

00528  
83



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LA DESNUTRICION ENERGETICO-PROTEINICA  
EN LOS NIVELES DE LACTASA EN RATAS.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
ARGELIA SANCHEZ CHINCHILLAS



MEXICO, D. F.

SECRETARÍA NACIONAL  
DE QUÍMICA

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

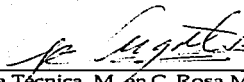
Presidente	Prof. Angela Sotelo López
Vocal	Prof. Bernardo Lucas Florentino
Secretario	Prof. Lucía Bascuñán Termini
1er. Suplente	Prof. Lucía Cornejo Barrera
2do. Suplente	Prof. Leticia Gil Vieyra

Sitio donde se desarrolló el tema:

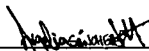
Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,  
Ciudad Universitaria.



Asesora, M. en C. Angela Sotelo López



Supervisora Técnica, M. en C. Rosa Ma. Argote Espinosa



Sustentante, Argelia Sánchez Chinchillas

*Dedico esta tesis:*

*A ti mamá, por darme la vida aunque tuvimos tan poco tiempo para compartirla juntas, a mi abuela por su amor y cuidados en mis primeros años, a Pancho y a la Gorda por enseñarme el sentido de la responsabilidad, y a todos mis seres queridos que aún en su ausencia los sigo llevando en el corazón.*

*A mi papá por ser más que una enseñanza y un ejemplo a seguir, gracias por todo tu esfuerzo para que mi hermana y yo sigamos adelante y cumplamos nuestros sueños, te amo.*

*A mi tía por haber cambiado mi destino, te agradezco infinitamente cada instante de tu vida que me has dedicado, eres la persona más importante en mi vida, gracias por mostrarme que el amor mueve montañas.*

*A Italia por estar conmigo en todo momento, compartiendo más que un lazo familiar, gracias por toda tu ayuda y tu paciencia, eres una súper hermana, saludos maní.*

*A la familia Velásquez Picazo, por permitirme ser parte de ella, por todo el afecto y apoyo que me han brindado, especialmente a Carla porque eres más que una amiga y confidente, gracias por enseñarme el verdadero significado de la amistad, te quiero mucho.*

*A Toño por ser parte de mi vida y permitirme conocer una nueva forma de amor, gracias por cada instante que vivimos juntos, por todas las experiencias que hemos compartido y que seguramente permanecerán en el corazón de los dos.*

### **Agradecimientos.**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente y por la gran experiencia de ser universitaria.*

*A la Mtra. Angela por sus invaluable enseñanzas y por su constante apoyo durante mi estancia en el laboratorio.*

*A Enrique por todos los cafés, libros y charlas que disfrutamos juntos durante todo este tiempo, eres una gran persona.*

*A Helga, Ili, Lety, y Carlos por ser unos extraordinarios y muy divertidos amigos, les agradezco cada momento que pasamos juntos en el laboratorio, especialmente los viernes de juegos.*

*A todos mis amigos por permitirme conocerlos más allá de las clases, especialmente a Argelia, porque en muy poco tiempo me has enseñado lo importante que es alcanzar las metas que nos fijamos.*

*A la familia Chavelas Ochoa por las atenciones brindadas en el tiempo que llevo de conocerlos.*

*A Rosita por sus consejos, su ayuda y sobre todo por su agradable compañía en el laboratorio.*

*A mis compañeros del laboratorio 111, porque juntos hemos aprendido a compartir y respetar el trabajo en equipo.*

*A la Sra. Vicky por consentirme tanto, por animarme todos los días y por ser una persona llena de amor.*

*A la Mtra. Bascañán y al Prof. Lucas por sus comentarios y aportaciones durante la revisión de este trabajo.*

**INDICE.**

Capítulo 1	Introducción .....	1
Capítulo 2	Objetivos	
	General.....	3
	Particulares.....	3
Capítulo 3	Antecedentes	
	3.1 Desnutrición Energético-Proteínica.....	4
	3.1.1 Clasificación.....	6
	3.2 Hidratos de Carbono.....	10
	3.2.1 Proceso de Digestión y Absorción.....	11
	3.3 Disacaridasas.....	13
	3.3.1 Lactasa.....	14
	3.4 Estudios biológicos.....	17
Capítulo 4	Metodología	
	4.1 Diagrama General.....	20
	4.2 Ensayo Biológico.....	22
	4.3 Preparación del Homogeneizado de la Fracción del Borde Cepillo del Intestino Delgado de Rata.....	25
	4.4 Determinación de Proteína por el Método de Lowry.....	26
	4.5 Determinación de la Actividad Enzimática de Lactasa.....	30

---

4.5.1 Hidrólisis.....	31
4.5.2 Determinación de Glucosa Liberada por el Método de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa (GOD-POD).....	33
4.6 Cálculo de la Actividad Específica de la Lactasa.....	36
4.7 Análisis Estadístico.....	38
Capítulo 5 Resultados y Discusión.....	40
Capítulo 6 Conclusiones.....	53
Capítulo 7 Bibliografía.....	54
Apéndice A. Elaboración de Dietas.....	61

## 1. INTRODUCCIÓN.

La desnutrición, sobre todo cuando ocurre en la infancia, constituye un problema serio de salud pública en México y debido a su estrecha relación con enfermedades diarreicas agudas continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores a cinco años.

En nuestro país la desnutrición no tiene una distribución homogénea a lo largo del territorio nacional, sin embargo las zonas centro, sur y sureste que abarcan los estados de: Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán, son las más afectadas debido a que una gran proporción de la población habita en zonas rurales pobres, lo cual señala la estrecha relación de la desnutrición con el nivel socioeconómico.

La desnutrición es el resultado de varios factores que interactúan entre sí, ya que es provocada no solo por una escasa disponibilidad de alimentos, sino también por defectos en los patrones de alimentación (deficiencia en el consumo de proteínas de buena calidad, micronutrientes y bajo nivel energético), insalubridad que conlleva a infecciones gastrointestinales y en general, malas condiciones de vida.

Cuando un individuo padece desnutrición, se presenta una desaceleración del crecimiento y desarrollo, reducción en los mecanismos de defensa contra infecciones y alteraciones en el aparato gastrointestinal, atrofiándose la mucosa

intestinal donde se encuentran la mayoría de las enzimas digestivas, provocando la deficiencia de algunas de ellas. Dentro de éstas se incluye la lactasa, enzima de vital importancia para la nutrición infantil pues hidroliza el disacárido presente en la leche, principal alimento para infantes.

El presente estudio se realiza con la finalidad de conocer el efecto de la desnutrición energético-proteínica en el contenido de la lactasa en ratas hembras, debido a que se han encontrado resultados incongruentes en los niveles de la enzima por efecto de la desnutrición.

Se plantea realizar un seguimiento de la actividad de la lactasa durante la lactancia y el destete, momento en el cual se someterá a un grupo de ratas a una dieta con bajo contenido energético y proteínico, buscando con ello lograr la desnutrición y así comparar la actividad específica de la lactasa presente en la mucosa intestinal con un grupo de animales nutridos, manejando dos edades: 36 y 51 días de edad.

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1. General.

- Evaluar el efecto de la desnutrición energético-proteínica en la actividad específica de la lactasa en ratas a diferentes edades.

### 2.2. Específicos.

- Establecer el modelo biológico de desnutrición energético-proteínica en ratas.
- Determinar la actividad específica de la lactasa en ratas nutridas y desnutridas.
- Establecer si existe diferencia significativa en la actividad de lactasa entre el grupo nutrido y el desnutrido.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1. Desnutrición Energético-Proteínica (DEP).

La desnutrición es un problema de gran magnitud en el mundo<sup>1</sup>, siendo muy marcada en países subdesarrollados y en vías de desarrollo, como lo es México. En el medio rural del país, uno de cada seis niños padece desnutrición activa en alguno de sus grados<sup>2</sup>, lo que afecta su crecimiento y maduración. De ahí la importancia de conocer los efectos de la desnutrición energético-proteínica tanto en los cambios morfológicos como en la actividad de las enzimas presentes en el tracto digestivo en las primeras etapas de vida.

La desnutrición energético-proteínica es una condición patológica ocasionada por la carencia de múltiples nutrimentos derivada de un desequilibrio provocado por un aporte insuficiente al gasto energético. La insuficiencia en el aporte es principalmente en la fuente de proteína, ya sea porque ésta es de mala calidad y/o insuficiente para los requerimientos, o bien puede deberse a alteraciones en la digestión o en la absorción de los nutrimentos, en tanto que el gasto excesivo puede producirse por condiciones estresantes que aumentan los requerimientos de energía. La forma más frecuente de la DEP combina un mayor gasto de nutrimentos con un aporte que no satisface las demandas, lo que conduce al agotamiento de las reservas tisulares, cuya expresión clínica es la merma de crecimiento en diferentes grados, acompañada de una amplia gama de trastornos funcionales<sup>1,3,4,5</sup>.

Con frecuencia se presenta el ciclo desnutrición-infección-desnutrición por presencia e interacción de varios factores entre los que destacan: la ablactación prematura o tardía, uso inadecuado de sucedáneos de la leche humana y falta de higiene en su preparación que provoca enfermedades gastrointestinales, que por sí mismas desencadenan la disminución de la absorción de nutrimentos, aumento de las pérdidas urinarias de nitrógeno y electrolitos, aumento en el gasto energético basal. Esto último tiene como consecuencia que las reservas corporales de grasa, carbohidratos (glucógeno) y proteína se usen para satisfacer las necesidades energéticas, produciéndose así una disminución del crecimiento.

El desequilibrio nutricional es una causa significativa y frecuente de inmunodeficiencia, ya que al presentarse una reducción general de síntesis proteínica (cerca del 40%) se disminuye la respuesta inmune<sup>3,6,7</sup>.

Un efecto grave de la DEP es el deterioro de la regeneración de la mucosa intestinal. Las células de la mucosa intestinal se recambian rápidamente, el proceso de replicación celular va desde las criptas hasta la reposición de células en el lumen intestinal. En el caso de la DEP, con frecuencia se presenta un acortamiento y a veces un aplanamiento de las vellosidades del borde en cepillo de la mucosa intestinal; en casos graves la mucosa intestinal es casi lisa, lo que origina una reducción considerable del área superficial de la mucosa y por tanto del área sobre la cual los nutrimentos pueden absorberse, si es que se encuentran

disponibles en la dieta. Además, al ser esta la zona en la cual se encuentra la mayor parte de las enzimas digestivas, entre ellas las peptidasas y disacaridasas<sup>8</sup>, se presenta una disminución de las enzimas del borde en cepillo lo que reduce la absorción de nutrimentos. Con respecto al metabolismo de hidratos de carbono, la presencia de la DEP produce una reducción en la capacidad de digestión sobre todo de la lactosa, mientras que en el caso de proteínas hay una adecuada digestión y la absorción se ve reducida entre un 10 y un 30% de lo normal.

Dentro de los efectos que puede producir la DEP se encuentra la atrofia del páncreas (disminución de secreción de lipasas, tripsina, amilasas) e hígado. La concentración de prealbúmina, la cual se considera un indicador bioquímico de desnutrición, y de proteína fijadora de retinol (PFR) disminuye en grado manifiesto.

### 3.1.1 Clasificación de la Desnutrición.

Para la clasificación de la DEP se deben considerar tres parámetros<sup>1-3</sup>:

1. Etiológico, donde se clasifica en primaria cuando se debe a deficiencia en la ingesta de alimentos debido a problemas socioeconómicos, secundaria cuando el alimento que se consume no se aprovecha en forma adecuada a

causa de situaciones fisiopatológicas existentes y mixta, la cual es el resultado de una combinación de las dos anteriores.

2. El tiempo de evolución a partir de los indicadores de peso para la estatura y estatura para la edad establecidos por Waterlow. Dicha clasificación permite determinar la cronología de la DEP y se basa en la emaciación muscular y en el desmedro del desarrollo<sup>9</sup>.
3. La magnitud o gravedad, que se clasifica con el indicador antropométrico de peso para la edad establecido por Gómez, el cual considera el peso para la edad con respecto a una población de referencia para la misma edad y sexo, expresándolo en % peso/edad, manejando los siguientes términos: normal (91-110%), leve (90-76%), moderada (75-60%) y grave (<60%).

A su vez dentro de la desnutrición clasificada como grave, se presentan diferentes casos clínicos que a continuación se describen:

- Kwashiorkor, peso corporal menor de 60-80% del peso estándar, y se caracteriza por la presencia de edema.
- Marasmo, peso corporal menor del 60% del estándar, sin edema.
- Kwashiorkor-marásmico, peso corporal menor del 60% del estándar con presencia de edema, y desmedro.

### 3.1.1.1 Kwashiorkor.

El Kwashiorkor está relacionado con el destete del primer niño a causa de un nuevo embarazo y se produce de 3 a 4 meses después de que el niño ha sido destetado; y se presenta por una deficiencia crónica de proteína y energía<sup>3,4,5,9</sup>. Es causado específicamente por la falta de proteína en la dieta en relación con el contenido de energía, el cual puede ser adecuado o excesivo, además de la ingestión de alimentos amiláceos como plátano, yuca y otras raíces y tubérculos excesiva. Es decir, se produce por la falta de adaptación ordinaria a la deficiencia de proteína en la cual se protege el hígado a expensas del músculo.

Además de la disminución del tejido muscular, pérdida de mucosa intestinal y respuestas inmunes disminuidas se presentan varios signos característicos como:

- Aumento de la cantidad de agua corporal total en relación con el peso, así como el volumen de agua extracelular, lo que provoca la aparición de edema grave, el cual oculta el desgaste muscular.
- Cerca del 30% de los casos presenta aumento en el tamaño del hígado, debido a la acumulación de cantidades elevadas de grasa.
- Cambios característicos de la textura y color del cabello.
- Erupciones cutáneas.
- Expresión característica de profunda aflicción.

En el Kwashiorkor se presenta una disminución de aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina, valina y tirosina, y una disminución marcada en la relación de tirosina/fenilalanina.

### 3.1.1.2 Marasmo.

El marasmo se presenta en niños de 6 a 18 meses de edad cuya característica clave es la emaciación extrema, muestran desgaste notable de músculo y tejido subcutáneo, desarrollo deficiente muy manifiesto que al prolongarse detiene el crecimiento lineal y presentándose así el desmedro<sup>3,5,9</sup>. Además se presenta hipotermia, retardo motor y debilidad y atrofia muscular que causa profusión abdominal.

Las situaciones que predisponen al marasmo son una ingesta dietética muy deficiente en todos los nutrimentos durante un período de tiempo prolongado aunada a infecciones, lo que produce carencia de proteína y energía, las cuales conservan su relación; en este caso hay una adaptación usual a inanición<sup>5</sup>.

Aunque el marasmo se presenta principalmente en países en vías de desarrollo, en países desarrollados se dan tres factores que pueden provocarlo: desórdenes del apetito y del comportamiento alimentario como anorexia nerviosa y bulimia, alteración de la absorción de nutrimentos y una velocidad metabólica incrementada por el desgaste muscular.

### 3.2. Hidratos de Carbono.

Los hidratos de carbono constituyen la mayor parte de la dieta: entre un 50 y 70% del total de calorías ingeridas. Dentro de los carbohidratos de mayor consumo se encuentran el almidón, azúcares simples, disacáridos, polímeros complejos denominados fibra dietética y componentes menores, además de un gran número de hidratos de carbono que son añadidos en la dieta como jarabe de maíz, jarabe de fructosa, almidones modificados, gomas, mucílagos, y otros productos procesados, que son añadidos para cambiar la textura, palatabilidad, color, viscosidad, sabor y vida de anaquel de los alimentos<sup>8,10,11,12</sup>.

Los hidratos de carbono son ingeridos básicamente en: vegetales, frutas y granos crudos o procesados como hidratos de carbono purificados adicionados a los alimentos y los que se encuentran disueltos en varias bebidas.

En general el hombre no tiene requerimientos a corto plazo de carbohidratos, pues no se han demostrado síntomas de deficiencia por alimentarse con una dieta baja en hidratos de carbono, sin embargo aparecen problemas en el metabolismo y en las funciones del intestino<sup>10,11,12</sup>. Además de que se ha encontrado que la omisión deliberada de éstos en la dieta con un continuo consumo de grasa como fuente de energía provoca problemas específicos. Como el cerebro requiere de glucosa como fuente de energía, el metabolismo se ajusta para emplear cuerpos cetónicos; sin embargo, una excesiva producción de éstos

provoca acidosis, disminuyendo el pH de la sangre, lo cual es potencialmente dañino para el proceso de detoxificación.

### 3.2.1 Proceso de Digestión y Absorción de Hidratos de Carbono.

La ingestión, digestión, absorción y transporte de hidratos de carbono son procesos altamente regulados. El efecto visual y olfativo estimula la secreción de saliva (y por tanto de amilasas) además de la liberación de insulina. La insulina tiene como función preparar al intestino para el aumento de transporte de nutrimentos y reclutar transportadores inactivos de glucosa para llevarlos a la superficie de la célula donde son activos. La presencia de alimento en el estómago libera hormonas que reprimen la ingesta y activan los procesos intestinales que aceleran la absorción. Conforme el alimento llega al intestino se activan receptores que a su vez liberan hormonas del intestino, las cuales a su vez liberan insulina.

El primer paso en la digestión de los hidratos de carbono es la masticación de los alimentos por los dientes, durante la cual los gránulos de almidón se exponen aumentando el área superficial. El alimento se mezcla con la  $\alpha$ -amilasa salival (ptialina) que empieza a hidrolizar al almidón, cuya acción enzimática se detiene o disminuye al llegar el bolo alimenticio al estómago, y la digestión continua en el duodeno en donde la  $\alpha$ -amilasa pancreática es secretada. La acción acumulada de las dos amilasas produce maltosa y maltotriosa a partir de la amilosa y la amilopectina, de la cual también se obtienen dextrinas límite.

La digestión de la maltotriosa, maltosa, dextrinas límites y la mayoría de los disacáridos incluidos los dos disacáridos más consumidos en la dieta humana, es decir, la sacarosa y la lactosa, son hidrolizados a los respectivos monosacáridos constituyentes por las enzimas del borde en cepillo del intestino delgado<sup>11,14,15</sup>.

La mucosa intestinal presenta un gran número de pliegues conniventes (o pliegues de Kercking) que se extienden circularmente sobre toda la superficie interna del intestino delgado, siendo más pronunciados en duodeno y yeyuno.

Casi toda la superficie del intestino delgado, desde la desembocadura del colédoco hasta la válvula ileocecal, está cubierto por vellosidades que aumentan la superficie total de absorción. Cada vellosidad se encuentra rodeada de varias invaginaciones (alrededor de ocho), llamadas criptas.

Las células del epitelio intestinal (enterocitos) se caracterizan por un borde en cepillo formado por microvellosidades que aumentan más la superficie, dichas células contienen ancladas a las enzimas que completan la hidrólisis de los carbohidratos<sup>8,10,16</sup>.

La absorción de los monosacáridos inicia en el extremo distal del duodeno y generalmente es completada en los primeros 50-100 cm del yeyuno.

Los hidratos de carbono al ser polialcoholes y polares no pueden pasar a través de la membrana no polar de las células por lo que requieren de un tipo de transporte. El transporte intestinal de la glucosa es de tipo activo, dependiente de iones sodio, y tiene estereoespecificidad por la glucosa y la galactosa; además

dicho transporte se ve favorecido por el hecho de que las disacaridasas se encuentran ancladas en la membrana<sup>8</sup>.

### 3.3. Disacaridasas.

La mayoría de los mamíferos tienen la actividad de cinco disacaridasas (maltasa, sacarasa, isomaltasa, trehalasa, lactasa)<sup>14,15</sup>, unidas al borde en cepillo del intestino delgado, las cuales comparten varias características a excepción de la trehalasa, entre las cuales se encuentra: el peso molecular de 200,000 a 300,000 Da, una porción hidrofóbica intracelular que actúa como el anclaje a la membrana del borde en cepillo, dos sitios catalíticos independientes, cada uno en un dominio diferente y una alta glicosilación.

Debido a que la vida media de las enzimas del borde en cepillo del intestino es más corta que la vida de las células intestinales, la actividad de dichas enzimas puede regularse, por lo que se conocen como adaptables. La unión de las disacaridasas a la membrana es vulnerable al ataque de las proteasas pancreáticas, a pesar del constante recambio, por lo que son inicialmente removidas de la superficie celular y posteriormente degradadas en el lumen intestinal.

La distribución de las disacaridasas a lo largo del intestino en el hombre se concentra principalmente en el yeyuno, donde la actividad de la lactasa, sacarasa, maltasa isomaltasa y trehalasa es alta, va disminuyendo en el ileon y es

casi nula en el duodeno<sup>14,16</sup>. De esta manera el yeyuno es el sitio de mayor absorción de los disacáridos en el hombre, cuyo patrón de distribución es similar al de la rata<sup>14</sup>.

La contaminación bacteriana no contribuye significativamente a la actividad de la disacaridasa del intestino, de hecho en ratas libres de gérmenes comparadas con ratas convencionales, la actividad es igual e inclusive ligeramente mayor.

### 3.3.1 Lactasa.

La lactasa, encargada de la hidrólisis de la lactosa (disacárido formado por una molécula de glucosa y una de galactosa a través de un enlace  $\beta$ -1,4) se encuentra localizada en las vellosidades del borde en cepillo del intestino delgado y no en las criptas, al igual que otras disacaridasas. La lactasa nativa tiene un peso molecular de 250-320 kDa, el precursor tiene un peso de 215 kDa y la cadena unida al borde en cepillo es de 160 kDa<sup>15,17</sup>.

El complejo de la lactasa-florizina hidrolasa contiene a la lactasa y otro dominio peptídico que es referido como glicosilceramidasa o florizina hidrolasa, por lo que se le denomina como una enzima multifuncional<sup>11</sup>. Este complejo enzimático contiene un péptido que está anclado al borde en cepillo por su extremo carboxi-terminal. La florizina hidrolasa cataliza la hidrólisis de los azúcares que se encuentran unidos a lípidos, las ceramidas, que se encuentran también dentro de la leche entre otros alimentos.

La lactasa es inhibida por metales pesados como plata, mercurio y cobre, pero no por reactivos sulfhidrilos; el único azúcar que es mejor sustrato que la  $\alpha$ - y  $\beta$ -lactosa es su 3-isómero, que se puede considerar inhibidor competitivo al igual que el tris (hidroximetil)-aminometano y el *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-tiogalactosido<sup>14,17</sup>. La galactosa, y en menor grado la glucosa, son inhibidores de esta enzima.

La lactasa está presente en el nacimiento en altos niveles y posteriormente va decreciendo<sup>3,10,14,19</sup>; por un tiempo el decremento en la actividad de la lactasa es compensado por el crecimiento del intestino delgado. En el hombre, la lactasa empieza a expresarse por regulación hormonal (cortisol) después del quinto mes de gestación (encontrándose intracelularmente)<sup>20</sup>, alcanza el máximo en el nacimiento (enzima madura), declina durante la infancia y puede desaparecer en la vida adulta.

En la rata además de encontrarse la lactasa, existe una  $\beta$ -galactosidasa soluble sin especificidad, la cual no se localiza en el borde en cepillo. Además se presenta una segunda enzima con actividad de lactasa restringida al ileon, cuya actividad aumenta entre los 8-16 días de edad y decae en su totalidad a los 28 días<sup>21</sup>. En ratas adultas se ha encontrado un incremento en la presencia de péptidos inactivos de 100 kDa, que aunado a un incremento en la degradación de la subunidad activa unida a la membrana, favorecen el decremento de la actividad catalítica de la enzima<sup>17,22</sup>.

La expresión de la lactasa se ve favorecida por la presencia de lactosa en la leche en los primeros meses de vida, sin embargo la adición de lactosa en la dieta no previene el declive de la actividad de la lactasa en el intestino, aunque es posible que la retrase si es la única fuente de carbohidratos en la dieta<sup>10,11,15</sup>.

Una vez que los niveles de lactasa han disminuido, éstos no podrán aumentar sin un incremento en el peso del intestino delgado.

En general, se han realizado estudios en animales para ver el efecto de la restricción del alimento y de la calidad del mismo, en la actividad enzimática y en la síntesis de diferentes enzimas.

En el caso de la lactasa se han reportado disminución, incremento o niveles normales de la enzima en diversas situaciones de desnutrición<sup>23</sup>. En cerdos alimentados con dietas deficientes de proteína se ha observado la disminución de la actividad de la lactasa, así como un retardo en el crecimiento sin mostrar diferencia en el consumo de alimento con respecto a un grupo control. Además se observan otros signos como piel seca, pérdida de pelo y presencia de edema en cuello y extremidades, así como cambios conductuales<sup>24,25</sup>.

Sin embargo como la desnutrición no sólo es causada por dietas deficientes de proteína, se han realizado estudios donde se restringe el consumo de alimento balanceado encontrando un incremento en la actividad específica de las disacaridasas debido a la disminución del contenido de proteína<sup>4</sup>.

Otra explicación del aumento de la actividad específica de la lactasa en animales desnutridos es el resultado del retraso del "reloj biológico"<sup>6,26,27,28</sup>.

#### 3.4. Estudios en animales.

A través de la historia, los estudios en animales han contribuido enormemente a la comprensión de las funciones fisiológicas y bioquímicas de los nutrimentos. Dentro de las ventajas del uso de animales de laboratorio se encuentra que la metodología utilizada es mucho más flexible que la que se puede utilizar con los humanos, ya que se logra tener control sobre la dieta tanto cualitativa como cuantitativamente. Además la genética y el ambiente son controlables, permitiendo la evaluación de variables específicas<sup>29,30</sup>. Por otra parte, las diferencias de especie, requieren cuidado para poder extrapolar los hallazgos en animales al hombre.

La elección de una especie particular para un estudio determinado depende de varios factores: la similitud entre su tipo de sistema digestivo y el de la especie sobre la cual van a aplicarse los resultados, así como la adaptabilidad del animal a la clase de dieta a emplearse, así como su tamaño físico<sup>30</sup>.

El crecimiento se usa como criterio principal de los efectos de un estado experimental, el cual es resultado de los procesos anabólicos del organismo, siendo un proceso mucho más complejo que el de un simple aumento de tamaño.

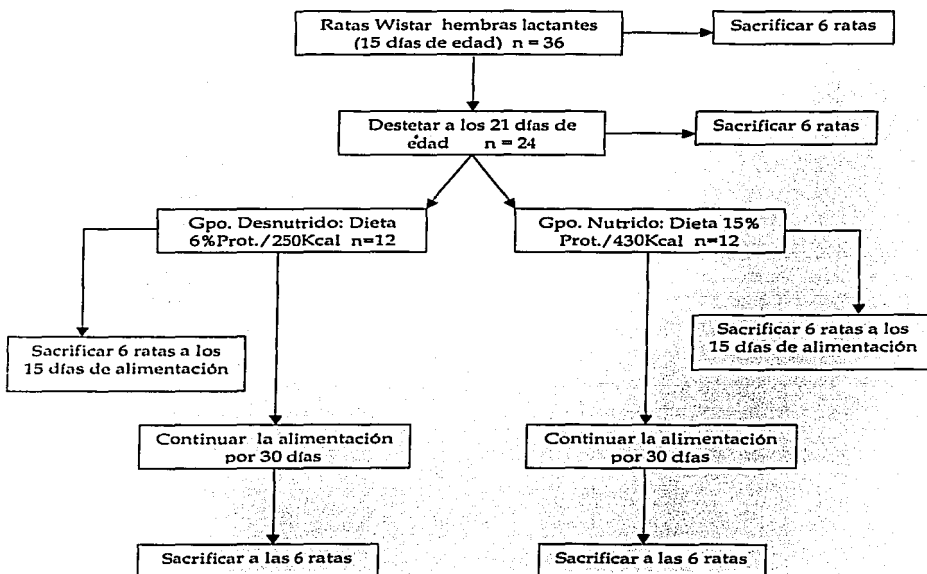
Cuando el animal aumenta de edad ocurren dos cosas fundamentales: aumenta el peso hasta que se alcanza la etapa adulta, lo cual se define como crecimiento, y cambia la conformación del organismo, lo que se conoce como desarrollo. El crecimiento se ha definido como un aumento proporcionado de la masa del organismo, en intervalos definidos de tiempo, en una forma característica de la especie<sup>30</sup>, lo cual implica que aparte de la variabilidad individual, existe una velocidad de crecimiento característica para cada especie y un tamaño adulto y conformación característicos.

La curva de crecimiento difiere entre los humanos y los animales inferiores. En éstos últimos, hay un aumento de peso desde el nacimiento hasta el fin de la madurez, formando una curva sigmoide única de aceleración y luego de desaceleración. En la curva de crecimiento humano, el primer segmento abarca hasta un punto en el que se alcanzan los dos tercios del peso adulto, el segundo segmento es de menor pendiente y se extiende desde el final del primero hasta la madurez. El punto donde se unen los segmentos es el punto de inflexión, el cual es de interés porque es la edad de crecimiento más rápido y probablemente el periodo de ganancia de peso más económica en términos de costo alimenticio, además es el punto en el cual la velocidad de aceleración del crecimiento es cero. El tamaño y desarrollo máximos están fijados hereditariamente. Sin embargo, la nutrición es uno de los factores ambientales importantes que determinan que se

alcance este máximo; un nivel óptimo de nutrición es aquel que permite a un organismo aprovechar su herencia al máximo. En general, a edades fisiológicas equivalentes los animales tienen necesidades nutritivas similares, motivo por el cual se puede relacionar los resultados obtenidos en alimentación animal (monogástricos) con la humana.

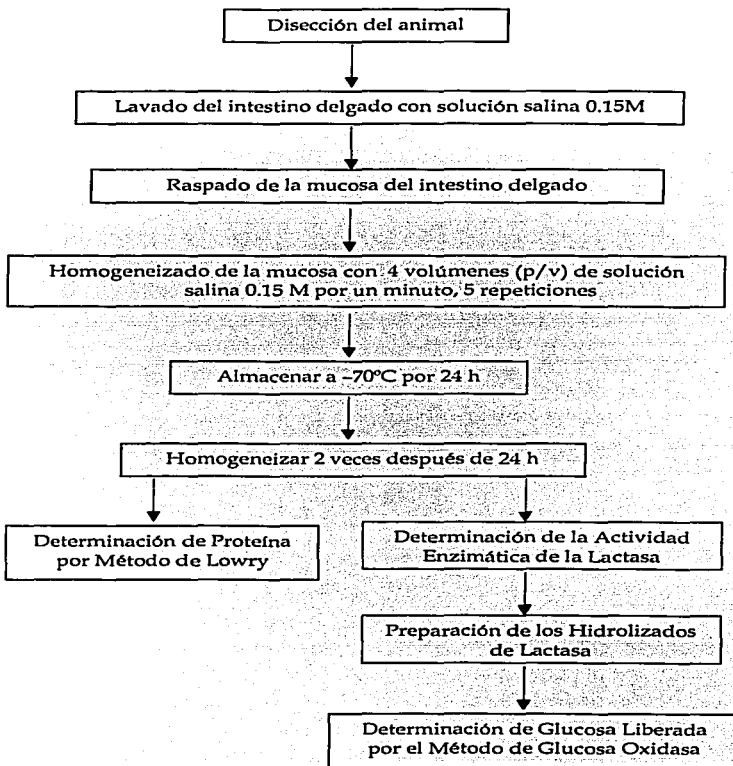
#### 4. METODOLOGÍA.

##### 4.1 Diagrama General de Trabajo.



n= número de animales

Diagrama del Manejo del Modelo Biológico.



#### 4.2 Ensayo Biológico.

El ensayo biológico se realizó con 36 ratas Wistar de 15 días de edad, distribuidas en seis grupos de seis crías por madre en cada jaula. Cada camada fue colocada en una jaula con acceso a alimento comercial y agua por parte de la madre. De cada lote se seleccionó al azar un animal para realizar la determinación inicial de actividad enzimática de lactasa, teniendo un total de seis animales para la determinación.

Los animales restantes ( $n=30$ ) continuaron con la lactación hasta el momento del destete que ocurrió a los 21 días de edad. En dicho momento se sacrificaron nuevamente seis animales al azar para realizar la determinación de actividad enzimática de la lactasa.

El resto de los animales ( $n=24$ ) fueron pesados y agrupados en cuatro lotes de seis ratas cada uno de acuerdo al método de la culebra japonesa, el cual consiste en que una vez que se ordenan los pesos de menor a mayor se distribuyen en zigzag entre los grupos. La diferencia del peso promedio entre los lotes no debe ser mayor a 1 g.

Las ratas de los grupos fueron alimentadas con las diferentes dietas experimentales (ver Apéndice A para la elaboración de las dietas). La selección de las dietas se realizó tomando en consideración lo siguiente:

De acuerdo a que el objetivo del presente trabajo es simular el tipo de dieta que prevalece en los niños que sufren desnutrición se decidió hacer modificaciones a trabajos previos encontrados en la literatura en los cuales los animales fueron desnutridos disminuyendo únicamente el contenido de proteína o bien, restringiendo la cantidad de alimento. De tal forma que las dietas se prepararon buscando disminuir tanto el contenido de proteína como el contenido energético.

- Grupo A. Dieta al 15% de proteína y con un contenido energético de 430Kcal/100g por un período de 15 días.
- Grupo B. Dieta al 15% proteína y 430 Kcal/100g de alimento por 30 días.
- Grupo C. Dieta al 6% de proteína y con un contenido energético de 250 Kcal/100g por un período de 15 días.
- Grupo D. Dieta al 6% proteína y 250 Kcal/100g por 30 días.

Los animales de cada lote se mantuvieron en jaulas individuales con ciclos de luz de doce horas y con temperatura controlada ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Una vez que se formaron los lotes se le colocó a cada animal su respectiva dieta, previamente pesada y agua "ad libitum". Como las ratas tienden a desperdiciar alimento se colocó debajo de cada jaula una charola de papel para recuperar el alimento desperdiciado y considerarlo en el peso del alimento sin consumir.

Después de quince días, las ratas de los grupos A y C fueron sacrificados, y a los 30 días del estudio se sacrificaron los grupos B y D.

Antes de sacrificar a los animales, éstos se dejan en ayuno con el fin de disminuir las variaciones en la actividad enzimática de la lactasa por presencia de alimento, las ratas lactantes tuvieron un ayuno de cuatro horas mientras que las ratas recién destetadas, de 36 y 51 días de edad se mantuvieron en ayuno por 12 horas.

Durante todo el estudio se registró tres veces por semana el peso de cada rata, el alimento ingerido y las observaciones que se tuvieron de cada animal siguiendo el formato que se muestra en la Tabla 1. Con los datos anteriores se obtuvieron tanto el alimento acumulado como el incremento en peso por día de registro, con el fin de obtener la gráfica de alimento acumulado y la curva de crecimiento de cada grupo.

Tabla 1. Ejemplo de Registro de Datos para el Ensayo Biológico.

Grupo: A		Peso comederó:						
Rata: 1	124 g	1	3	6	8	10	13	15
Día del estudio		1	3	6	8	10	13	15
Peso rata (g)		29	34					
Peso alimento inicial (g)		20	20					
Peso alimento final (g)		8						
Alimento consumido (g)								
(Alim. Final - Alim. Inicial)								
Alimento acumulado (g)								
(Σ Alim. Acumulado)								
Incremento en Peso (g)								
Observaciones:								

### 4.3 Preparación del Homogeneizado de la Fracción del Borde en Cepillo del Intestino Delgado de Rata<sup>31,32</sup>.

#### *Reactivos.*

- ✓ Solución de cloruro de sodio 0.15 M

Pesar 8.7835 g de cloruro de sodio (99.8% pureza) y aforar a 1000 mL.

#### *Equipo.*

- Equipo de disección.
- Portaobjetos.
- Tubos de centrifuga con tapa.
- Homogeneizador con pistilo de vidrio PYREX con capacidad de 40 mL.
- Tubos eppendorff.
- Cajas Petri.
- Vaso de precipitados de 100 mL.

#### *Procedimiento.*

Después de sacrificar a las ratas por dislocación se retira el intestino delgado desde el duodeno a la altura del píloro hasta la válvula ileocecal. Una vez que se retira el intestino se lava con 15-20 mL de solución fría de cloruro de sodio 0.15M. Se abre el intestino y se procede a realizar el raspado de la mucosa con un portaobjetos, colocándola en un tubo de centrifuga previamente pesado, el raspado continua hasta que se retira toda la mucosa, desechando únicamente el epitelio del intestino.

---

Posteriormente se pesa el tubo y por diferencia se obtiene el peso de la mucosa a partir del cual se adiciona solución de cloruro de sodio 0.15 M en una proporción de 4 volúmenes por gramo de mucosa (v/m).

La homogenización se realiza manualmente en un homogeneizador con pistilo de vidrio a intervalos de un minuto, cinco veces. Se almacena a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, transcurrido dicho tiempo se homogeneiza nuevamente (2 repeticiones de un minuto cada una). El homogeneizado se coloca en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorff y se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

- En toda la preparación del homogeneizado es necesario mantener la mucosa en baño de hielo.

#### 4.4 Determinación de Proteína por el Método de Lowry<sup>32,33,34</sup>.

##### *Fundamento.*

El método combina la reacción de Biuret que se da entre las proteínas y el ión cúprico en medio alcalino con la reducción del reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotungstíco) por los residuos de tirosina y triptofano presentes en la proteína, debido a que esta última reacción se ve intensificada por la formación del complejo cobre-proteína.

El procedimiento descrito a continuación ha sido optimizado para mejorar la linealidad<sup>34</sup>, pues se llega a presentar comportamientos no lineales inherentes al mecanismo de reacción.

Por lo que es necesario preparar una curva de calibración cada vez que se realice el ensayo.

*Reactivos.*

- ✓ Solución estándar de Albúmina Sérica Bovina (1 mg/mL).

Pesar 10.43 mg de Albúmina Sérica Bovina (Sigma A.4503) y aforar cuidadosamente para evitar la formación de burbujas a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Se almacena en alícuotas de 1 mL a -70°C.

- ✓ Solución de hidróxido de sodio (0.8 mol/L)

Pesar 32 g de hidróxido de sodio y aforar a 1000 mL con agua destilada.

- ✓ Reactivo A.

Disolver 0.2 g de tartrato disódico dihidratado y 10 g de carbonato de sodio en 69 mL de NaOH 0.8 M, llevar a un volumen de 100 mL con agua destilada.

- ✓ Reactivo B.

Disolver 2 g de tartrato disódico dihidratado y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 12.5 mL de NaOH 0.8 M, aforar a 100 mL con agua destilada. Almacenar protegido de la luz.

✓ Reactivo Mezcla.

Mezclar 25 volúmenes de la solución de NaOH 0.8 M con 18 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes de reactivo B. Preparar antes de su uso.

✓ Reactivo C.

Diluir 1 volumen del reactivo comercial de Fólín-Ciocalteu con 2 volúmenes de agua destilada. Este reactivo debe prepararse justo antes de su uso.

*Equipo.*

- Balanza analítica Sartorius Modelo A 210 P.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1 cm.
- Vortex.
- Matraces volumétricos de 10, 100 y 1000 mL.
- Probeta graduada de 100 mL.
- Pipetas automáticas ( 200-1000  $\mu$ L y 1-5 mL)
- Tubos de ensaye de 16 x 150
- Tubos eppendorff

*Procedimiento.*

En un tubo de ensaye se coloca 1.2mL del homogeneizado de la mucosa del intestino delgado de rata previamente diluido ( la concentración de la muestra debe estar entre 10 y 100  $\mu$ g/mL) \* , se adiciona 0.9 mL del reactivo mezcla y se agita en vortex por 10 segundos.

Posteriormente se adiciona 0.6 mL de reactivo C, se agita inmediatamente en vortex por 10 segundos y nuevamente se adiciona 0.6 mL de reactivo C. Después de agitar vigorosamente se incuba por 45 minutos protegido de la luz, a temperatura ambiente. Se realiza un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento.

Medir la absorbancia tanto del blanco como de las muestras a una longitud de onda de 750 nm.

- La dilución empleada del homogeneizado de la mucosa en esta determinación fue de 1:400 para todas las edades. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

*Preparación de la curva de calibración con Albúmina Sérica Bovina.*

La solución de albúmina sérica bovina 1mg/mL se diluye 1:10 en un matraz aforado para obtener una solución de 100 µg/mL. Posteriormente de dicha solución se toman alícuotas de 0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 y 3.2 mL y se llevan a un volumen final de 4 mL con agua destilada, obteniendo concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60, 80 µg/mL, respectivamente.

De cada una de las soluciones preparadas (incluyendo la de 100 µg/mL) tomar 1.2 mL y colocarlo en un tubo de ensaye. Adicionar a cada tubo 0.9 mL de reactivo mezcla y agitar en vortex por 10 segundos. Añadir 0.6 mL de reactivo C, agitar inmediatamente y nuevamente añadir 0.6 mL de reactivo C.

Después de agitar vigorosamente, incubar los tubos por 45 minutos protegidos de la luz, a temperatura ambiente.

Medir las absorbancias a una longitud de onda de 750 nm. Trazar una gráfica de absorbancia contra concentración de albúmina sérica bovina (expresado como  $\mu\text{g}$  de proteína/mL).

#### *Cálculos.*

La concentración de la proteína en la muestra se obtiene a partir de la curva de calibración elaborada con albúmina sérica bovina. El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución y se convierte de microgramos a miligramos para reportar la concentración de proteína en  $\text{mg/mL}$  de homogeneizado.

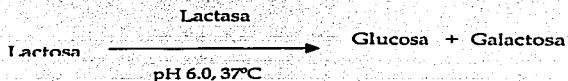
#### 4.5 Determinación de Actividad Enzimática de Lactasa.

Para la determinación de la actividad enzimática de la lactasa presente en el homogeneizado de la mucosa intestinal se requiere inicialmente de una hidrólisis del disacárido de interés por la enzima presente en la muestra, en este caso de lactosa. Al estar presente el sustrato de interés, la lactasa lo hidrolizará liberando una molécula de glucosa y una de galactosa. El siguiente paso es la cuantificación de uno y/o ambos productos de la hidrólisis. Si se desea se puede cuantificar la galactosa empleando un método fluorométrico con la Galactosa Deshidrogenasa<sup>35</sup>.

Sin embargo, se cuantifica la glucosa por la facilidad que representa su cuantificación empleando el método de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa.

#### 4.5.1 Hidrólisis.

En esta parte la determinación de la actividad enzimática de la lactasa se basa en la incubación del disacárido, lactosa, con la disacaridasa que se encuentra presente en el homogeneizado de la mucosa del intestino delgado, en condiciones adecuadas de temperatura y tiempo <sup>32,36</sup>.



#### Reactivos.

- ✓ Buffer de citratos 0.1M, pH 6.0<sup>37</sup>

Disolver 0.265 g de ácido cítrico monohidratado y 2.928 g de citrato de sodio dihidratado en agua desionizada y aforar a 100 mL. Revisar el pH y de ser necesario ajustar a 6.0. Conservar en refrigeración.

- ✓ Solución de lactosa 50 mg/mL.

Pesar 1.32 g de lactosa monohidratada (Sigma L-3625) y disolver en buffer de citratos 0.1 M, pH 6.0. Aforar a 25 mL. Conservar en refrigeración.

*Equipo.*

- Baño de agua, VWR Brand Inmersion Circulators, Modelo 1112.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner con celdas de 1cm, Modelo 340.
- Homogeneizador con pistilo de vidrio, Pirex con capacidad de 40 mL.
- Matraces volumétricos de 25 mL, 100 mL.
- Pipetas automáticas (50-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L, 2-5 mL)
- Vortex
- Tubos de ensaye de 13 X 100.

*Procedimiento.*

La determinación de lactasa se realizó a partir del homogenizado de la fracción del borde del cepillo intestinal de acuerdo al método descrito por Carmona<sup>31</sup>. Inicialmente se realizó una dilución de la fracción del borde en cepillo intestinal con el fin de que la concentración de la lactosa liberada por la muestra quede dentro del intervalo definido por la curva patrón de glucosa (10-100 mg/mL)<sup>32</sup>. La dilución se realiza con solución salina 0.15 M. En este trabajo se manejaron las siguientes diluciones de acuerdo a la edad:

RATAS (EDAD)	DILUCIÓN
Lactantes (15 días)	1:40
Recién destetadas (21 días)	1:10
Nutridas (36 días)	1:10
Desnutridas (36 días)	1:5
Nutridas (51 días)	1:10
Desnutridas (51 días)	1:10

En un tubo de ensaye se coloca 0.5 mL de la fracción del borde en cepillo intestinal previamente diluida, se adiciona 0.14 mL del buffer de citratos pH 6.0, 0.1 M . Posteriormente se adiciona 0.36 mL de la solución de lactosa y se agita vigorosamente unos segundos en el vortex. Se coloca el tubo de reacción en un baño de agua a  $37 \pm 1$  °C por 60 minutos<sup>38,39</sup>. La reacción se inicia al agregar el sustrato y se detiene al colocar el tubo de reacción en un baño de agua hirviendo ( $92 \pm 1$ °C) durante cinco minutos.

El blanco de la muestra se prepara de la misma manera y sumergiéndolo en el baño de agua hirviendo inmediatamente después de adicionar la solución de lactosa, dejándolo por cinco minutos. La preparación de un blanco se realiza con la finalidad de corregir las lecturas de la glucosa libre presente en la fracción del borde en cepillo del intestino delgado y la glucosa liberada por el sustrato ya presente en la muestra.

La cantidad de glucosa liberada se determina empleando el método de Glucosa Oxidasa Peroxidasa.

#### 4.5.2 Determinación de Glucosa Liberada por el Método de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa (GOD-POD)<sup>39,40</sup>.

##### *Fundamento.*

Este método enzimático y colorimétrico es el más utilizado para la determinación de glucosa *in vitro* en fluidos biológicos.

La  $\beta$ -glucosa presente en la muestra es oxidada por la glucosa oxidasa (GOD) en solución acuosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de la peroxidasa (POD) con el fenol y el cromógeno (4-aminofenazona)<sup>18,39,40</sup> para formar un colorante rojo. La intensidad del color que se desarrolla es proporcional a la concentración de glucosa y puede ser medida espectrofotométricamente entre 460 y 560 nm.

#### *Reactivos.*

- ✓ Glucosa Oxidasa Hycel No. 70408<sup>40</sup>

El reactivo es reconstituido en un volumen de 500 mL de agua desionizada. Se almacena a 2-8°C y protegido de la luz. Si se maneja bajo estas condiciones el reactivo es estable mínimo por un mes.

- ✓ Solución Estándar de Glucosa 10 mg/mL.

Se disuelve 100 mg de glucosa anhidra (J.T. Baker No. 50-99-7) en agua destilada y se afora a 10 mL.

#### *Equipo.*

- Baño de agua VWR Brand Inmersion Circulators Modelo 1112.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner Mod. 340, con celdas de 1 cm.
- Vortex.
- Cronómetro.
- Tubos de ensaye de 16 x 150.
- Pipetas automáticas (200-1000  $\mu$ L y 1-5 mL).

*Procedimiento.*

A un tubo de ensayo que contenga 0.2 mL del hidrolizado del ensayo de lactasa se le adiciona 2.5 mL del reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa, el cual debe estar previamente incubado a 37°C, se mezcla con suavidad y se incuba por 10 minutos a 37°C.

En esta determinación se preparan dos blancos, uno correspondiente al blanco de reactivo y otro al blanco de la muestra. El primero se prepara colocando 0.2 mL de agua destilada en lugar de la muestra y los 2.5 mL del reactivo de glucosa oxidasa-peroxidasa, mientras que el blanco de la muestra se prepara tomando 0.2 mL del hidrolizado que corresponde al tiempo cero en la determinación de lactasa.

Transcurrido el tiempo de incubación se mide la absorbancia de las muestras, ajustando el cero con el blanco de reactivos, a una longitud de onda de 520 nm.

*Preparación de la curva de calibración con Glucosa.*

Cada vez que se realice una determinación es necesario preparar una curva de calibración partiendo de una solución estándar de glucosa de 100 mg/mL, la cual inicialmente se diluye 1:10 en un matraz aforado para obtener una solución de 10 mg/mL. De dicha solución se toman alícuotas de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mL y se llevan a 1 mL con agua desionizada. De cada una de éstas soluciones se toma una alícuota de 0.2 mL, las cuales tendrán como concentración final 100, 80, 60, 40, 20 µg en 0.2 mL.

---

Para el punto inicial de la curva, 0  $\mu\text{g}$ , se colocan 0.2 mL de agua destilada y 2.5 mL del reactivo de glucosa oxidasa. Se incuban los tubos por 10 minutos a 37°C y se lee la absorbancia a 520nm. A partir de las lecturas obtenidas se traza una gráfica de absorbancia contra concentración de glucosa (expresada como  $\mu\text{g}$  de glucosa).

Nota: todas las diluciones se realizan con agua destilada.

#### *Cálculos.*

Inicialmente a la lectura de la muestra se le resta la lectura del blanco de la muestra para que el resultado sea interpolado en la curva de calibración de glucosa, el valor de concentración obtenido corresponde a la glucosa presente en 0.2 mL de muestra por lo que se multiplica por cinco para expresar la concentración en  $\mu\text{g}$  de glucosa/ mL. Por último se convierte a mg de glucosa/ mL.

#### 4.6 Cálculo de la Actividad Específica de Lactasa.

La actividad enzimática se expresa en términos de unidades (U) que se define como: la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en condiciones definidas, que en el caso de la lactasa, una unidad de actividad de la lactasa hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de lactosa por minuto a 37°C<sup>32,35,36</sup>. La actividad enzimática, U/mL·min, se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Unidad de Actividad Enzimática} = \left[ \frac{A \times F}{t \times v \times d \times PM} \right]$$

Donde:

A = mg de glucosa liberados en la hidrólisis enzimática

F = factor de dilución del homogeneizado para la determinación enzimática

t = tiempo de hidrólisis, 60 minutos

v = volumen de homogeneizado empleado para la hidrólisis, 0.5 mL

d = unidades de glucosa que se liberan del disacárido hidrolizado, en este caso 1

PM = peso molecular de la glucosa

Para calcular la actividad específica contenida en el tejido por miligramo de proteína se considera la concentración de proteína presente en el homogeneizado, expresada como mg de proteína / mL de homogeneizado.

$$\text{Unidad de Actividad Específica} = \left[ \frac{U / \text{mL}}{\text{mg proteína} / \text{mL}} \right] = U / \text{mg proteína}$$

#### 4.7 Análisis Estadístico.

Para el análisis de los resultados se utilizarán dos pruebas estadísticas: t de student y prueba de rangos múltiples de Duncan.

El objetivo de ambas pruebas es establecer si existe diferencia significativa entre las actividades específicas obtenidas por efecto de la DEP sobre la actividad de la lactasa, así como determinar si existe diferencia en la actividad entre las diferentes edades evaluadas. Ambas pruebas se realizaron empleando el programa estadístico Statgraphics versión 5.0, sin embargo a continuación se describe brevemente el concepto de cada prueba.

#### 4.7.1 t de Student.

En la prueba de t de Student los datos por analizar pertenecen a datos continuos, por lo cual, los cálculos que involucra esta prueba incluyen estadísticos poblacionales como la media y la desviación estándar<sup>30,42</sup>.

La prueba t de Student determina si las medias obtenidas por la evaluación de dos muestras pertenecen o no a una misma población, indica si las diferencias encontradas pueden considerarse como significativas con un cierto nivel de confiabilidad. En la prueba se establece como hipótesis que ambas muestras pertenecen a la misma población ( $H_0$ ).

#### 4.7.2 Prueba de rangos múltiples de Duncan<sup>42</sup>.

Como la prueba de t de student solo es aplicable si se comparan los datos de dos grupos, la prueba de Duncan toma en cuenta tanto el número de observaciones individuales como el de las medias que se comparan.

---

Para aplicar dicha prueba en muestras del mismo tamaño, se disponen en orden ascendente los  $n$  promedios de tratamiento y se determina el error estándar de cada promedio,  $S_{y1}$ .

Una vez que se determina el error estándar de cada promedio y a partir de la tabla de intervalos significativos de Duncan, se obtienen los intervalos significativos para  $n$  promedios. A continuación, se prueban las diferencias observadas entre las medias, comenzando por el valor más alto contra el más pequeño, comparando esta diferencia con el intervalo mínimo significativo  $R_{n-1}$ . Después se calcula la diferencia entre el valor más alto y el segundo más pequeño y se compara con el intervalo mínimo significativo  $R_{n-1}$ . Esto continúa hasta que todas las medias han sido comparadas con la media más grande. Posteriormente, se compara la diferencia entre la segunda media más grande y las restantes, hasta comparar todas las medias por pares. Si una diferencia observada es mayor que el intervalo mínimo significativo correspondiente, se concluye que la pareja de medias en cuestión es significativamente diferente.

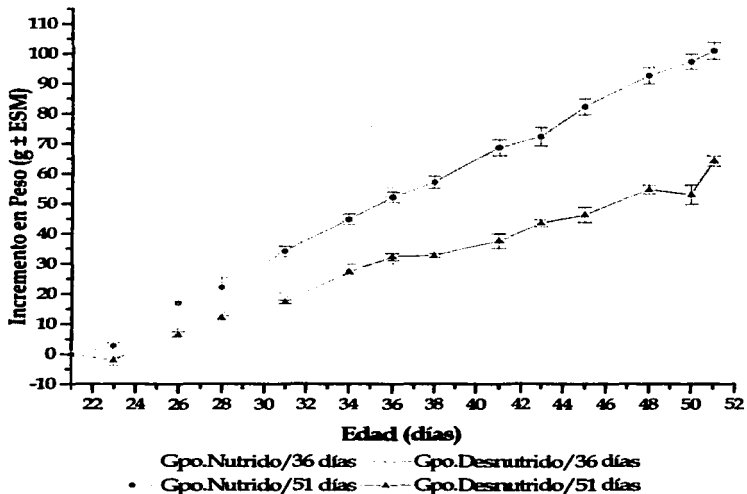
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el ensayo biológico se obtuvieron las curvas de crecimiento tanto de los animales del grupo control (15% de proteína/430 Kcal) como del grupo desnutrido (6% de proteína/250 Kcal). Para establecer que efectivamente se observaba un efecto adverso en el crecimiento a partir de la dieta ingerida, se consideró como criterio de desnutrición una disminución mayor o igual al 40% en el crecimiento con respecto al grupo control.

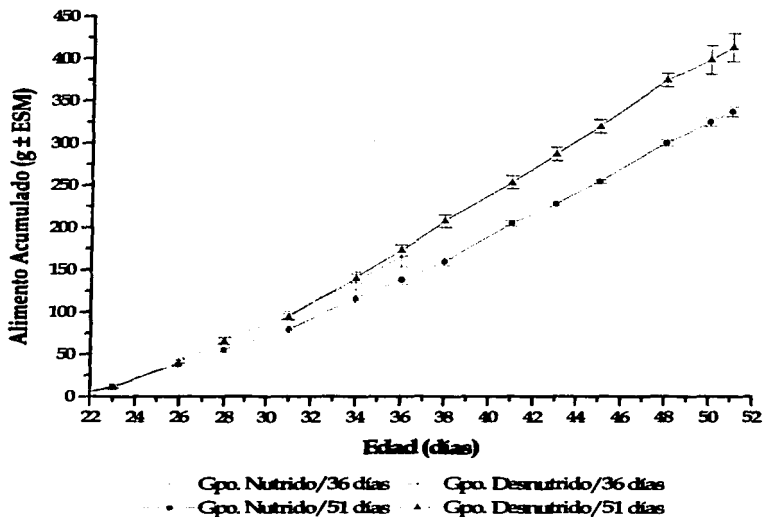
Como se puede observar en la Gráfica 1, la tendencia en el retraso del crecimiento es similar para las dos edades que se evaluaron: 36 días y 51 días de edad. En el caso de los animales desnutridos, desde el inicio del bioensayo presentan una ganancia menor de peso, manteniendo dicha tendencia a lo largo del ensayo. Lo anterior también se ha reportado en otros estudios donde se manejan cuadros de alimentación deficientes en proteínas y/o en energía, tanto en ratas como en otros animales<sup>6,26,43,44</sup>.

Además de las curvas de crecimiento, se calculó la cantidad de alimento consumido por ambos grupos a los 36 y 51 días de edad, los cuales se muestran en la Gráfica 2 como alimento acumulado. Los animales desnutridos en el primer día tuvieron un menor consumo de alimento debido al marcado cambio de alimentación; sin embargo, en el resto del ensayo consumieron una mayor cantidad de alimento que los animales nutridos, lo cual fue observado en ambas edades estudiadas.

El mayor consumo de alimento se justifica por la necesidad de los animales para compensar el bajo contenido energético y proteínico de la dieta que les fue suministrada.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de Ratas Nutridas y Desnutridas



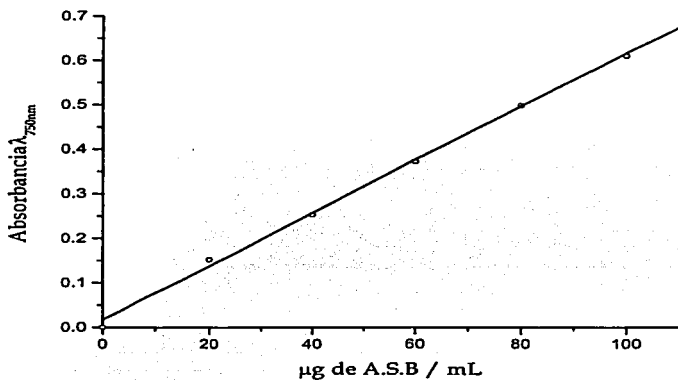
Gráfica 2. Alimento Acumulado de Ratas Nutridas y Desnutridas

Dentro de las observaciones que se registraron a lo largo del estudio, las más relevantes corresponden al grupo de desnutridos de 51 días de edad, pues dicho grupo en la última semana del estudio presentó pérdida de pelo.

En lo que concierne a la estandarización de las técnicas empleadas tanto para la cuantificación de proteína presente en los homogeneizados de la mucosa intestinal por el método de Lowry, así como en la determinación de la actividad enzimática de la lactasa se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan.

Con respecto a la técnica de determinación de proteína, debido a que la curva de calibración se realiza en cada ensayo, se manejaron coeficientes de correlación mayores a  $r=0.99$  para asegurar la linealidad en la respuesta, como lo muestra la Gráfica 3.

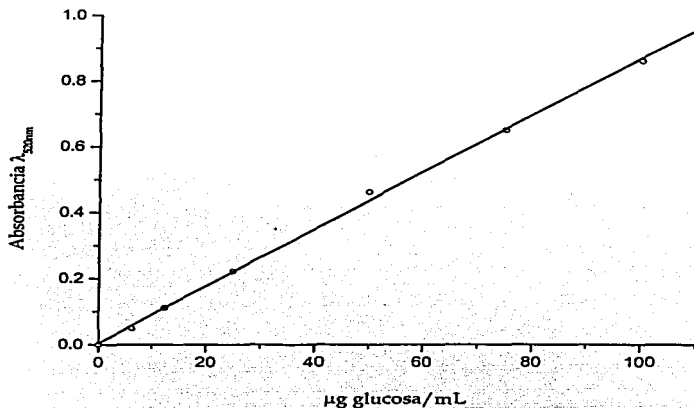
Además se obtuvo el coeficiente de variación de la técnica a partir de sextuplicados de una muestra, siendo éste de 1.84%. El intervalo de detección establecido fue de 0-100  $\mu\text{g}$  de proteína / mL.



Gráfica 3. Curva de Calibración con Albúmina Sérica Bovina.

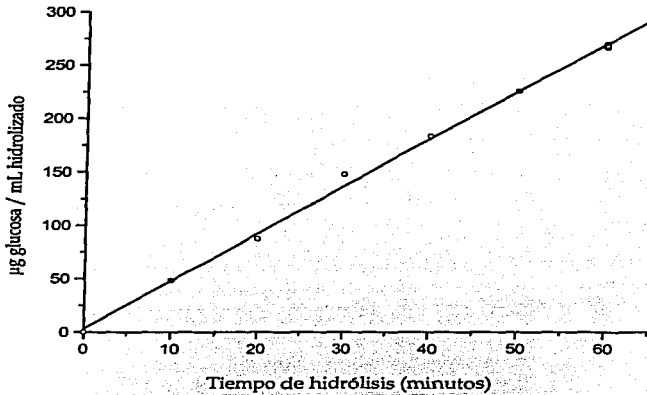
Determinación de Proteína. Método de Lowry.

En la estandarización de la técnica de cuantificación de glucosa liberada se alcanzó un coeficiente de variación de 1.74%. El intervalo de detección empleado fue de 0-100 µg de glucosa/mL de hidrolizado. En la curva de calibración empleando glucosa como estándar se manejó un coeficiente de correlación de 0.9998 ( Ver Gráfica 4).



Gráfica 4. Curva Patrón de Glucosa. Método de Glucosa Oxidasa Peroxidasa

Con respecto a las condiciones de hidrólisis para la determinación de actividad enzimática de la lactasa se realizaron curvas de liberación de glucosa para cada edad, donde se manejan distintos tiempos de hidrólisis a temperatura constante, comprobando la linealidad entre las variables (glucosa liberada vs tiempo) y por lo tanto el tiempo de hidrólisis de 60 minutos se puede utilizar para observar la actividad enzimática. En la Gráfica 5 se muestra una curva de liberación de glucosa para una rata de 36 días.



Gráfica 5. Curva de Liberación de Glucosa. Rata de 36 días edad.

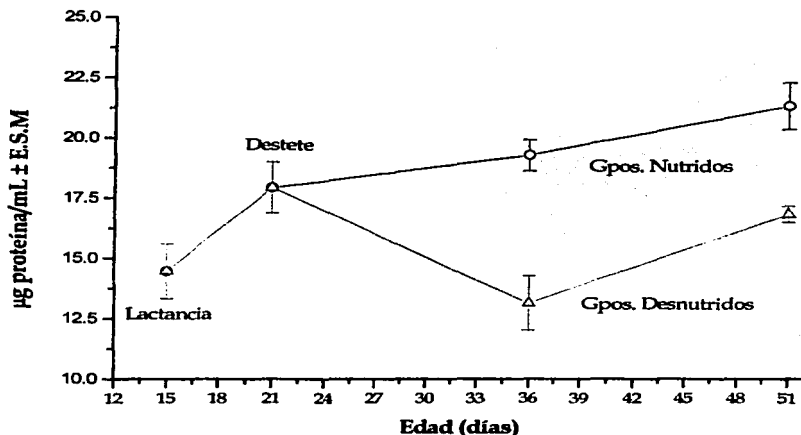
En cuanto al peso de la mucosa obtenida en el raspado del intestino delgado, no se observa una diferencia significativa entre los grupos nutridos y desnutridos para ambas edades. Lo anterior puede deberse al contenido de humedad del intestino, aunque no se puede aseverar pues dicha determinación no se llevó a cabo.

En las primeras etapas de vida de las ratas se observa que no hay una diferencia significativa en el contenido de proteína del intestino, sin embargo entre los grupos desnutridos y nutridos de 36 días de edad ya se establece dicha diferencia, la cual se observa nuevamente en las ratas de 51 días (ver Tabla 1, Gráfica 6). La disminución del contenido de proteína en animales desnutridos se ha reportado en otros estudios, y se debe a que en el cuadro de desnutrición se afecta la síntesis de proteína y por tanto de las enzimas<sup>3,19</sup>. Entre los dos grupos desnutridos se observa también diferencia significativa la cual se debe a que la rata va creciendo, la longitud del intestino aumenta y por tanto aumenta el contenido de proteína en las ratas de 51 días. Sin embargo, no se alcanza el contenido de proteína que muestra el grupo nutrido de la misma edad.

Tabla 1. Concentración de Proteína en el Homogeneizado de la Mucosa del Intestino Delgado de Ratas.

Edad (días)	Contenido de Proteína en el Homogeneizado $\mu\text{g}$ proteína/ $\text{mL} \pm \text{D.E}$
15 (lactancia)	14.47 $\pm$ 2.78 <sup>a</sup>
21 (destete)	17.92 $\pm$ 2.58 <sup>a</sup>
36/ Nutridos	19.26 $\pm$ 1.59 <sup>a</sup>
36/ Desnutridos	12.63 $\pm$ 2.81 <sup>b</sup>
51 / Nutridos	21.63 $\pm$ 3.35 <sup>c</sup>
51/ Desnutridos	16.81 $\pm$ 0.81 <sup>d</sup>

Letras distintas denotan diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.1$ );  $n=6$ .



Gráfica 6. Concentración de Proteína en el Homogeneizado de la Mucosa del Intestino Delgado de Ratas en las Diferentes Edades Estudiadas.

Los valores obtenidos tanto de actividad enzimática (U/mL) como de actividad específica (U/mg proteína) de la lactasa se muestran en la Tabla 2, mientras que la tendencia de ambas actividades se puede apreciar en las Gráfica 7 y 8 respectivamente.

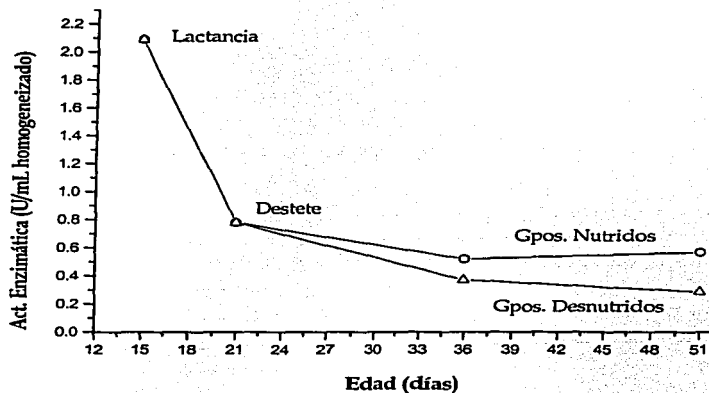
Tabla 2. Actividad Enzimática y Específica de Lactasa del Intestino Delgado de Ratas.

Edad (días)	Actividad Enzimática de Lactasa (U/mL $\pm$ D.E)	Actividad Específica de Lactasa (U/mg de proteína $\pm$ D.E)
15 (lactancia)	2.089 $\pm$ 0.047 <sup>a</sup>	0.1468 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>
21 (destete)	0.7796 $\pm$ 0.245 <sup>b</sup>	0.0427 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
36/ Nutridos	0.5196 $\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	0.0270 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
36/ Desnutridos	0.3712 $\pm$ 0.055 <sup>c</sup>	0.0169 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>
51 / Nutridos	0.5682 $\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	0.0269 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
51/ Desnutridos	0.2889 $\pm$ 0.028 <sup>d</sup>	0.0172 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>

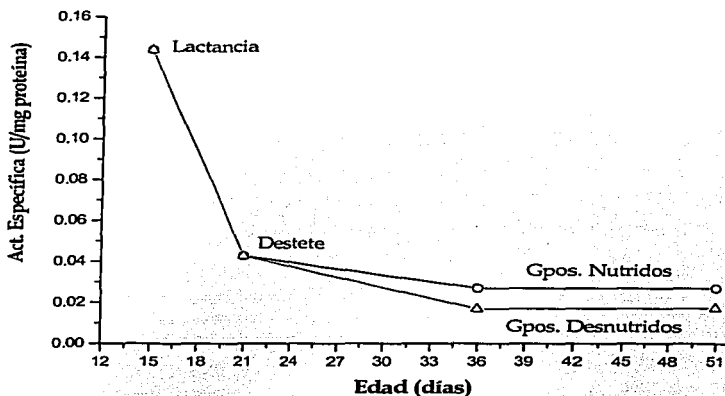
Letras distintas denotan diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.1$ ) ;  $n=6$ .

Inicialmente se observa que en un estado nutricional normal, la actividad específica de la lactasa va disminuyendo como se ha reportado en la literatura<sup>45</sup>, presentándose un máximo de actividad a los 15 días, cuando el animal todavía se encuentra en lactación por un mecanismo sinérgico provocado por la ingesta de lactosa presente en la leche materna. A los 21 días se observa una disminución de más del 50% de la actividad específica de la lactasa con respecto a la primera edad evaluada (15 días). Esta primera caída que ocurre en el momento del destete de las ratas, corresponde a la edad que presenta mayor variación en la actividad.

La variación en este período de evaluación se debe a que algunas de las ratas comienzan a consumir del alimento de la madre, además de continuar amamantando. Este cambio de actividad ha sido reportado anteriormente.<sup>19</sup>



Gráfica 7. Actividad Enzimática de Lactasa en Ratas.



Gráfica 8. Actividad Específica de Lactasa en Ratas.

A los 36 días de edad de las ratas se observa una segunda caída de la actividad específica de la lactasa, la cual se mantiene en los animales de 51 días, lo que nos indica que la actividad va disminuyendo por efecto de la edad en el primer mes de vida y que se mantiene constante posteriormente dentro del período que duró el estudio.

Por último, es necesario evaluar la actividad con respecto al estado nutricional del animal. En los animales de 36 días encontramos que se establece diferencia significativa entre el grupo nutrido y el desnutrido.

Lo anterior indica que efectivamente se presentó una disminución de la actividad de la lactasa por efecto de la dieta hipocalórica e hipoprotefínica que se manejó en esta parte del ensayo. Esto se debe a que se disminuye la síntesis de proteínas en animales desnutridos lo que concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios<sup>20,21</sup>. En los grupos de 51 días, encontramos la misma tendencia, es decir, se presenta una disminución de la actividad específica de la lactasa en los animales desnutridos. Lo anterior habla de que se sigue manteniendo el efecto de la desnutrición sobre la actividad enzimática de la lactasa. Además se observa que en ambas edades donde se manejaron los cuadros de desnutrición, la actividad específica de la lactasa se mantiene constante, lo cual posiblemente se deba a una adaptación a la desnutrición, sin embargo para asegurar lo anterior hubiera sido necesario manejar una tercera edad en desnutrición.

## 6. CONCLUSIONES.

- En la rata como modelo biológico se logró obtener un cuadro de desnutrición que se refleja en el crecimiento de los animales desnutridos, el cual es menor que el crecimiento de los animales nutridos, durante el período de experimentación.
- El consumo de alimento en los grupos de los animales desnutridos fue mayor con respecto a los grupos nutridos, esto se puede explicar que ocurre para compensar el bajo contenido calórico y proteínico de la dieta suministrada.
- El contenido de proteína en la mucosa del intestino delgado disminuyó significativamente en los animales que presentan desnutrición, en comparación con los animales de los grupos control.
- La actividad específica de la lactasa en ratas disminuye rápidamente durante el primer mes de vida y posteriormente permanece constante.
- La desnutrición provoca una marcada disminución en la actividad específica de la lactasa en ratas después del destete.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. World Health Organization. Global Database on Child Growth and Malnutrition. [www.who.int/nutgrowthdb/](http://www.who.int/nutgrowthdb/). Buscador empleado: [www.yahoo.com.mx](http://www.yahoo.com.mx). Citado el día 5 de noviembre de 2002.
2. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Presentación Nacional del Informe del XII Censo General de Población y Vivienda, 2000. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). Buscador empleado: [www.yahoo.com.mx](http://www.yahoo.com.mx). Citado el día 5 de noviembre de 2002.
3. Touissant G., García-Aranda, J., Desnutrición Energético Proteínica en: *Nutriología Médica*, Casanueva E., Kaufer-Horwitz, M. Editores, Editorial Médica Panamericana, México, D.F., 2ª. Edición, 22-31, 212-245, 2001.
4. Feldman, E., *Principios de Nutrición Clínica*, Editorial El Manual Moderno, México, D.F., 346-359, 1990.
5. Bender, D., *Introducción a la Nutrición y el Metabolismo*, Editorial Acribia, Zaragoza, 187-195, 1995.
6. Butzner, D., Butler, D., Miniats, P., Impact of Chronic Protein-Caloric Malnutrition on Small Intestinal Repair after Acute Viral Enteritis, a Study on Gnotobiotic Piglets, *Pediatric Research*, Vol.19, No. 4, 476-481, 1985.

7. Zijlstra, R., Donovan, S., Odle, J., Gelberg, H., Petschow, B., Gaskins, H., Protein-energy Malnutrition Delays Small Intestinal Recovery in Neonatal Pigs Infected with Rotavirus, *Journal of Nutrition*, Vol.127, No.6, 1118-1127, 1997.
8. Guyton, A., *Tratado de Fisiología Médica*, Editorial Interamericana Mc. Graw Hill, México, D.F., 776-783, 1989.
9. Asociación Mexicana de Pediatría, A.C., *Nutrición*, Arnarz, O., Gamboa, J., Escobar, E., Aparicio, E. Editores, Editorial Interamericana, México, D.F., 121-133, 1995.
10. Brody, T., *Nutritional Biochemistry*, Academic Press, Inc., Nueva York, 85-105, 1994.
11. Ziegler E., Filer L. Jr. (Editores), *Present Knowledge in Nutrition*, 7ª. Edición, MSI Press, Washington, D.C., 33-43, 67-86, 1996.
12. McClintic, R., *Fisiología del Cuerpo Humano*, 2ª. Edición, Editorial Limusa, México, D.F., 498-521, 1989.
13. Fenemma, O., *Food Chemistry*, Macel Dekker, Inc., Washington, D.C., 82-91, 1996.
14. Semenza, G., *Handbook of Physiology*, Section 6, Alimentary Canal, Vol. 5, Bile, Digestion, Ruminant Physiology, American Physiology Society, Ed. Waverly Press, Nueva York, 2543-2560, 1968.

15. Haubrich, Schakner, Berk, *Gastroenterology*, 5ª. Edición, Vol. 2, Saunders Co., Nueva York, 955-962, 1991.
16. Tresguerres J., *Fisiología Humana*, Editorial Mc. Graw Hill Interamericana, México, D.F., 783-786, 1992.
17. Quan, R., Santiago, N., Tsuboi, K., Bray, G., Intestinal Lactase, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, 15882-15888, 1990.
18. Whitaker R., *Principle of Enzimology for the Food Sciences*, Marcel Dekker, Inc., Washington, D.C., 462-466, 1972.
19. Firmansyah A., Suwandito L., Penn D., Lebenthal E., Biochemical and Morphological Changes in the Digestive Tract of Rats After Prenatal and Post Natal Malnutrition, *American Journal of Clinical Nutrition* ,Vol. 50, No.2, 261-268, 1989.
20. Sanglid, P., Fowden, A., How Does the Foetal Gastrointestinal Tract Develop in Preparation for Enteral Nutrition after Birth?, *Livestock Production Science*, Vol. 66, 141-150, 2000.
21. Green, J.R., Hauri, H.P., Lactase Enzymes in the Intestinal Brush Border Membrane of the Suckling Rat, *FEBS Letters*, Vol. 84, No. 2, 233-235, 1977.
22. Castillo, R., Reisenauer, A., Kwong, L., Intestinal Lactase in the Neonatal Rat, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, 15889-15893, 1990.

23. Zarling, E., Mobarhan, S., Effect of Restricting a Balanced Diet on Rat Intestinal Disaccharidase Activity and Intestinal Architecture, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 109, No. 5, 556-559, 1987.
24. Dudley, M., Wykes, L., Lactase Phlorizin Hydrolase Synthesis is Decreases in Protein-Malnourished Pigs, *Journal of Nutrition*, Vol. 127, No.5, 687-693, 1997.
25. Almeida, S., De Araujo, M., Postnatal Protein Malnutrition Affects Play Behavior and other Social Interactions in Juvenile Rats, *Physiology and Behavior*, Vol. 14, No.1-2, 45-51, 2001.
26. Rossi, T.M., Lee, P.C., Young, C.M., Lerner, A., Lebenthal, E., Effect of Nutritional Rehabilitation on the Development of Intestinal Brush Border Disaccharidases of Postnatally Malnourished Weanling Rats, *Pediatric Research*, Vol. 20, No.8, 793-797, 1986.
27. Leichter, J., goda, T., Koldovskye, O., Dependency of Lactose Absorption on Lactase Activity in Starved Rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 65, 2287-2290, 1987.
28. Rossi M., Maiuri, L., Salvati, V., Russomano, C., Capparelli, R., In vitro Biosynthesis of Lactase in Suckling and Adult Rabbits, *FEBS Letters*, Vol.29, No. 1-2, 106-110, 1993.
29. Beal, V., *Nutrición en el Ciclo de Vida*, Editorial Limusa, México, D.F., 26-29, 1994.

- 
30. Lloyd, L., Mc. Donald, B., Crampton, E., *Fundamentos de Nutrición*, Editorial Acribia, Zaragoza, 3-7, 282-318, 360-383, 1982.
31. Carmona, A., Borguud, L., Borges, G., Levy-Benshimol, A., Effect of Black Bean Tannins on in vitro Carbohydrate Digestion and Absorption, *Journal of Nutrition Biochemistry*, Vol. 7, 445-450, 1996.
32. Dahlqvist, A., Method for Assay of Intestinal Disaccharidases, *Analytical Biochemistry*, Vol. 7, 18-25, 1963.
33. Lowry, O., Rosebough, N., Rondall, R., Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, 265-275, 1951.
34. Bergmeyer, H., The Lowry Method en: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3ª. Edición, Bergmeyer, J., Grassi, M., Editores, Vol. 1, Weinheim, 88-91, 1996.
35. Dahlqvist, A., Asp, N., Human Small Intestine  $\beta$ -galactosidases: Specific Assay of Three Different Enzymes, *Analytical Biochemistry*, Vol. 47, 527-538, 1972.
36. Bergmeyer, H.,  $\alpha$ -glucosidases en: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3ª. Edición, Bergmeyer, J., Grassi M. Editores, Vol. 4, Weinheim, 208-217, 1996.

37. Jeffrey Clymer. Citric Buffer Calculation. w3.one.et/~jwcllymer/cit.html. Versión 1, 1997. Buscador empleado: [www.yahoo.com](http://www.yahoo.com). Citado el día 4 de Septiembre del 2000.
38. Pluwman, K., *Enzyme Kinetic*, Ed. Mc Graw hill, Nueva York, pp. 112-118, 1972.
39. Bergmeyer, H.,  $\beta$ -galactosidase (Lactase) en: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3ª. Edición, Bergmeyer, J., Grassi M., Editores, Vol. 4, Weinheim, 227-230, 1996.
40. Trinder P., Glucose Measurement with Glucose-oxidase-peroxidase Reagent, *Analytical Clinical Biochemistry*, Vol. 7, 3, 1994.
41. GOD-POD, No. 70408. *Glucosa (Oxidasa) Método Enzimático Colorimétrico de Punto Final*, Trinder, Hycel de México, S.A. de C.V.
42. Montgomery, D., *Diseño y Análisis de Experimentos*, Gpo. Editorial Iberoamérica, México, D.F., 67-69, 556, 1991.
43. Dudley, M., Schoknetch, P., Dudley A., Jiang, L., Lactase Synthesis is Pretranslationally Regulated in Protein-deficient Pigs Fed a Protein-sufficient Diet, *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 28, 4, 621-628, 2001.
44. Passos, M., Ramos, C., Moura, E., Short and Long Term Effects of Malnutrition in Rats during Lactation on the Body Weight of Offspring, *Nutrition Research*, Vol. 20, No. 11, 1603-1612, 2000.

45. Yamada, K., Bustamante, S., Dietary-Induced Rapid Increase of Rat Jejunal sucrase and Lactase Activity in all Regions of the Villus, *FEBS Letters*, Vol. 129, 89-92, 1981.
46. Carter, C., Loxon, R., Parsons, D., *Biochemistry in Relation to Medicine*, Ed. Longman, Londres, 247-261, 1972.

**Apéndice A. Elaboración de Dietas.**

➤ Dieta al 15% de proteína y 430Kcal (1849KJ)/100g.

Para la elaboración de la dieta al 15% de proteína para el grupo nutrido se partió de una dieta de referencia (ver Tabla 1) , en este caso una dieta al 10% de proteína, siendo la fuente de proteína caseína (pureza de 89.19%) y con una densidad calórica de 4.3.

Componente	Cantidad (g)	Factor (Kcal/g)	Kcal	% Kcal totales.
Caseína (89.2%)	11.21	4	40	9.3
Sacarosa	22	4		
Dextrina	25	4		
Dextrosa	19	4		
Total de CHO's	66	4	264	61.39
Manteca Vegetal	8	9		
Aceite de Maíz	6	9		
Total Lípidos	14	9	126	29.3
Mezcla de Sales.	4	-		
Mezcla de Vitaminas	2	-		
Celulosa	2.88	-		
Total	100.00		430	100

Tabla 1. Composición de la dieta de referencia.

Como la dieta a elaborar debe tener el mismo aporte calórico fue necesario el ajuste del contenido energético de la siguiente manera:

Se adicionan 5.6 g de caseína (89.2%) que aportan 20 Kcal más por parte de la fuente proteínica los cuales se restan proporcionalmente a los carbohidratos y lípidos, considerando el porcentaje de Kcal que aportan cada uno de éstos en la dieta de referencia.

$$20 \text{ Kcal} \times 0.6139 = 12.28 \text{ Kcal menos de carbohidratos}$$

$$20 \text{ Kcal} \times 0.2930 = 5.86 \text{ Kcal menos de lípidos}$$

Por lo tanto la formulación de la dieta al 15 % de proteína y 430 Kcal(1849KJ)/100g queda de la siguiente manera:

Componente	Cantidad a pesar (g)		Factor (Kcal)	E (Kcal)
Caseína	16.82			
Σ proteína	-	15.0	4	60
Sacarosa	20.98			
Dextrosa	23.84			
Dextrina	18.12			
Σ CHO's	-	62.94	4	251.76
Manteca	7.63			
Aceite	5.72			
Σ lípidos		13.35	9	120.15
Sales	4.00			
Vitaminas	2.00			
Celulosa	0.89			
Total	100			431.91

Y Dieta al 6% de proteína y 250 Kcal(1075KJ)/100g.

La formulación para la dieta al 6% de proteína y 250 Kcal(1075 KJ) en 100g se indica en la siguiente tabla 8.

Componente	Cantidad a pesar (g)		Factor (Kcal)	E (Kcal)
Caseína (89.2%)	6.73			
Σ proteína	-	6	4	24
Sacarosa	12.79			
Dextrosa	11.05			
Dextrina	14.53			
Σ CHO's	-	38.37	4	153.48
Manteca	4.65			
Aceite	3.49			
Σ lípidos	-	8.14	9	73.26
Sales	4.00			
Vitaminas	2.00			
Celulosa	-	40.76		
Total	100			250.74