorización en personas menores expuestas al Programa de Complementación Alimentaria. *Rev Latinoam Ciencias Soc Niñez y Juv*. 2012;10(2):1003–19.
14. Panamá I de N de centro A y. Informe sobre el desarrollo y utilización de incaparina [Internet]. 1961 [cited 2015 May 11]. p. 14. Available from: <http://bvssan.incap.org.gt/local/file/F008.pdf>
15. Neufeld LM, Advisor CT, Initiative M. Efecto de los polvos de micronutrientes en la nutrición de los niños. 2011;25–6.
16. Avila DD, Martinez EGB. Situación actual de los alimentos en México [Internet]. 2002 [cited 2015 May 7]. p. 15. Available from: http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icea/LI_EcoReg/Danae_Duana/alimentos.pdf
17. Bressani R, Viteri F, Elías LG, de Zaghi S, Alvarado J, Odell a D. Protein quality of a soybean protein textured food in experimental animals and children. *J Nutr*. 1967;93:349–60.
18. Kritchevsky David M. Diet and atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1976;84(3):615–32.
19. Martins MSF, Oyama LM, Latorraca MQ, Gomes-da-Silva MHG, Nascimento CMO. Nutritional recovery with rice bran did not modify energy balance and leptin and insulin levels. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(4):289–94.
20. Márquez Mota CC. Efecto del aislado de proteína de ajonjolí sobre la

expresión génica de SREBP-1C y FAS y su relación con los niveles de insulina, glucagon, glucosa, colesterol y triglicéridos en suero. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas; Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.

21. Young VR, Pellett PL. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(5 Suppl):1203S – 1212S.
22. Suárez López MM, Kizlansky a., López LB. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutr Hosp.* 2006;21(1):47–51.
23. Obatolu V a., Ketiku a., Adebowale E a. Effect of feeding maize/legume mixtures on biochemical indices in rats. *Ann Nutr Metab.* 2003;47:170–5.
24. Jiménez ADL. Valor nutritivo de la Proteína de Soya. *Investig y Cienc la Univ Auton Aguascalientes.* 2006;36:29–34.
25. INEGI. “Boletín de información oportuna del sector alimentario” [Internet]. 2012. 2014 [cited 2015 Jun 3].
Available from:
http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf
26. Grajales-García EM, Osorio-Díaz P, Goñi I, Hervert-Hernández D, Guzmán-Maldonado SH, Bello-Pérez L a. Chemical composition, starch digestibility and antioxidant capacity of tortilla made with a blend of quality protein maize and black bean. *Int J Mol Sci.* 2012;13(1):286–301.
27. Organization F and A. El maiz en la nutrición humana [Internet]. 1993 [cited 2015 Jun 26].
Available from: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
28. Desarrollo FN de. Panorama del frijol [Internet]. 2014 [cited 2015 May 18]. p. 2.
Available from:
[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama Frijol \(may 2014\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama Frijol (may 2014).pdf)
29. Ulloa JA, Petra MC, Ulloa R, Carmen J, Ramírez R, Blanca IBQ, et al. El

frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Rev Fuente*. 2011;3(8):5–9.

30. Reyes Rivas E, Padilla Bernal LE, Pérez Veyna O, López Jáquez P. Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigacion Cientifica*. Zacatecas; 2008 Dec;4(3):1–21.
31. Fermín S de MC. Metabolismo de los aminoácidos [Internet]. 2008 [cited 2015 Jul 21]. p. 33. Available from: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/GilHernandez/aminoacidos.pdf
32. Koolman J. RK. *Bioquímica: texto y atlas*. 3° ed. Panamericana M, editor. Madrid España; 2004. 492 p.
33. Lehninger Albert MCM. *Principios de Bioquímica: Lehninger*. 4° ed. Omega, editor. Madrid España; 1232 p.
34. Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J*. 2003;373:1–18.
35. Krause U, Bertrand L, Maisin L, Rosa M, Hue L. Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 2002;269(15):3742–50.
36. Fafournux Pierre, Bruhat Alain JC. Amino acid regulation of gene expression. *J Nutr*. 2000;12.
37. Sluijters DAVAN, Dubbelhuis PF, Blommaart EFC, Meijer AJ. Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem J*. 2000;550:545–50.
38. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth: Control and Disease. *Cell* 149. Elsevier Inc.; 2012;149(2):274–93.
39. Zhao B, Li L, Guan K-L. Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123:4001–6.
40. Laplante M, Sabatini DM. An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Curr Biol*. Elsevier Ltd; 2009;19(22):R1046–52.

41. Jewell JL, Guan KL. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;38(5):233–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.004>
42. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 2003;17(15):1829–34.
43. Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2147–57.
44. Proud CG. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:429–36.
45. Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract.* 2009;3(1):64–71.
46. De Luis Román DA. BD. GLPP. Dietoterapia, nutrición clínica y metabolismo. Albasanz, editor. Madrid España; 2012. 875 p.
47. Wisbaum W. La Desnutrición Infantil [Internet]. Unicef. 2011 [cited 2015 Jun 20]. Available from: <http://www.unicef.es/sites/www.unicef.es/files/Dossierdesnutricion.pdf>
48. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939–51.
49. Lee C. Western blotting. *Methods Mol Biol.* 2007;362:391–9.
50. Wojciech HRM y P. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5° ed. Médica Panamericana, editor. Buenos Aires, Argentina; 2008. 992 p.
51. Canfield LM, Chytil F. Effect of low lysine diet on rat protein metabolism. *J Nutr.* 1978;108(8):1343–7.
52. Ruan Z, Yang Y, Wen Y, Zhou Y, Fu X, Ding S, et al. Metabolomic analysis

of amino acid and fat metabolism in rats with L-tryptophan supplementation. *Amino Acids*. 2014;

53. Blachier F, Lancha AH, Boutry C, Tomé D. Alimentary proteins, amino acids and cholesterolemia. *Amino Acids*. 2010;38(1):15–22.
54. Aguilar Navarro JA. Composición nutricia de 10 variedades de maíz y la evaluación de la suplementación de 4 de estas variedades con una especie selecta de leguminosa. Tesis en Mestría en Ciencias Químicas; Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
55. H. Fujimoto, M. Isomura KA. A survey of the values of clinical chemistry parameters obtained for a common rat blood sample in ninety-eight Japanese laboratories. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;22:25–45.
56. Salazar Antonio, Navarro Jose PF. Citología e histología veterinaria [Internet]. [cited 2015 Jun 17]. p. 1–5. Available from: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema26-higado.pdf>
57. Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem*. 2006;17(6):365–73.
58. Torres Villalvazo I. Efecto de la proteína de soya dietaria sobre las alteraciones metabólicas del hígado y tejido adiposo en ratas alimentadas con dieta alta en grasa. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas; Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.
59. Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(5):E1016–22.
60. Pamplona, Reinald; Boada, Jordi; Jove, Mariana; Gonzalo H. Resistencia a la Insulina: factores desencadenantes. In: Editores Medicos S., editor. *Genética, Nutrición y Enfermedad*. 3° ed. Madrid España; 2008. p. 69–86.
61. García-salcedo JJ, Batarse-bandak J, Serrano-gallardo LB, Rivera-guillén MA. Albúmina sérica y mortalidad en ancianos hospitalizados. 2003;28:8–12.

62. Anand P, Gruppuso PA. The regulation of hepatic protein synthesis during fasting in the rat. *J Biol Chem.* 2005;
63. Kester JE. Liver. *Encycl Toxicol.* 2014;3:96–106.
64. Saunders J, Smith T, Stroud M. Malnutrition and undernutrition. *Medicine (Baltimore).* Elsevier Ltd; 2011;39(1):45–50.
65. Colombo C, Battezzati PM. Liver involvement in cystic fibrosis: Primary organ damage or innocent bystander? *J Hepatol.* 2004;41(6):1041–4.
66. Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman a L. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology.* 2000;32(1):3–10.
67. Patología Cuatitlan F de ES. Degeneración celular [Internet]. [cited 2015 May 30]. p. 1–4.
Available from:
http://patologiafesc.webcindario.com/archivos/Degeneracion_celular.pdf
68. David DK. Es reversible la Cirrosis hepática? [Internet]. Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán.” [cited 2015 Jun 13]. p. 6.
Available from: [http://www.facmed.unam.mx/amh/educacion/PDF/FibrosisHep?tica - Dr. Kershenobich.pdf](http://www.facmed.unam.mx/amh/educacion/PDF/FibrosisHep?tica-Dr.Kershenobich.pdf)
69. Colina F. GH. Protocolo de lectura histológica de biopsias hepáticas con hepatitis crónica. *Rev Española Patológica* [Internet]. 1998;3:8. Available from: <http://www.conganat.org/seap/revista/v31-n3/11.pdf>
70. Skullman S, Wirén M, Garlick PJ, McNurlan M a, Larsson J. Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *J Hepatol.* 1994;21(2):174–81.