

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 822 178**

(51) Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)  
**A23L 33/115** (2006.01)  
**A23L 33/125** (2006.01)  
**A23L 33/175** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2013 PCT/US2013/066236**
- (87) Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066426**
- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2013 E 13849624 (5)**
- (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 2909802**

---

(54) Título: **Formulaciones dietéticas que promueven la regeneración de tejidos/órganos**

(30) Prioridad:

**22.10.2012 US 201261716676 P**  
**12.12.2012 US 201261736308 P**  
**28.12.2012 US 201261746787 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.04.2021**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA (100.0%)**  
**1150 South Olive Street, Suite 2300**  
**Los Angeles, CA 90015, US**

(72) Inventor/es:

**LONGO, VALTER D.;**  
**CHENG, CHIA-WEI;**  
**BRANDHORST, SEBASTIAN y**  
**WEI, MIN**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 822 178 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones dietéticas que promueven la regeneración de tejidos/órganos

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un paquete de dieta para uso como medicamento y, en particular, para promover la regeneración de tejidos y/u órganos.

10 Antecedentes

Las terapias regenerativas pueden usarse en la reposición de tejidos/órganos dañados causados por quimioterapia o radioterapia, asociados con enfermedades degenerativas o envejecimiento.

15 Las terapias regenerativas convencionales se basan comúnmente en la introducción de células regenerativas derivadas de donantes y/o la administración de moléculas biológicamente activas que estimulan la regeneración. Además de las cuestiones éticas, los desafíos técnicos y de seguridad en el aislamiento, mantenimiento, expansión, emparejamiento donante-receptor y trasplante de células madre persisten y limitan la utilidad y viabilidad de las terapias regenerativas convencionales existentes. Las terapias convencionales típicamente no han utilizado un protocolo dietético como tratamientos efectivos para pacientes que necesitan regeneración de tejidos. Aunque se sabe que la dieta proporciona protección a los tejidos en diversas circunstancias. La principal limitación de las terapias convencionales es la falta de un proceso regenerativo coordinado que recuerda al proceso de desarrollo que conduce a la generación de tejido en el embrión. Las formulaciones y métodos descritos en esta solicitud pueden superar estas limitaciones.

20 25 La restricción calórica (CR) sin desnutrición es eficaz para proteger el cerebro contra el envejecimiento y el estrés oxidativo (Martin et al. 2006). Varios estudios apoyan un papel beneficioso para esta intervención dietética en la protección contra la descomposición dependiente de la edad en el desempeño cognitivo en roedores (Fontan-Lozano et al. 2008). Además, la CR muestra notables propiedades neuroprotectoras contra enfermedades neurodegenerativas, como accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD) y enfermedad de Alzheimer (AD) en varios modelos animales (Mattson 2005; Patel et al. 2005).

30 35 40 45 Estudios recientes en diferentes modelos de ratones con AD reportaron que la reducción de la ingesta de alimentos puede disminuir las neuropatologías relacionadas con la AD y la disfunción cognitiva. Por ejemplo, la CR reduce la progresión de la deposición de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en el hipocampo y la corteza cerebral de ratones con AD que portan mutaciones para FAD (Wang et al. 2005), APP (proteína precursora de amiloide) y APP + PS-1 (presenilina 1) (Patel et al. 2005; Mouton et al. 2009). La CR mejora los fenotipos neurodegenerativos evaluados por reconocimiento de objetos y pruebas de condicionamiento del miedo contextual en ratones AD cDKO (anulación doble condicional) (Wu et al. 2008). Mattson y sus colaboradores han demostrado que la CR también puede mejorar el deterioro de la memoria relacionado con la edad y disminuir la acumulación de  $A\beta$  y tau fosforilada en un ratón triple transgénico (3xTg-AD) que sobreexpresa mutaciones relacionadas con AD (PS-1, APP) y demencia frontotemporal (tau) (Halagappa et al. 2007). Además, los estudios en poblaciones humanas sugieren que la dieta juega un papel importante en la AD y la ingesta reducida de alimentos puede proteger contra esta patología. Por ejemplo, un estudio epidemiológico de Luchsinger y sus colegas proporcionó evidencia de que las personas con una ingesta baja de calorías tienen un riesgo reducido de desarrollar AD (Luchsinger et al. 2002).

50 55 60 65 Entre la gran cantidad de cambios metabólicos y fisiológicos causados por la CR, la reducción del eje de señalización de la hormona del crecimiento (GH)/factor tipo insulina (IGF-1) puede ser importante por sus efectos protectores (Fontana et al. 2010). El IGF-1 circulante es una hormona producida principalmente por el hígado que regula el metabolismo energético, proliferación celular, diferenciación celular, tamaño corporal y longevidad. Los niveles de IGF-1 están regulados por la disponibilidad de caloría y/o proteína y la CR a largo plazo disminuye la concentración sérica de IGF-1 en aproximadamente un 30-40 % en roedores (Thissen et al. 1994) pero no en humanos a menos que también se reduzca la ingesta de proteínas (Fontana et al. 2008). Las mutaciones que disminuyen la actividad de las vías de señalización del receptor de la hormona del crecimiento (GHR)/IGF-1, de manera similar a la CR, pueden prolongar la longevidad y potenciar la resistencia al estrés en una amplia gama de organismos y tejidos (Kenyon 2005), incluido el sistema nervioso central de los mamíferos (CNS) (Parrella & Longo 2010). Aunque la superposición entre las vías alteradas por estas intervenciones nutricionales y genéticas parece ser solo parcial, se ha propuesto que la disminución de los niveles de IGF-1 puede mediar parte de los efectos beneficiosos producidos por la CR (Sonntag et al. 1999). En apoyo de esta teoría, recientemente se ha demostrado que la reducción de la señalización de IGF-1 en un ratón con AD que porta mutaciones de APP y PS-1 protege contra los síntomas de la enfermedad de tipo Alzheimer, incluidos los déficits cognitivos y neuroinflamación (Cohen et al. 2009). En particular, los ratones y humanos con deficiencia del receptor de GH (GHRD) están protegidos de las principales enfermedades (Guevara-Aguirre et al. 2011; Ikeno et al. 2009; Masternak et al. 2009) y los ratones GHRD viven consistentemente un 40 % más (Coschigano et al. 2000). Además, un estudio realizado en una cohorte de centenarios judíos asquenazíes identificó alteraciones genéticas en el receptor de IGF-1 humano (IGF-1R) que resultan en una señalización reducida de IGF-1 entre los centenarios en comparación con los controles (Suh et al.

2008). Por otro lado, el efecto de la deficiencia de IGF-1 o IGF-1R sobre la esperanza de vida es inconsistente (Bokov et al., 2011), lo que sugiere que la reducción de IGF-1 puede ser solo uno de los mediadores de los efectos antienvejecimiento de la deficiencia de GHR.

- 5 La disponibilidad de proteínas y aminoácidos (AA) es fundamental para regular la expresión del gen IGF-1. Además, la restricción de proteínas no solo disminuye la tasa de producción de IGF-1, sino que también acelera su depuración, regula la interacción de IGF-1 con proteínas de enlace de IGF (IGFBP) y atenúa las acciones biológicas de IGF-1 (Ketelslegers et al. 1995). Porque la CR es muy difícil de mantener y está inevitablemente asociada con la pérdida de peso, pérdida del deseo sexual, hambre, sensación de frío a temperatura ambiente normal y posibles efectos secundarios del sistema inmunológico.

10 Por consiguiente, existe la necesidad de protocolos dietéticos para aliviar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer y/u otras enfermedades degenerativas y promover la regeneración de tejidos.

- 15 El documento US 2011/118528 divulga métodos para proteger a los pacientes y sensibilizar las células cancerosas en combinación con quimioterapia y/o radioterapia.

20 Longo V D et al (Trends in Pharmacological Sciences, Elsevier, Hayworth, GB, vol. 31. No, 2, 1 de febrero de 2010, páginas 89-98) discuten la restricción de calorías y la prevención del cáncer.

25 El documento WO 2012/113415 divulga composiciones cetogénicas para uso en el tratamiento de un paciente con cáncer que se somete a quimioterapia o radioterapia.

#### Sumario de la invención

30 La invención está definida por las reivindicaciones.

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un paquete de dieta para uso como medicamento que comprende: un primer conjunto de raciones para una primera dieta que se administrará durante un primer período de tiempo a un sujeto, proporcionando la primera dieta de 4.5 a 7 kilocalorías 0.45 kg (libra) de sujeto durante el primer día y de 3 a 5 kilocalorías por 0.45 kg (libra) de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta, en donde el contenido calórico de la dieta del primer día es mayor que el contenido calórico de la dieta del segundo al quinto día, el paquete de dieta incluye:

40 menos de 30 g de azúcar en el primer día;

45 menos de 20 g de azúcar del segundo al quinto día;

50 menos de 28 g de proteínas en el primer día;

55 menos de 18 g de proteínas en días del segundo al quinto día;

60 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día;

65 10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día;

70 entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día;

75 3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día;

80 menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día;

85 menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y

90 12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método no terapéutico para la modificación de la dieta en un sujeto que necesita perder peso, que comprende: administrar una primera dieta a un sujeto durante un primer período de tiempo, proporcionando la primera dieta de 4.5 a 7 kilocalorías por 0.45 kg (libra) de sujeto durante un primer día y de 3 a 5 kilocalorías por 0.45 kg (libra) de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta, en donde el contenido calórico de la dieta para el primer día es mayor que el contenido calórico de la dieta del segundo al quinto día, la primera dieta incluye:

95 menos de 30 g de azúcar en el primer día;

100 menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día;

- menos de 28 g de proteínas el primer día;
- menos de 18 g de proteínas en días del segundo al quinto día;
- 5 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día;
- 10 10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día;
- 15 10 entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día;
- 20 3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día;
- menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día;
- 25 15 menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y
- 30 20 12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.
- 35 25 Las características preferidas de cada aspecto de la invención se establecen en las reivindicaciones dependientes aquí a continuación, una libra corresponde a 0.45 kg.
- La divulgación resuelve uno o más problemas de la técnica anterior. Aquí se divulga un método para tratar a un sujeto que necesita una modificación de la dieta. El método incluye las etapas de identificar a un sujeto que necesita una modificación de la dieta y administrar una primera dieta al sujeto durante un primer período de tiempo. La primera dieta proporciona de 4.5 a 7 kilocalorías por libra de sujeto durante un primer día y de 3 a 5 kilocalorías por libra de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta. La primera dieta incluye menos de 30 g de azúcar en el primer día; menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día; menos de 28 g de proteínas en el primer día; menos de 18 g de proteínas en los días del segundo al quinto día; 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día; 10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día; entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día; 3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día; menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día; menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y 12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.
- 40 35 Se proporciona un paquete de dieta que implementa el protocolo de dieta establecido anteriormente. El paquete de dieta incluye un primer conjunto de raciones para una primera dieta que se administrará por un primer período de tiempo a un sujeto, la primera dieta proporciona de 4.5 a 7 kilocalorías por libra de sujeto durante el primer día y de 3 a 5 kilocalorías por libra de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta. El paquete de dieta incluye raciones que aportan menos de 30 g de azúcar en el primer día; menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día; menos de 28 g de proteínas en el primer día; menos de 18 g de proteínas en días del segundo al quinto día; 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día; 10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día; entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día; 3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día; menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día; menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y de 12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.
- 45 50 Se proporciona un método para aumentar el número de células madre y/o células progenitoras en un sujeto. De acuerdo con el método, se identifica un sujeto que requiere un mayor número de células madre y/o células progenitoras y se induce una reducción en la actividad de la proteína quinasa A (PKA).
- 55 55 Se proporciona un método para aliviar un síntoma en un sujeto inmunocomprometido o potenciar el estado inmunológico de un sujeto. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto inmunocomprometido o un sujeto que deseé un estado inmunológico mejorado y luego inducir la reducción de la actividad de PKA en el sujeto inmunocomprometido.
- 60 60 Se proporciona un método para transferir células madre hematopoyéticas/progenitoras a un sujeto. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto inmunocomprometido. Se induce una reducción en la actividad de la proteína quinasa A y/o en el nivel del receptor de IGF-I en la médula ósea o en células madre de un donante. Después del tratamiento, las células se injertan en el sujeto inmunocomprometido o en otro sujeto que necesite regeneración.
- 65 65 Se proporciona un método para promover el crecimiento de células regenerativas. El método incluye una etapa de administrar un protocolo de dieta a un sujeto durante un primer período de tiempo y un segundo período de tiempo. Durante el primer período de tiempo, se proporciona al sujeto una dieta reducida en calorías con al menos un 50 por ciento de calorías derivadas de la grasa. Durante el segundo período de tiempo, se proporciona al sujeto una

segunda dieta reducida en calorías de 900 kcal/día como máximo. Opcionalmente, las células regenerativas se aíslan del sujeto y se transfieren a un receptor.

Se proporciona un método para aliviar un síntoma de la enfermedad de Alzheimer. El método incluye una etapa de administrar una dieta específica de aminoácidos que tiene ciertos aminoácidos. Se encontró que una alternancia a largo plazo de ciclos de una dieta normal y una dieta restringida en proteínas (ciclos de restricción de proteínas, PRC) reduce los niveles/señalización de GHR/IGF-1 y mejora los síntomas tipo AD en un ratón 3xTg-AD que acumula ambas patologías A $\beta$  y tau.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona la Tabla 9 que muestra los efectos de una dieta que imita el ayuno (FMD) sobre la composición corporal en ratones y humanos. En ratones hembra BALB/c de 16.5 meses de edad, se midió de forma rutinaria el peso corporal. Un ciclo de FMD redujo significativamente el peso corporal en un 18 % en comparación con los controles alimentados ad lib. Después de la realimentación, no quedó ninguna diferencia significativa en el peso, lo que indica que todos los ratones se recuperaron del régimen dietético después de completar el primer ciclo. La disminución de peso se puede atribuir a la ingesta relativamente baja de calorías durante el ciclo de FMD, que se redujo en ~80 % al considerar todos los 4 días del ciclo. No se observaron diferencias en la ingesta de calorías entre los grupos de dieta y control, ya que los ratones compensaron después de la alimentación FMD con un ligero consumo excesivo durante la realimentación; normalizando así la ingesta calórica. Los efectos a largo plazo del régimen de FMD sobre la grasa corporal total, así como los depósitos de grasa subcategorizados (subcutánea y visceral) se evaluaron mediante tomografías computarizadas (CT) de rayos X. A los 28 meses de edad y después de completar 23 ciclos de FMD, la grasa corporal total y visceral, que está estrechamente relacionada con patologías asociadas a la obesidad, se redujo en los ratones con FMD. Solo se pudo medir un efecto menor sobre los depósitos de grasa subcutáneos. En los humanos, después de uno y tres ciclos de una dieta que imita el ayuno, el peso corporal (como % en comparación con los valores de línea base antes del inicio de la FMD) se redujo significativamente y, por lo tanto, tiene efectos similares a los observados en los experimentos preclínicos. El porcentaje relativo de grasa del tronco de los sujetos humanos al completar tres ciclos de FMD se evaluó mediante "absorciometría de rayos X de energía dual" (DEXA). Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 en comparación con el control o la línea base;

La Figura 2 proporciona la Tabla 10 que muestra los efectos de una dieta que imita el ayuno sobre los biomarcadores sanguíneos en ratones y humanos. En comparación con los animales de control alimentados ad lib, los ratones mantenidos con la dieta FMD a partir de los 16.5 meses de edad tuvieron una incidencia de cáncer significativamente reducida a lo largo de su vida. Además, el desarrollo del cáncer se retrasó significativamente en los ratones alimentados con la FMD. Teniendo en cuenta la vida útil máxima de la cepa de ratón C57BL/6 de aproximadamente 33 meses (datos no mostrados), la dieta FMD retrasó el inicio del desarrollo del cáncer en 3.5 meses o un 10 %. La glucosa y el IGF-1, que nosotros y otros habíamos demostrado que promueven el desarrollo y progresión del tumor, se redujeron significativamente durante el régimen de FMD. Se incrementó IGFBP-1, que se enlaza y reduce la biodisponibilidad de IGF-1; reduciendo así aún más la señalización de IGF-1. En humanos, no se dispone de datos sobre la incidencia o el desarrollo del cáncer. De manera similar a los datos preclínicos, el IGF-1 se redujo después del primer y tercer ciclo de FMD. Se incrementaron los niveles de IGFBP-1. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 en comparación con el control o la línea base;

La Figura 3 proporciona la Tabla 11 que ilustra que una dieta que imita el ayuno reduce la inflamación en roedores. En comparación con los animales de control alimentados ad lib, los ratones mantenidos con la dieta FMD a partir de los 16.5 meses de edad tuvieron una incidencia significativamente reducida de tejidos inflamados detectados en la necroscopia. Los tejidos inflamados incluían, entre otros, el hígado y el tracto reproductivo de ratones hembra (no mostrado). Los ratones C57BL/6 (ambos géneros) son particularmente propensos a desarrollar una dermatitis ulcerante que empeora progresivamente. Los ratones hembra alimentados con la dieta FMD mostraron una reducción del 50 % en la incidencia de dermatitis a lo largo de su vida en comparación con los animales control alimentados ad lib (10.3 % frente al 19.6 %, respectivamente). \* p < 0.05 en comparación con el control;

La Figura 4 proporciona la Tabla 12 que muestra el efecto de una dieta que imita el ayuno sobre la densidad mineral ósea. La densidad mineral ósea [en mg de hidroxiapatita (HA)/cm<sup>3</sup>] del hueso femoral se analizó mediante escaneos por tomografía computarizada (CT) de rayos X en animales alimentados con control a los 12 y 28 meses de edad, así como 7 días después de la realimentación de ratones de la cohorte de FMD in vivo a los 28 meses de edad (FMD-realimentados). Se observó una reducción en la densidad mineral ósea en ratones C57BL/6 de 12 a 28 meses de edad. Sin embargo, los ratones alimentados con la dieta FMD a partir de los 16.5 meses de edad mostraron una pérdida significativamente reducida de densidad mineral ósea en comparación con sus homólogos de la misma edad alimentados ad lib. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. ^ p < 0.001 en comparación con el grupo de mediana edad. \* p < 0.05 en comparación con animales viejos;

La Figura 5 proporciona la Tabla 13 e imágenes que muestran el efecto de una dieta que imita el ayuno sobre la regeneración del hígado. En comparación con los ratones de 20 a 22.5 meses de edad del control alimentado ad lib, los animales alimentados con la dieta experimental FMD a partir de los 16.5 meses de edad (= 7-11 ciclos de FMD)

habían reducido significativamente el peso del hígado y habían perdido aproximadamente el 35 % de la masa original del hígado al final del régimen de FMD. El nivel de alanina aminotransferasa (ALT), un marcador de diagnóstico clínico para la evaluación de la lesión hepatocelular y la salud del hígado, se elevó al final del régimen de FMD, pero volvió a los niveles normales a los 7 días de la realimentación. El aumento de ALT es consistente con

5 la observación de que FMD provocó que los hepatocitos se volvieran atróficos (B, asteriscos). Sin embargo, tras la realimentación, el peso del hígado vuelve a ser, e incluso supera (+10 %), el peso normal. La tinción con H&E hepático del grupo control (A) y del grupo FMD 24 horas después de la realimentación (B) mostró la infiltración de células desorganizadas (flecha) alrededor de la vena, lo que indica regeneración hepática y repoblación con hepatocitos "jóvenes" inmediatamente después de la realimentación. Todos los datos se presentan como media ± SEM. \*\* p < 0.01 en comparación con el control;

10 La Figura 6 proporciona la Tabla 14 y gráficos que muestran ciclos de inanición a corto plazo (STS) o una dieta que imita el ayuno que estimula las células madre/progenitoras en ratones y sujetos humanos. La frecuencia de células madre hematopoyéticas/progenitoras (HSPC, A) y células madre endoteliales y mesenquimales no hematopoyéticas/progenitoras (MSC/EPC, B) que residen en la médula ósea aumenta después de ciclos repetidos de STS o FMD en ratones. Las HSPC (Lin-Sca-1+C-kit+) son células precursoras multipotentes que constituyen todos los linajes de células sanguíneas. MSC/EPC (Lin-Sca-1+CD45-) son células precursoras multipotentes que pueden diferenciarse en tejidos conectivos específicos. De manera similar, aumenta la frecuencia de células HSPC (C, Lin-CD184+CD45+) y MSC/EPC (D, Lin-CD184+CD45-) que circulan en la sangre periférica humana después de los ciclos de FMD. Los datos en las tablas se presentaron como media ± SD y los de las cifras se presentaron como media ± SEM.:

15 La Figura 7 proporciona la Tabla 15 que muestra que los ciclos de ayuno mejoran la regeneración hematopoyética en ratones y sujetos humanos después de la mielosupresión inducida por quimioterapia. Se muestra el perfil hematológico de ratones y sujetos humanos después de ciclos de tratamientos de quimioterapia con o sin ayuno prequimio. Los recuentos absolutos de glóbulos blancos (WBC) y los recuentos de linfocitos se midieron con un hematoanalizador automático. La proporción linfoide-mieloide (L/M), un indicador de la homeostasis del sistema inmunológico, se calculó como el número total de linfocitos/número de células mieloides por individuo. En ratones y humanos, el tratamiento con quimioterapia redujo el número de glóbulos blancos, linfocitos y la proporción L/M. La combinación de ayuno antes de la quimioterapia mejoró estos efectos y mantuvo todos los parámetros medidos en niveles normales. Todos los datos presentados como media ± SEM;

20 La Figura 8 proporciona la Tabla 16 que muestra los ciclos de una dieta que imita el ayuno que mejoran la regeneración hematopoyética en ratones y sujetos humanos y retrasan la mielodepresión dependiente de la edad. La proporción linfoide-mieloide (L/M), un indicador de la homeostasis del sistema inmunológico, disminuye con la edad en ratones y sujetos humanos. En ratones, el inicio de la alimentación FMD a la edad de 10 meses retrasó los efectos mielodepresores y no se pudo medir una reducción significativa dependiente de la edad. En humanos, un ciclo de FMD restableció la proporción L/M en diversos grupos de edad. La proporción L/M de referencia para animales jóvenes y humanos se muestra en rojo negrita. Todos los datos se presentaron como media ± SEM;

25 La Figura 9 ilustra el número aumentado de células madre hematopoyéticas (HSPC) y la frecuencia de células madre endoteliales y mesenquimales no hematopoyéticas/progenitoras (MSC/EPC) en ratones con anulación del receptor de la hormona del crecimiento (GHRKO) y por inanición a corto plazo. (A) Células madre hematopoyéticas (HSC, Lin-Sca-1+C-kit+) en ratones de tipo salvaje (compañero de camada, LM) y con ratones con anulación del receptor de la hormona del crecimiento (GHRKO) con deficiencia de GHR/IGF-1. (B) 6 ciclos de tratamiento de quimioterapia con ciclofosfamida (CP) no tuvieron ningún efecto sobre la frecuencia de MSC/EPC (Lin-Sca-1+CD45-) en ratones (la línea discontinua indica el nivel en animales no tratados). Cuando se combina con STS, la frecuencia de MSC/EPC (Lin-Sca-1+CD45-) se elevó significativamente. (C) De manera similar, los ratones GHRKO tenían una frecuencia elevada de MSC/EPC cuando se trataba con CP en comparación con sus compañeros de camada de tipo salvaje. Esto sugiere que la deficiencia de GHR/IGF-1 puede imitar los efectos de STS para estimular las células madre/progenitoras derivadas de la médula ósea;

30 La Figura 10 ilustra la inhibición de la señalización de PKA que imita la inanición a corto plazo para aumentar las células madre/progenitoras derivadas de la médula ósea y estimular la reconstitución hematopoyética. (A) Las células madre hematopoyéticas (HSPC, Lin-Sca-1+C-kit+) y (B) MSC/EPC (Lin-Sca-1+CD45-) en las células de médula ósea explantadas se incubaron en medio de cultivo estándar complementado con suero al 10 % derivado de ratones de control o STS (48 horas) durante 24 horas. El suero de ratones en ayunas aumentó significativamente el número de HSPC y MSC/EPC. (C y D) El tratamiento con ARNsi de PKACα dio como resultado un aumento similar e indica que la reducción en la señalización de PKA imita el ayuno y estimula las células madre/progenitoras derivadas de la médula ósea. (E y F) Se realizó un ensayo de repoblación competitiva para probar la capacidad de reconstitución de sangre de las HSPC in vivo. Se trasplantaron células de médula ósea recolectadas de ratones alimentados ad libitum (E, Ctrl) y ratones en ayunas durante 48 horas (E, STS) a ratones receptores inmunodeprimidos. Las células sanguíneas regeneradas por las HSPC del donante en proporción a las de las células competidoras se midieron como el % de injerto de células derivadas del donante. Similar a la de las células de médula ósea de ratones en ayunas (E), la capacidad de reconstitución de células de médula ósea tratadas con ARNsi de PKA mejoró significativamente (F);

La Figura 11 proporciona la Tabla 17 y gráficos que muestran los efectos de una dieta que imita el ayuno en el cerebro y las funciones cognitivas. El índice de proliferación y la neurogénesis adulta en ratones se evaluó en función de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) que se inició 4 días antes del ciclo 12 de la dieta FMD y se comparó con controles alimentados ad lib de la misma edad (23 meses). Las células positivas para BrdU están elevadas en la zona subgranular. Se realizó tinción con DCX+ para medir las neuronas inmaduras en la circunvolución dentada. En el grupo de FMD, el 17.6 % de las células que retienen BrdU también fueron positivas para DCX en comparación con 3.1% en los controles, lo que indica que el grupo de FMD tuvo un aumento en las células precursoras neurales comprometidas con el linaje neuronal. Todos los datos se presentaron como media ± SEM. \* p < 0.05 en comparación con ratones alimentados ad lib. La neurogénesis adulta se ha relacionado con las habilidades de coordinación motora, reconocimiento a corto plazo y rendimiento del reconocimiento espacial a largo plazo en ratones de edad avanzada. Para probar la coordinación motora y el aprendizaje de habilidades motoras, se probaron ratones de la cohorte de control y FMD con la varilla giratoria aceleradora (A). La mejor calificación (en segundos) de 6 sesiones de prueba mejoró significativamente para los ratones de la cohorte de FMD en comparación con los ratones alimentados ad lib a los 23 meses de edad. El reconocimiento espacial y la memoria a corto plazo se evaluaron con la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (B) y el laberinto en Y (C). La prueba de comportamiento de reconocimiento de objetos nuevos evalúa la memoria dependiente del contexto y se calcula como un índice de reconocimiento definido como la proporción de tiempo (en segundos) dedicado con un objeto familiar y un objeto nuevo. Durante la fase de ajuste, dos objetos idénticos se colocan dentro de una jaula rectangular y se registró el tiempo dedicado a explorar ambos objetos. Después de este período de ajuste, un objeto fue reemplazado por un objeto nuevo y se registró el tiempo dedicado a explorar ambos objetos (B). Los ratones de la cohorte de FMD se desempeñaron significativamente mejor en esta prueba, lo que indica una mejor memoria a corto plazo relacionada con el objeto. (C) Se investigó la función de la memoria de trabajo con base en el comportamiento de alternancia espontánea (SAB) en un laberinto en Y. Los ratones alimentados con FMD se desempeñaron en esta prueba significativamente mejor que los ratones alimentados ad lib. (D-H) Se probó el aprendizaje espacial con el laberinto de Barnes a los 23 meses de edad para los animales en los grupos de control y FMD. Se registró el número de errores (D, definido como pinchazos en la nariz y desviaciones de la cabeza sobre cualquier agujero de objetivo falso), desviaciones de la caja de escape (E, cuántos agujeros lejos de la caja de escape fue el primer error), latencia (F, el tiempo que le tomó al ratón para entrar en la caja de escape) y la tasa de éxito (G, 100%, encontrar una caja de escape en 2 minutos o 0 %, no encontrar la caja de escape en 2 minutos). La retención de memoria se evaluó probando cada ratón el día 15 y se promediaron las mediciones de dos pruebas para obtener el valor de cada ratón. (H) Las estrategias de búsqueda se clasificaron como aleatorias (búsquedas de agujeros localizadas separadas por cruces a través del centro del laberinto), en serie (búsquedas sistemáticas de agujeros en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario a las agujas del reloj) o espaciales (navegar directamente a la caja de escape con calificaciones de error y desviación de no más de 3). Los ratones de la cohorte alimentados con FMD mostraron estrategias de búsqueda superiores y una mejor retención de su caja de escape el día 15, demostrando así una mejora de las capacidades cognitivas en el aprendizaje motor y la memoria a corto y largo plazo dependiente del hipocampo. La barra en A-H representa la media. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01, en comparación con ratones alimentados ad lib.

La Figura 12 proporciona la Tabla 18 que muestra el resumen de Calorías de la dieta que imita el ayuno ajustada a sujetos humanos. La dieta que imita el ayuno (FMD), Prolon, induce una respuesta tipo ayuno mientras maximiza la nutrición. Se muestran las calorías consumidas para cada uno de los 5 días de la dieta, así como las kcal ajustadas por libra y kilogramo de peso corporal. La reducción en las calorías consumidas durante el régimen dietético de 5 días ( $\Delta 5$  días) se muestra como 1) a base de una dieta de 2,000 calorías por día, o 2) a base de dietas de 2,800, 2,400 y 2,000 calorías para el peso de la persona  $\geq$  200, 150-200 y  $\leq$  150 lbs, respectivamente;

La Figura 13 proporciona la Tabla 19 que muestra el contenido de macronutrientes definido para cada día de dieta ajustado a un sujeto humano de 180 a 200 libras. El contenido de macronutrientes para cada día del régimen de 5 días de FMD a base de una persona promedio de 180-200 libras. La ingesta calórica el día 1 de la dieta se reduce menos en comparación con los días siguientes (2-5) para permitir que el cuerpo se adapte al consumo bajo de calorías. Se presenta el % de calorías aportadas por grasas, carbohidrato (por azúcar en detalle) y proteína para cada día del régimen Prolon;

La Figura 14 proporciona la Tabla 20 que muestra el contenido de micronutrientes definido para cada día de dieta ajustado a un sujeto humano de 180-200 libras en una variación de la invención. El contenido de micronutrientes para cada día del régimen de 5 días de FMD con base en una persona promedio de 180-200 libras. El porcentaje del valor diario (% DV) se calcula a base de una dieta de 2,000 calorías. \* para algunos de los micronutrientes, la DV no está definida; los valores mostrados se basan en la ingesta diaria de referencia (RDI);

La Figura 15 proporciona perfiles de ingesta de calorías y peso corporal. (A) Diagrama que muestra los regímenes dietéticos de control y PRC utilizados en el estudio. (B, C) Se midieron los pesos corporales de los ratones y se representaron como porcentaje del peso inicial calificado el día cero (13-15 animales por grupo). Los ratones se pesaron diariamente las dos primeras semanas (B) y semanalmente durante las 16 semanas restantes (C). (B) Durante las dos primeras semanas de intervención dietética, los ratones WT y 3xTg-AD sometidos al régimen de PRC mostraron un perfil de peso corporal significativamente diferente en comparación con los controles

- correspondientes ( $*** = p < 0.001$ ). (C) El perfil de peso corporal diferente entre los grupos WT y 3xTg-AD PRC y los controles correspondientes se mantuvo durante las 18 semanas completas de tratamiento dietético ( $*** = p < 0.001$ ). Además, encontramos una diferencia significativa entre los perfiles de peso corporal de los grupos de control 3xTg-AD y PRC y los animales WT correspondientes ( $+ = p < 0.05$ , control 3xTg-AD vs. control WT y 3xTg-AD PRC vs. WT PRC). (D, E) La ingesta de calorías normalizada para gramos de peso corporal se calificó diariamente al comienzo (semanas 1 y 2, D) y al final del tratamiento dietético (semanas 17-18, E) y se expresó como porcentaje calculado para las dos semanas combinadas de dieta PR y realimentación con dieta normal;
- La Figura 16 ilustra que el régimen de PRC no modifica los niveles de glucosa en sangre, sino que modula los IGF-1 e IGFBP circulantes. (A) Los niveles de glucosa en sangre se expresan como concentración (mg/dL). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (6-13 muestras por grupo). (B-D) Los niveles de IGF-1 e IGFBP-1/3 en suero de ratón se expresan como concentración (ng/mL) (3-7 muestras por grupo). (B) Los ratones WT sacrificados al final del ciclo de la dieta PR mostraron niveles de IGF-1 significativamente más bajos en comparación con el grupo de control correspondiente ( $* = p < 0.05$ ). Los ratones 3xTg-AD mostraron una reducción significativa en los niveles de IGF-1 no solo durante el ciclo de la dieta PR sino también durante la realimentación con la dieta normal ( $*** = p < 0.001$ ). Detectamos una diferencia significativa entre el control WT y los grupos de control 3xTg-AD ( $## = p < 0.01$ ). (C) Los ratones 3xTg-AD mostraron una reducción significativa en los niveles de IGFBP-3 no solo cuando se alimentaron con la dieta PR ( $*** = p < 0.001$ ) sino también durante el ciclo de realimentación ( $** = p < 0.01$ ). (D) Determinamos un aumento significativo en los niveles de IGFBP-1 al final del ciclo de PR en ratones 3xTg-AD ( $** = p < 0.01$ );
- La Figura 17 ilustra que el régimen PRC alivia los cambios de comportamiento dependientes de la edad en ratones 3xTg-AD. (A y B) Se muestra el porcentaje de SAB (comportamiento de alternancia espontánea), obtenido realizando pruebas a los ratones con la prueba del laberinto en Y a los 8-9 meses de edad, antes de cualquier tratamiento dietético (A), o a los 12.5-13.5 meses de edad, después de 18 semanas de régimen de PRC (B). (A) Los ratones 3xTg-AD ya mostraron deterioro de la memoria de trabajo con un desempeño significativamente peor que el grupo de control WT ( $* = p < 0.05$ , 13-14 ratones por grupo). (B) Solo el grupo de control 3xTg-AD se desempeñó peor que los grupos WT ( $* = p < 0.05$ , en comparación con los grupos WT, 13-14 ratones por grupo). (C) Se utilizó la prueba NOR para calcular el RI (índice de reconocimiento). El RI calificado para los animales de control 3xTg-AD fue significativamente menor que los valores calculados para los grupos WT ( $* = p < 0.05$ , en comparación con los grupos WT, 12-14 ratones por grupo). (D) Se utilizó la prueba EPM para calificar el tiempo que los roedores pasaron en brazos abiertos. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (13-14 ratones por grupo);
- La Figura 18 ilustra que el régimen PRC no ralentiza la acumulación de A $\beta$  en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Se muestran imágenes representativas que muestran la inmunorreactividad de A $\beta$  en el subículo o en las regiones del hipocampo CA1 de los ratones control WT de 12.5 a 13.5 meses de edad, control 3xTg-AD y PRC 3xTg-AD. Las placas de A $\beta$  se indican mediante flechas. La cuantificación de la acumulación de A $\beta$  mediante los valores de carga en las regiones CA1 del subículo e hipocampo se muestra en (A) y (B) respectivamente. El número y tamaño de las placas de A $\beta$  se muestran en (C) y (D). (10-12 (A, B, C) y 5-7 (D) muestras por grupo);
- La Figura 19 ilustra que el régimen PRC reduce las neuronas positivas AT8 en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Se muestran imágenes representativas que muestran secciones de hipocampo con inmunotinción con anticuerpo AT8, que reconoce tau fosforilada anormalmente, de ratones control 3xTg-AD, 3xTg-AD PRC y WT de 12.5-13.5 meses de edad. Se muestra la cuantificación del número de células inmunorreactivas a AT8 ( $* = p < 0.05$ , 3xTg-AD PRC frente a 3xTg-AD Control, 10-12 muestras por grupo);
- La Figura 20 ilustra que el régimen PRC no modula el número total ni las etapas de activación de las células CD11b-ir en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Se muestran imágenes representativas que muestran microglía inmunorreactiva CD11b (CD11b-ir) en secciones de hipocampo de ratones de control WT, 3xTg-AD control y 3xTg-AD PRC de 12.5 a 13.5 meses de edad. La cuantificación del número total de células CD11b-ir en los grupos experimentales descritos se muestra en la Figura 20A. El porcentaje de diferentes etapas de activación de la microglía (de 1 a 4) se representa en la Figura 20B (Para todas las figuras:  $*** = p < 0.001$  en comparación con WT, 5-10 muestras por grupo);
- Figura 21. Se midió la ingesta de alimentos y se utilizó para calcular la ingesta de calorías. La ingesta de calorías normalizada para gramos de peso corporal se puntuó diariamente al comienzo (semanas 1 y 2, A) y al final del tratamiento dietético (semanas 17-18, B) y se expresó como porcentaje calculado para la primera semana (días 1-7, dieta PR) o la segunda semana (días 8-14, realimentación con dieta normal) del ciclo de la dieta en comparación con los valores de las dietas de control calificados durante los mismos períodos ( $* = p < 0.05$ ,  $** = p < 0.01$ ,  $*** = p < 0.001$ );
- Figura 22. (A) Se muestra SAB (comportamiento de alternancia espontánea), obtenido realizando pruebas a los ratones con laberinto en Y después de 12 semanas de régimen PRC. Los grupos 3xTg-AD se desempeñaron peor que el grupo de control WT ( $* = p < 0.05$ , 13-14 ratones por grupo). (B) Se muestra el tiempo pasado en brazos

abiertos calificado haciendo pruebas a los ratones con EPM a los 8-9 meses de edad, antes de cualquier tratamiento dietético. No detectamos diferencias significativas en el parámetro calificado (13-14 ratones por grupo); y

Figura 23. Después de 18 semanas de intervención dietética, se realizaron pruebas a los ratones en las pruebas de laberinto en Y y NOR. (A) Se muestra el número de entradas en brazos calificadas durante la tarea de laberinto en Y. No detectamos diferencias significativas entre los grupos WT y 3xTg-AD (13-14 ratones por grupo). (B) En la prueba 1 de la prueba NOR, se permitió a los roedores explorar una caja que contenía dos objetos idénticos (objeto A y objeto B) y se registró el tiempo dedicado a explorarlos. No se encontró diferencia significativa en el tiempo que los animales dedicaron a explorar los diferentes objetos (prueba t: tiempo con objeto A frente a tiempo con objeto B, 12-14 ratones por grupo).

#### Descripción detallada

Se hará ahora referencia en detalle a las realizaciones actualmente preferidas de la presente invención. Las figuras no están necesariamente a escala. Las realizaciones divulgadas son simplemente de ejemplo de la invención que pueden realizarse de diversas formas alternativas. Por lo tanto, los detalles específicos divulgados aquí no deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como una base representativa para cualquier aspecto de la invención y/o como una base representativa para enseñar a una persona experimentada en la técnica a emplear de diversas formas la presente invención.

Excepto en los ejemplos, o donde se indique expresamente de otro modo, todas las cantidades numéricas en esta descripción que indiquen cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse como modificadas por la palabra "aproximadamente" al describir el alcance más amplio de la invención. Generalmente se prefiere la práctica dentro de los límites numéricos establecidos. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario: los valores de porcentaje, "partes de" y de proporción son en peso; la descripción de un grupo o clase de materiales como adecuado o preferido para un propósito dado en conexión con la invención implica que las mezclas de cualquiera dos o más de los miembros del grupo o clase son igualmente adecuadas o preferidas; la descripción de constituyentes en términos químicos se refiere a los constituyentes en el momento de la adición a cualquier combinación especificada en la descripción, y no excluye necesariamente las interacciones químicas entre los constituyentes de una mezcla una vez mezclada; la primera definición de un acrónimo u otra abreviatura se aplica a todos los usos posteriores aquí de la misma abreviatura y se aplica mutatis mutandis a las variaciones gramaticales normales de la abreviatura definida inicialmente; y, a menos que se indique expresamente lo contrario, la medición de una propiedad se determina mediante la misma técnica a la que se hizo referencia anteriormente o posteriormente para la misma propiedad.

Esta invención no se limita a las realizaciones y métodos específicos descritos a continuación, ya que los componentes y/o condiciones específicas pueden, por supuesto, variar. Además, la terminología utilizada aquí se usa únicamente con el propósito de describir realizaciones particulares de la presente invención y no pretende ser limitante de ninguna manera.

Como se usa en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un/una", y "el/la" comprenden referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, se pretende que la referencia a un componente en el singular comprenda una pluralidad de componentes.

El término "aminoácido esencial" se refiere a aminoácidos que no pueden ser sintetizados por un organismo. En humanos, los aminoácidos esenciales incluyen isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina. Además, los siguientes aminoácidos también son esenciales en humanos bajo ciertas condiciones: histidina, tirosina y selenocisteína.

Los términos "kilocaloría" (kcal) y "Caloría" se refieren a la caloría del alimento. El término "caloría" se refiere a la llamada caloría pequeña.

El término "sujeto" se refiere a un humano o animal, incluidos todos los mamíferos como primates (en particular primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejo y vaca.

Las realizaciones de la presente invención se relacionan con la regeneración de tejidos y/u órganos y, en particular, a la regeneración a base de células madre. Como se detallará a continuación aquí, y sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que la presente invención en una o más realizaciones puede potenciar la disponibilidad y funcionalidad de las células regenerativas, incluidas células madre y células progenitoras, y promueve regeneración y reconstitución de tejidos/órganos y en particular, células madre/progenitoras hematopoyéticas y otras células inmunes. En una variación, las células regenerativas incluyen células cerebrales, células musculares, células hepáticas y células derivadas de las mismas. La inhibición del receptor de la hormona del crecimiento (GHR), factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-I), receptor del factor 1 de crecimiento tipo insulina (IGF-1) (IGF-IR) y proteína quinasa A (PKA) potencian la disponibilidad y funcionalidad de células regenerativas en mamíferos. Dicha inhibición se logra mediante el silenciamiento de genes, inhibición farmacéutica y la administración de protocolos dietéticos bajos en calorías como se establece a continuación. Este tejido y/o regeneración es aplicable tanto a la regeneración

residencial, en donde el donante a y el receptor de las células regenerativas son el mismo individuo, y la regeneración del trasplante, donde el donante a y el receptor de las células regenerativas son dos individuos diferentes. A este respecto, la presente invención es particularmente ventajosa al efectuar la regeneración residencial en una metodología relativamente menos ofensiva, que puede ser más rentable y reducir la aparición de ciertos problemas, incluidas las dificultades de emparejamiento donante-receptor.

Se proporciona un método para modificar la dieta de un sujeto. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto que necesita una modificación de la dieta. Se administra una primera dieta al sujeto por un primer periodo de tiempo. Como se usa aquí, a veces la primera dieta se denomina dieta que imita el ayuno (FMD). En un refinamiento, la primera dieta proporciona de 4.5 a 7 kilocalorías por libra de sujeto durante el primer día (día 1) y luego de 3 a 5 kilocalorías por libra de sujeto por día durante un segundo a quinto día (días 2-5) de la primera dieta. Se administra una segunda dieta al sujeto durante un segundo período de tiempo. En un refinamiento, la segunda dieta proporciona un consumo total de calorías que está dentro del 20 por ciento del consumo normal de calorías de un sujeto durante 25 a 26 días (por ejemplo, inmediatamente) después de la primera dieta. En un refinamiento, el sujeto necesita perder peso con el método que da como resultado la pérdida de peso. En otro refinamiento, el sujeto necesita regeneración de tejido con el método resultante es tal regeneración de tejido. De manera característica, se observa que el nivel de IGF-I disminuye y el nivel de IGFBP1 aumenta. En un refinamiento, el método puede repetirse de 1 a 5 veces. En otro refinamiento, el método puede repetirse de 2 a 3 veces. En otro refinamiento más, el método puede repetirse durante un período de años o durante toda la vida del sujeto. En otro refinamiento, la combinación de la primera dieta y la segunda dieta proporciona al sujeto un número total de calorías dentro del 10 por ciento de la ingesta calórica normal del sujeto. En otro refinamiento, la combinación de la primera dieta y la segunda dieta proporciona al sujeto un número total de calorías dentro del 5 por ciento de la ingesta calórica normal del sujeto. En otro refinamiento más, la combinación de la primera dieta y la segunda dieta proporciona al sujeto un número total de calorías dentro del 1 por ciento de la ingesta calórica normal del sujeto.

Un sujeto que necesite una modificación de la dieta puede incluir un sujeto que requiera una reducción de peso. En otras variaciones, un sujeto que necesita una modificación de la dieta incluye sujetos que necesitan regeneración de células madre, células progenitoras y células madre de tipo embrionario; sujetos que necesitan regeneración de WBC y una proporción equilibrada linfoide/mieloide; sujetos que necesitan reversión de la inmunosupresión, inmunodeficiencia e inmunodepresión; sujetos que necesitan neurogénesis y mejora del rendimiento cognitivo, ambos relacionados con la memoria a corto plazo, memoria a largo plazo y coordinación motora en mamíferos jóvenes y viejos; sujetos que necesitan revertir el deterioro cognitivo; sujetos que tienen cáncer; sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, dermatitis cutánea); sujetos que tienen pérdida de densidad ósea (por ejemplo, osteoporosis); y sujetos que tienen daño hepático. Ejemplos de tales síntomas de la enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a, deterioro del aprendizaje y memoria, dificultades del habla, agnosia, apraxia, parafasias, pérdida de la memoria a corto plazo y similares. Ejemplos de tales síntomas de inmunosupresión, inmunodeficiencia e inmunodepresión incluyen, pero no se limitan a, susceptibilidad a infecciones y susceptibilidad al cáncer. Ejemplos de tales síntomas de enfermedad inflamatoria incluyen, pero no se limitan a, inflamación, hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función. Ejemplos de tales síntomas de daño hepático incluyen, pero no se limitan a, elevación de ALT, elevación de ALP, bilirrubina, picazón, ictericia, neoplasma, necrosis hepatocelular, necrosis zonal y similares.

En un refinamiento, el método reduce el riesgo de pérdida de densidad ósea o reduce un síntoma de pérdida ósea. En otro ejemplo más, el método reduce el riesgo de daño hepático o alivia un síntoma de daño hepático. En un refinamiento adicional, el método con respecto a la evaluación del daño hepático incluye además una etapa de monitorización de los niveles de marcadores hepáticos. En particular, los niveles de aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) se miden en un análisis de sangre como es conocido por una persona experimentada en la técnica.

En otro refinamiento, el sujeto requiere la regeneración de células madre, células progenitoras o células madre de tipo embrionario. En otro refinamiento más, el sujeto requiere la regeneración de glóbulos blancos (WBC) y/o una proporción equilibrada linfoide/mieloide análoga a la observada en mamíferos/humanos jóvenes y sanos. En otro refinamiento más, el sujeto tiene riesgo de inmunosupresión, inmunodeficiencia e inmunodepresión o el sujeto tiene una de estas afecciones y el método alivia al menos uno de sus síntomas.

En otro refinamiento más, el sujeto necesita neurogénesis y mejora del rendimiento cognitivo, ambos relacionados con la memoria a corto plazo, memoria a largo plazo y coordinación motora en mamíferos tanto jóvenes como viejos. Los sujetos en esta categoría incluyen aquellos que necesitan revertir el deterioro cognitivo. Los ejemplos de tales afecciones cognitivas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer y afecciones relacionadas.

En una variación, el programa de dieta que imita el ayuno (FMD) implica sustituir completamente la dieta de un sujeto durante 5 días. Durante este período de 5 días, los sujetos consumen mucha agua. Para sujetos sanos de peso normal (índice de masa corporal o BMI entre 18.5-25), la dieta se consume una vez al mes (5 días en la dieta y 25-26 días en su dieta normal) durante los primeros 3 meses y cada 3 meses a partir de entonces (5 días cada 3 meses). Se mide el peso del sujeto y el sujeto debe recuperar al menos el 95 % del peso perdido durante la dieta antes de que comience el siguiente ciclo. Los sujetos con un BMI de menos de 18.5 no deben realizar la FMD a

menos que lo recomiende y supervise un médico. El mismo régimen (una vez al mes durante 3 meses seguido de una vez cada 3 meses a partir de entonces) se puede adoptar para el tratamiento, o en apoyo del tratamiento, de todas las afecciones presentadas en las solicitudes de patente.

- 5 Un refinamiento de FMD para sujetos con sobrepeso (BMI: 25-30), implica seguir la dieta una vez al mes o tan frecuentemente como dos veces al mes hasta alcanzar el peso ideal, bajo supervisión médica. En un refinamiento adicional de FMD para sujetos obesos (BMI > 30), los médicos recomiendan el consumo de la dieta con una frecuencia de una vez a la semana (5 días de dieta, 2 días de descanso) con la supervisión médica adecuada.
- 10 Las pautas de consumo para FMD incluyen información nutricional relativa a calorías, macronutrientes y micronutrientes. Las calorías se consumen de acuerdo con el peso corporal del usuario. El consumo total de calorías es de 4.5-7 calorías por libra (o de 10 a 16 calorías por kilogramo) para el día 1 y de 3-5 calorías por libra (o de 7-11 calorías por kilogramo) para los días 2 a 5. Las figuras 12-14 proporcionan listados de los nutrientes del día uno al día cinco. Además de los macronutrientes, la dieta debe contener menos de 30 g de azúcar en el día 1 y menos de 20 g de azúcar en los días 2-5. La dieta debe contener menos de 28 g de proteínas en el día 1 y menos de 18 g de proteínas en los días 2-5. La dieta debe contener entre 20 y 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el día 1 y 10-15 gramos de grasas monoinsaturadas en los días 2-5. La dieta debe contener entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el día 1 y 3-5 gramos de grasas poliinsaturadas en los días 2-5. La dieta debe contener menos de 12 g de grasas saturadas en el día 1 y menos de 6 gramos de grasas saturadas en los días 2-5. Por lo general, las grasas de todos los días se derivan de una combinación de lo siguiente: almendras, nueces de macadamia, pacana, coco, aceite de coco, aceite de oliva y linaza. En un refinamiento, la dieta para FMD incluye más del 50 % del valor diario recomendado de fibra dietética todos los días. En el refinamiento adicional, la cantidad de fibra dietética es superior a 15 gramos por día durante los cinco días. La dieta debe contener 12-25 gramos de glicerol por día en los días 2-5. En un refinamiento, el glicerol se proporciona a 0.1 gramos por libra de peso corporal/día.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- En una variación, la FMD incluye los siguientes micronutrientes (al menos 95 % de origen no animal): más de 5.000 UI de vitamina A por día (días 1-5); 60-240 mg de vitamina C por día (días 1-5); 400-800 mg de calcio por día (días 1-5); 7.2-14.4 mg de hierro por día (días 1-5); 200-400 mg de magnesio por día (días 1-5); 1-2 mg de cobre por día (días 1-5); 1-2 mg de manganeso por día (días 1-5); 3.5-7 mcg de selenio por día (días 1-5); 2-4 mg de vitamina B1 por día (días 1-5); 2-4 mg de vitamina B2 por día (días 1-5); 20-30 mg de vitamina B3 por día (días 1-5); 1-1.5 mg de vitamina B5 por día (días 1-5); 2-4 mg de vitamina B6 por día (días 1-5); 240-480 mcg de vitamina B9 por día (días 1-5); 600-1000 UI de vitamina D por día (días 1-5); 14-30 mg de vitamina E por día (días 1-5); más de 80 mcg de vitamina K por día (días 1-5); se proporcionan 16-25 mcg de vitamina B12 durante todo el período de 5 días; se proporcionan 600 mg de ácido docosahexaenoico (DHA, derivado de algas) durante todo el período de 5 días. La dieta FMD proporciona un alto contenido de micronutrientes principalmente (es decir, más del 50 por ciento en peso) de fuentes naturales que incluyen: col rizada, anacardos, pimiento amarillo, cebolla, zumo de limón, levadura, cúrcuma, champiñones, zanahoria, aceite de oliva, zumo de remolacha, espinaca, tomate, col, ortiga, tomillo, sal, pimienta, vitamina B12 (cianocobalamina), remolacha, calabaza cidra, col, tomate, orégano, zumo de tomate, zumo de naranja, apio, lechuga romana, espinaca, comino, cáscara de naranja, ácido cítrico, nuez moscada, clavos y combinaciones de los mismos. La Tabla 1 proporciona un ejemplo de suplementos de micronutrientes adicionales que se pueden proporcionar en la dieta FMD:

Tabla 1. Suplementación de micronutrientes

	Suplemento	Fórmula	Cantidad	Intervalo de cantidad	Unidad
Vit A			1250 IU	900-1600	IU
Vit C	Acido ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	15.0000	10-20	mg
Ca	Carbonato de calcio	CaCO <sub>3</sub>	80.0000	60-100	mg
Fe	Fumarato ferroso	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> FeO <sub>4</sub>	4.5000	3-6	mg
Vit D3	Colecalciferol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	0.0025	0.001-0.005	mg
Vit E	Acetato dl-alfa tocoferilo	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	5.0000	3-7	mg
Vit K	Fitonadiona		0.0200	0.1-0.04	mg
Vit B1	Tiamina Mononitrato	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S	0.3750	0.15-0.5	mg
Vit B2	Riboflavina E101	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0.4250	0.2-0.6	mg
Vit B3	Niacinamida	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	5.0000	3-7	mg
Vit B5	Pantotenato de calcio	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	2.5000	1.5-4.0	mg
Vit B6	Clorhidrato de piridoxina	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl	0.5000	0.3-0.7	mg

(continuación)

	Suplemento	Fórmula	Cantidad	Intervalo de cantidad	Unidad
Vit B7	Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0.0150	0.01-0.02	mg
Vit B9	Acido fólico	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	0.1000	0.07-0.14	mg
Vit B12	Cianocobalamina	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	0.0015	0.001-0.002	mg
Cr	Picolinato de cromo	Cr(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	0.0174	0.014-0.022	mg
Cu	Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub>	0.2500	0.18-0.32	mg
I	Yoduro de potasio	KI	0.0375	0.03-0.045	mg
Mg	Oxido de magnesio	MgO	26.0000	20-32	mg
Mn	Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub>	0.5000	0.3-0.7	mg
Mo	Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.0188	0.014-0.023	mg
Se	Selenato de sodio	Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	0.0175	0.014-0.023	mg
Zn	Oxido de zinc	ZnO	3.7500	3-5	mg

Un paquete de dieta para usar en la presente invención incluye un primer conjunto de raciones para una primera dieta que se administrará por un primer periodo de tiempo a un sujeto, proporcionando la primera dieta de 4.5 a 7 kilocalorías por libra de sujeto durante el primer día y 3 a 5 kilocalorías por libra de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta. El paquete dietético incluye raciones que aportan menos de 30 g de azúcar en el primer día; menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día; menos de 28 g de proteínas en el primer día; menos de 18 g de proteínas en el segundo al quinto día; 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día; 10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día; entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día; 3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día; menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día; menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y 12 a 25 gramos de glicerol por día del segundo al quinto día. En un refinamiento, el paquete de dieta incluye además raciones suficientes para proporcionar los micronutrientes indicados anteriormente. En un refinamiento adicional, el paquete de dieta proporciona instrucciones que proporcionan detalles de los métodos establecidos anteriormente.

Se proporciona un método para inhibir GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto que necesite inhibir GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA y luego inhibir al menos uno de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA. En un refinamiento, se inhiben al menos dos de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA. En otro refinamiento, se inhiben al menos tres de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA. En otra realización más, se inhiben todos los GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA.

Un sujeto que necesita inhibición de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA incluye sujetos que necesitan modificación de la dieta o reducción de peso. De hecho, los protocolos de dieta establecidos anteriormente logran la inhibición de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA. En otras variaciones, un sujeto que necesita inhibición de GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA incluye sujetos que necesitan regeneración de células madre, células progenitoras y células madre de tipo embrionario; sujetos que necesitan regeneración de WBC y una proporción equilibrada linfoide/mieloide; sujetos que necesitan la reversión de la inmunosupresión, inmunodeficiencia e inmunodepresión; sujetos que necesitan neurogénesis y mejora del rendimiento cognitivo, ambos relacionados con la memoria a corto plazo, memoria a largo plazo y coordinación motora en mamíferos jóvenes y viejos; sujetos que necesitan revertir el deterioro cognitivo; sujetos que tienen cáncer; sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, dermatitis cutánea); sujetos que tienen pérdida de densidad ósea (por ejemplo, osteoporosis); y sujetos que tienen daño hepático. Ejemplos de tales síntomas de la enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a, deterioro del aprendizaje y la memoria, dificultades del habla, agnosia, apraxia, parafasias, pérdida de la memoria a corto plazo y similares. Ejemplos de tales síntomas de inmunosupresión, inmunodeficiencia e inmunodepresión incluyen, pero no se limitan a, susceptibilidad a infecciones y susceptibilidad al cáncer. Ejemplos de tales síntomas de enfermedad inflamatoria incluyen, pero no se limitan a, inflamación, hinchazón, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función. Ejemplos de tales síntomas de daño hepático incluyen, pero no se limitan a, elevación de ALT, elevación de ALP, bilirrubina, picazón, ictericia, neoplasia, necrosis hepatocelular, necrosis zonal y similares.

En una variación, la etapa de inhibir GHR, IGF-I, IGF-IR o PKA puede incluir la administración de un pequeño fármaco, antagonista, ARN o ADN inhibidor o anticuerpo al sujeto. En un refinamiento, la etapa de inhibir GHR, IGF-I, IGF-IR y/o PKA incluye administrar una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto. Ejemplos de composiciones inhibidoras del eje GH/IGF-1 adecuadas incluyen antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento, antagonistas del receptor del IGF-I, antagonistas del receptor de la hormona liberadora de GH (GHRH) y combinaciones de estos.

Se proporciona un método para aliviar un síntoma en un sujeto inmunocomprometido. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto que está inmunocomprometido o un sujeto que desea una mejora en su estado inmunológico. Se induce en el sujeto una reducción en la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y/o los niveles de IGF-I. Opcionalmente, el progreso del sujeto se monitoriza midiendo la actividad de PKA y/o el nivel de IGF para

5 verificar que se alcanza el nivel objetivo de cada uno. En un refinamiento, la reducción en la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y/o los niveles de IGF-I se reducen mediante la administración de un protocolo de dieta baja en calorías como se expone a continuación. La publicación WIPO proporciona un protocolo dietético particularmente útil. No. WO2011/050302. En otro refinamiento, la reducción en la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y/o los niveles de IGF-I se reducen mediante la administración de un protocolo de dieta baja en calorías como se expone a continuación.  
10

15 Se proporciona un método para transferir células madre/progenitoras hematopoyéticas a un sujeto. El método incluye una etapa de identificación de un sujeto inmunocomprometido. Se induce una reducción en la actividad de la proteína quinasa A y/o el nivel de IGF-I en un donante como se ha indicado anteriormente. Opcionalmente, las células madre/regeneradoras hematopoyéticas regenerativas se aíslan del donante y luego se injertan en el sujeto inmunocomprometido.

20 Se proporciona un método para promover el crecimiento de células regenerativas. El método incluye una etapa de administrar un protocolo dietético a un sujeto durante un primer período de tiempo y un segundo período de tiempo. Durante el primer período de tiempo, se proporciona al sujeto una dieta reducida en calorías con al menos un 50 por ciento de calorías derivadas de grasa. Durante el segundo período de tiempo, se proporciona al sujeto una segunda dieta reducida en calorías de 900 kcal/día como máximo. La publicación WIPO No. WO2011/050302 proporciona un protocolo dietético particularmente útil, como se establece anteriormente. Opcionalmente, las células regenerativas se aíslan del sujeto y se transfieren a un receptor.

23 Se proporciona un método para promover la regeneración de tejidos en un sujeto. El método puede incluir las etapas de aislar una población de células regenerativas de un donante, teniendo el donante un nivel o actividad de PKA diana en el tejido en el que se desea la regeneración. El donante es pretratado para reducir la actividad de PKA y alcanzar la actividad de PKA diana. En un refinamiento, la población de células regenerativas se administra a una parte del sujeto donde es deseable la regeneración de tejido. En otro refinamiento, el sujeto y el donante son el mismo individuo. En estos casos, la población de células regenerativas puede aislarse de una primera parte del cuerpo del sujeto y luego depositarse en una segunda parte del cuerpo del sujeto diferente de la primera parte del cuerpo. Sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que la regeneración residente con las células regenerativas aisladas de y depositadas en el mismo individuo, proporciona alivio a ciertos problemas tales como los problemas de emparejamiento donante-receptor mencionados aquí en otra parte. En otro refinamiento, el donante y el sujeto son individuos diferentes. La población de células regenerativas que se aíslan incluye al menos una de entre una célula madre y una célula progenitora. Se obtienen ejemplos de células regenerativas de médula ósea, cerebro, hígado y similares. Para obtener la actividad de la PKA diana, el donante puede haber sido pretratado con una composición farmacéutica para reducir la actividad de la PKA para que esté dentro del intervalo de valores predeterminados. Alternativamente, el donante puede haber sido pretratado con un protocolo dietético con componentes provistos de un paquete de dieta para reducir la actividad de la PKA para que esté dentro de un intervalo de valores predeterminado, adaptado de la publicación WIPO No. WO2011/050302. En los casos en los que se utiliza el paquete de dieta, el paquete de dieta incluye componentes para una primera dieta y una segunda dieta. La primera dieta se administra al donante en un primer período de tiempo y la segunda dieta durante un segundo período de tiempo. Característicamente, la primera dieta es diferente en composición que la segunda dieta. En un refinamiento, el paquete de dieta puede incluir componentes para una tercera dieta administrada al donante por un tercer período de tiempo. Normalmente, se mide el peso corporal del donante antes de la segunda dieta. La segunda dieta no puede administrarse hasta que el peso corporal del donante esté dentro de un intervalo de peso predeterminado. Normalmente, el peso corporal del donante se mide antes de la administración de la tercera dieta. La tercera dieta no puede administrarse hasta que el peso corporal del donante esté dentro de un intervalo de peso predeterminado. El intervalo de peso predeterminado puede ser del 70 al 99 por ciento de un peso corporal del donante/sujeto antes de la primera dieta. El primer período de tiempo puede ser de 20 a 120 horas, 20 a 100 horas, 20 a 80 horas, 20 a 70 horas, 20 a 60 horas, 20 a 50 horas, 20 a 40 horas o 20 a 30 horas. En ciertos casos, el primer período de tiempo es de 20 a 28 horas. El segundo período de tiempo puede ser de entre 20 a 120 horas, 30 a 110 horas, 40 a 100 horas, 50 a 90 horas o 60 a 80 horas. En ciertos casos, el segundo período de tiempo es de 68 a 76 horas. La diferencia de tiempo entre el inicio de la primera dieta y el inicio de la segunda dieta suele ser de 1 a 4 semanas. La primera dieta puede administrarse para proporcionar al donante/sujeto como máximo el 50 % de la ingesta calórica normal del sujeto, en donde al menos el 50 % de las kilocalorías se derivan de la grasa. La primera dieta puede administrarse al donante/sujeto con 700 a 1200 kcal/día. La segunda dieta puede administrarse para proporcionar al donante/sujeto una entrada calórica de como máximo 500 kcal/día, 400 kcal/día, 300 kcal/día o 200 kcal/día. La tercera dieta puede administrarse para proporcionar al donante/sujeto más del 50 % de la ingesta calórica normal del donante. La tercera dieta puede administrarse para proporcionar al donante/sujeto uno o más aminoácidos esenciales. En un refinamiento, el tercer período de tiempo puede ser superior a 120 horas.

30

35

40

45

50

55

60

65

Como se expuso anteriormente, las realizaciones de la invención buscan disminuir la actividad de PKA. Se logra una disminución en la actividad de PKA y/o una disminución en el nivel de IGF-I administrando un protocolo de dieta de

privación completa de alimentos (es decir, ayuno o inanición) o la dieta FMD establecida anteriormente. Una forma intensiva pero breve de restricción calórica, puede efectivamente (48 horas en ratones y 120 horas en humanos) alcanzar las condiciones fisiológicas esenciales (por ejemplo, reducción de la glucosa en sangre y del nivel de IGF-I circulante y reducción de la señalización de IGF-I) que pueden ser importantes para promover los efectos

5 regenerativos y un aumento de células madre y/o progenitoras. La condición de ayuno indujo varias poblaciones de células madre con aplicaciones terapéuticas documentadas, incluidas las células madre/progenitoras específicas de tejido adultas multipotentes y las raras células madre pluripotentes tipo fetales/embrionarias. Las condiciones de ayuno revierten la disminución del número de células madre y corrigen el trastorno regenerativo ocurrido sin requisitos especiales para las condiciones iniciales (por ejemplo, edad) y sin comprometer la capacidad regenerativa 10 a largo plazo. Esta alta eficiencia, los amplios efectos sobre las clases de células madre, los bajos requisitos iniciales y la seguridad/beneficios a largo plazo permiten que esta invención se incorpore prácticamente con diversos tipos de terapia, incluidas quimioterapia y radioterapia. Sin necesidad de una metodología invasiva, puede beneficiar la 15 metodología regenerativa convencional en la forma en que estimula directamente las células madre residentes y/o puede cambiar indirectamente los microambientes para promover la regeneración de las células madre trasplantadas en los receptores.

En otra variación, se proporciona una dieta de sustitución a un sujeto para disminuir la actividad de PKA o los niveles 20 de IGF-I. La presente variación es particularmente útil porque un ayuno de 120 horas puede ser difícil de lograr para los sujetos humanos debido al bajo cumplimiento y los efectos secundarios de la desnutrición. La dieta de sustitución de la presente variación maximiza los micronutrientes sin interferir con el efecto beneficioso de la condición de ayuno para promover la regeneración. Las condiciones de ayuno que promueven la regeneración a base de células madre se han logrado mediante ciclos de ayuno/ayuno *in vivo* y parcialmente mediante ii) dietas de sustitución *in vivo* e inhibición *ex vivo* de la señalización de IGF-I o PKA. Para los sujetos humanos, las dietas de sustitución que se establecen a continuación imitan la condición alcanzada por los sujetos humanos en ayunas de 72 a 120 horas, al 25 tiempo que minimizan la desnutrición. Además, la dieta consta de ingredientes que generalmente se consideran seguros (GRAS). La publicación WIPO No. WO2011/050302, como se establece anteriormente, proporciona un protocolo dietético particularmente útil. Debe apreciarse que las dietas de sustitución para sujetos distintos de los seres humanos son análogas a las descritas aquí para humanos. Dichas dietas se ajustan teniendo en cuenta el peso y la ingesta normal de alimentos de los sujetos no humanos.

30 Un suministro de dieta para 5 días puede incluir: sopas/caldos, refrescos, barras de nueces y suplementos. La dieta se administra de la siguiente manera: 1) el primer día se proporciona una dieta de 1000-1200 kcal con alto aporte de micronutrientes; 2) durante los próximos 4 días se proporciona una dieta diaria de 650-800 kcal más una bebida que contiene una fuente de carbono de sustitución de glucosa que proporciona entre 60-120 kcal. La fuente de carbono 35 de sustitución no interfiere con el efecto del ayuno sobre la activación de las células madre.

En otro refinamiento de las realizaciones expuestas anteriormente, un protocolo de dieta baja en proteínas de 6 días incluye: sopas/caldos, refrescos, barras de nueces y suplementos. La dieta se administra de la siguiente manera: 1) el primer día se proporciona una dieta de 1000-1200 kcal más una nutrición rica en micronutrientes; 2) durante los 40 3 días siguientes una dieta diaria de menos de 200 kcal más una bebida que contenga una fuente de carbono de sustitución de glucosa que proporcione entre 60 y 120 kcal. Esta fuente de carbono de sustitución no interfiere con el efecto del ayuno sobre la activación de las células madre; 3) el quinto día el sujeto consume una dieta normal; y 4) el día 6, se proporcionan alimentos de reposición adicionales que consisten en una fuente rica en grasas de 300 kcal y una mezcla nutritiva de micronutrientes, se proporcionan en el día 6 alimentos de reposición que consisten en una 45 fuente alta en grasas de 300 kcal y una mezcla nutritiva de micronutrientes, además de la dieta normal.

En otro refinamiento más, un protocolo de dieta incluye: el suministro de 6 días de dieta baja en proteínas incluye: sopas/caldos, refrescos, barras de nueces y suplementos. 1) el primer día se proporciona una dieta de 1000-1200 kcal con alto aporte de micronutrientes; 2) durante los próximos 3 días una dieta diaria de 600 a 800 kcal que contiene menos de 10 gramos de proteína y menos de 200 kcal de azúcares; 3) en el quinto día el sujeto recibe una dieta normal; y 4) en el día 6, se proporcionan alimentos de reposición adicionales que consisten en una fuente rica 50 en grasas de 300 kcal y una mezcla nutritiva de micronutrientes, y en el día 6, se proporcionan alimentos de reposición que consisten en una fuente alta en grasas de 300 kcal y una mezcla nutritiva de micronutrientes además de la dieta normal.

55 La presente divulgación proporciona formulaciones y métodos nutricionales para la regeneración de tejidos y órganos. A continuación, se exponen métodos y composiciones específicos que logran este objetivo. Aunque el funcionamiento de la presente invención no se limita a ningún mecanismo en particular, la protección observada en diversas realizaciones de la presente invención se debe en parte a la modulación de la ruta de PKA. La base del efecto protector del ayuno parece tener como base la capacidad de reasignar energía a la protección/mantenimiento de la reproducción/crecimiento cuando los nutrientes son escasos o ausentes. Cabe señalar que la restricción dietética a largo plazo provoca una reducción mucho más modesta de IGF-I y glucosa en comparación con el ayuno. Además, a diferencia del ayuno, la restricción dietética a largo plazo no es factible para la gran mayoría de la población, ya que provoca una pérdida de peso crónica y es muy difícil de mantener. En cambio, los sujetos que 60 reciben el tratamiento pueden tolerar bien un promedio de aproximadamente 62 horas de ayuno antes de y 24 horas después del tratamiento.

La presente invención puede lograr una reducción en la actividad de PKA y/o niveles de IGF-I en un sujeto mediante la administración de un protocolo dietético. Como se indicó anteriormente, la publicación de la OMPI No. WO2011/050302 proporciona un protocolo y paquetes de dieta particularmente útiles y los protocolos dietéticos aquí.

5 En particular, los sujetos reciben una primera dieta durante un primer período de tiempo, una segunda dieta durante un segundo período de tiempo y una tercera dieta opcional durante un tercer período de tiempo. La primera dieta proporciona al sujeto como máximo el 50 % de la ingesta calórica normal del sujeto con al menos el 50 % de las kilocalorías derivadas de grasas, preferiblemente grasas monoinsaturadas. La ingesta calórica normal del sujeto es el número de kcal que consume el sujeto para mantener su peso. La ingesta calórica normal del sujeto puede estimarse entrevistando al sujeto o considerando su peso. Como una guía aproximada, la ingesta calórica normal del sujeto es en promedio 2600 kcal/día para hombres y 1850 kcal/día para mujeres. En ciertos casos, la primera dieta proporciona al sujeto de 700 a 1200 kcal/día. En un refinamiento particularmente útil, la primera dieta proporciona al sujeto masculino de peso medio aproximadamente 1100 kcal/día y al sujeto femenino de peso medio 900 kcal/día. Normalmente, el primer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 1 a 5 días. En ciertos casos, el primer período de tiempo predeterminado es 1 día. Para poner el nivel de grasa en la primera dieta en perspectiva, la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos, recomienda el siguiente desglose nutricional para una dieta típica de 2000 kilocalorías al día: 65 gramos de grasa (aproximadamente 585 kilocalorías), 50 gramos de proteína (aproximadamente 200 kilocalorías), 300 gramos de carbohidratos totales (aproximadamente 1200 kilocalorías). Por lo tanto, en una versión de la primera dieta, se elimina la mayoría de las calorías de carbohidratos y proteínas.

20 Aunque la primera dieta abarca prácticamente cualquier fuente de grasas, las fuentes con alto contenido de grasas insaturadas, incluidas las fuentes de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, son particularmente útiles (por ejemplo, ácidos grasos esenciales omega-3/6). Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos monoinsaturados incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacahuete, aceitunas, nueces (por ejemplo, almendras, pacanas, pistachos, anacardos), aguacate, semillas (por ejemplo, sésamo), aceites (por ejemplo, oliva, sésamo, cacahuete, colza), etc. Ejemplos adecuados de fuentes de alimentos poliinsaturados incluyen, pero no se limitan a, nueces, semillas (por ejemplo, calabaza, girasol), linaza, pescado (por ejemplo, salmón, atún, caballa), aceites (por ejemplo, cártamo, soja, maíz). La primera dieta también incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos vegetales, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de estos. En un refinamiento, dicho extracto vegetal proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de vegetales. Las fuentes adecuadas para el extracto vegetal incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárragos, zanahoria, calabaza cidra, alfalfa, guisantes, tomate, repollo, coliflor, remolacha. Las fuentes adecuadas de ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen pescados como salmón, atún, caballa, pescado azul, pez espada y similares.

35 A continuación, se proporciona al sujeto la segunda dieta durante un segundo período de tiempo. La segunda dieta proporciona al sujeto como máximo 900 kcal/día. En ciertos casos, la segunda dieta proporciona al sujeto como máximo 200 kcal/día. Normalmente, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 7 días. En ciertos casos particulares, el segundo período de tiempo predeterminado es de 3 días. En otro refinamiento más, la segunda dieta incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos vegetales, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de estos. En un refinamiento, dicho extracto vegetal proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de vegetales. Las fuentes adecuadas para el extracto vegetal incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárragos, zanahoria, calabaza cidra, alfalfa, guisantes, tomate, repollo, coliflor, remolacha. Las fuentes adecuadas de ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen aceites de pescado de salmón, atún, caballa, pescado azul, pez espada y similares.

40 La eficacia de los protocolos dietéticos aquí se monitoriza mediante la medición de varios parámetros del sujeto. Por ejemplo, es deseable que la concentración sérica de IGF-I del sujeto se reduzca entre un 25-90 % al final del segundo período de dieta. También es deseable que la concentración de glucosa en sangre en el sujeto se reduzca entre un 25-75 % al final del segundo período de dieta. En un refinamiento, la actividad de PKA en el tejido o células de interés para asegurar una reducción es la actividad de PKA de al menos el 15 por ciento. En otros refinamientos, la actividad de PKA en el tejido o las células de interés para asegurar una reducción es la actividad de PKA de al menos el 25 por ciento, 30 por ciento o 50 por ciento. La actividad de PKA se puede determinar mediante varios métodos conocidos por las personas experimentadas en la técnica. El ensayo ProFluor® PKA disponible comercialmente de Promega es un ensayo que resulta útil para este propósito.

45 En una variación, el sujeto recibe una tercera dieta durante un tercer período de tiempo predeterminado. La tercera dieta es para complementar la dieta normal del sujeto. Característicamente, la composición reponedora incluye aminoácidos esenciales, minerales y grasas esenciales. Ventajosamente, la tercera dieta permitirá al sujeto recuperar el peso normal y maximizar la fuerza. Normalmente, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días. La composición de reposición también incluirá opcionalmente varios componentes adicionales. Por ejemplo, la composición de reposición puede incluir un extracto vegetal. En un refinamiento, dicho extracto vegetal proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de vegetales. Las fuentes adecuadas para el extracto vegetal incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárragos, zanahoria, calabaza cidra, alfalfa, guisantes, tomate, repollo, coliflor, remolacha. La composición de reposición también puede incluir ácidos grasos esenciales omega-3/6 y aminoácidos no esenciales. Los ejemplos de aminoácidos adecuados

incluyen, pero no se limitan a, histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de estos. La composición de reposición también puede incluir un comprimido multimineral que contenga hierro, zinc, cobre, magnesio y calcio y también puede contener un complejo de vitamina B que incluya vitamina B12.

5 Como se expuso anteriormente, la tercera dieta junto con la dieta normal del sujeto permitirá al sujeto recuperar el peso normal y maximizar la fuerza. Normalmente, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días y puede continuar indefinidamente. En ciertos casos, el tercer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 4 días a aproximadamente 14 días. Se estima que una semana es casi óptima para este propósito. La composición de reposición también incluirá opcionalmente varios componentes adicionales. Por 10 ejemplo, la composición de reposición puede incluir un extracto vegetal. En un refinamiento, dicho extracto vegetal proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de vegetales. Las fuentes adecuadas para el extracto vegetal incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárragos, zanahoria, calabaza cidra, alfalfa, guisantes, tomate, repollo, coliflor, remolachas. La composición de reposición también puede incluir ácidos 15 grasos esenciales omega-3/6 y aminoácidos no esenciales. Los ejemplos de aminoácidos no esenciales adecuados incluyen, pero no se limitan a, histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de estos. Los detalles adicionales de la tercera dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

Se proporciona un método para aliviar un síntoma de la enfermedad de Alzheimer. El método incluye una etapa de administrar una dieta específica de aminoácidos que tiene ciertos aminoácidos durante un primer período de tiempo.

20 Aunque el primer período de tiempo puede ser para cualquier período de tiempo deseado, en un refinamiento, el primer período de tiempo es de aproximadamente 5 días a 14 días, siendo típico 7 días. En una variación, la dieta específica de aminoácidos excluye sustancialmente los siguientes aminoácidos: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenialanina, treonina, triptófano, valina y arginina. En este contexto, "excluye sustancialmente" significa que el total 25 de los aminoácidos excluidos es menor que, orden creciente de preferencia, 5 por ciento en peso, 3 por ciento en peso, 1 por ciento en peso y 0.5 por ciento en peso total de la dieta del sujeto. En cambio, la dieta específica de aminoácidos proporciona uno o más de los siguientes aminoácidos como una fuente de nitrógeno: alanina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, prolina, serina y tirosina. Las Tablas 2 a 4 proporcionan características de una dieta específica de aminoácidos para un ratón que también es una proteína restringida como se expone a continuación. Una dieta típica para ratones proporciona aproximadamente 19 kcal por 30 día. Para otros mamíferos como los humanos, la dieta restringida en proteínas (PR) se escala para proporcionar las calorías necesarias. Por ejemplo, una ingesta calórica típica para adultos en los Estados Unidos es de aproximadamente 2200 calorías por día. La Tabla 5 proporciona las kilocalorías por día de cada fuente para los sujetos humanos, mientras que la Tabla 6 proporciona los gramos por día de cada fuente para los humanos.

35

Tabla 2.

	Ingredientes (g/kg)			Macronutrientes (g/kg)	
	Dieta normal	dieta PR		Dieta normal	dieta PR
Almidón de maíz	397.49	397.49	Carbohidrato	601	617
Maltodextrina	132	149.88	Fuente de nitrógeno	177	183
Sacarosa	100	100	Grasa	72	72
Aceite de semilla de soja	70	72			
Celulosa	50	50		Densidad calórica (kcal/g)	
Mineral	35	35			
Vitamina	10	10		Dieta normal	dieta PR
Bitartarato de colina	2.5	2.5			
Tert-butilhidroquinona	0.01	.01		3.7600	3.7673

Tabla 3. Kilocalorías en 1 kg de ratón de cada fuente de alimento.

	DIETA NORMAL	PR
Carbohidrato	2404	2468
Fuente de nitrógeno	708	732
Grasa	648	648
calculado	3760	3848

Tabla 4. Porcentaje de calorías de cada fuente (ratón).

	DIETA NORMAL	PR
Carbohidrato	63.94	64.14
Fuente de nitrógeno	18.83	19.02
Grasa	17.23	16.84

5

Tabla 5. Calorías por día de cada fuente (Humanos).

	DIETA NORMAL	PR
Carbohidrato	1406.60	1411.02
Fuente de nitrógeno	414.26	418.50
Grasa	379.15	370.48
<i>Total (kcal)</i>	2200.00	2200.00

Tabla 6. Gramos por día de cada fuente (Humanos).

	DIETA NORMAL	PR
Carbohidrato	351.65	352.75
Fuente de nitrógeno	103.56	104.63
Grasa	42.13	41.16
<i>Total (g)</i>	497.34	498.54

10

En un refinamiento, un kilogramo de la dieta específica de aminoácidos para un ratón incluye de aproximadamente 2 g a 20 g de alanina, 10 g a 30 g de ácido aspártico, 2 g a 20 g de cisteína, 40 g a 80 g de ácido glutámico, 2 g a 20 g de glicina, 2 g a 20 g de histidina, 15 g a 50 g de prolina, 5 g a 30 g de serina y 5 g a 30 g de tirosina. Para sujetos humanos, estos intervalos se multiplican por un factor (es decir, aproximadamente 0.572) para proporcionar la

15

composición de la formulación dietética por día para sujetos humanos. Por ejemplo, las cantidades diarias de los aminoácidos especificados para humanos (dieta de 2200 calorías/día) en la dieta específica de aminoácidos son aproximadamente de 2 a 12 g de alanina, 5 g a 30 g de ácido aspártico, 1 g a 7 g de cisteína, 18 g a 73 g de ácido glutámico, 2 g a 9 g de glicina, 2 g a 10 g de histidina, 9 g a 37 g de prolina, 5 g a 21 g de serina y 5 a 21 g de tirosina. En otro refinamiento, la dieta específica de aminoácidos incluye de aproximadamente 160 a

20

aproximadamente 240 g de los aminoácidos especificados por kilogramo de la dieta. Por lo tanto, para los humanos, la dieta específica de aminoácidos proporciona entre 80 y 160 g de los aminoácidos especificados por día utilizando un factor (0.572) para convertir el valor por kilogramo de dieta en un valor representativo de una dieta humana de aproximadamente 2200 calorías/día. En otra variación, la dieta específica de aminoácidos incluye al menos 6 aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en alanina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina,

25

histidina, prolina, serina y tirosina en las cantidades indicadas anteriormente. En otra variación más, la dieta específica de aminoácidos proporciona las cantidades de aminoácidos en gramos por kg de peso corporal humano por día establecidas en la Tabla 7. En particular, la dieta específica de aminoácidos proporcionó los siguientes gramos por kg de peso corporal humano por día 0.06 g de alanina, 0.14 g de ácido aspártico, 0.04 g de cisteína, 0.45 g de ácido glutámico, 0.05 g de glicina, 0.06 g de histidina, 0.23 g de prolina, 0.13 g de serina y 0.13 g de tirosina. En otro refinamiento, cada uno de estos aminoácidos está dentro de un intervalo de más o menos 30 por

30

ciento del valor especificado.

Tabla 7. Niveles humanos. Gramos de cada aminoácido seleccionado para la dieta protectora contra la demencia por kg de peso corporal humano por día.

Formulación gramos/kg de peso corporal				
AA	DIETA NORMAL	PR	Factor	
Ala	0.07	0.06	0.81	
Asp	0.13	0.14	1.09	
Cys	0.02	0.04	2.05	
Glu	0.20	0.45	2.23	
Gly	0.06	0.05	0.94	
His	0.04	0.06	1.68	
Pro	0.10	0.23	2.25	
Ser	0.09	0.13	1.35	
Tyr	0.06	0.13	2.19	
<i>Total</i>	<i>0.78</i>	<i>1.30</i>		

- 5 Se proporciona otro método para aliviar un síntoma de la enfermedad de Alzheimer. El método incluye una etapa de administrar una dieta restringida en proteínas (PR) a un sujeto durante un primer período de tiempo. En una variación, la dieta PR incluye un suplemento dietético de aminoácidos específicos. En un refinamiento, el primer período de tiempo es de aproximadamente 5 días a 14 días, siendo lo típico 7 días. Además, la dieta baja en proteínas proporciona al sujeto del 70 al 100 por ciento de la ingesta calórica normal del sujeto. La dieta PR incluye sustancialmente solo aminoácidos como fuente de nitrógeno. Por ejemplo, la dieta restringida en proteínas deriva menos del 10 por ciento de sus calorías de proteínas. En otro refinamiento, la dieta restringida en proteínas deriva menos del 5 por ciento de sus calorías de proteínas. En otro refinamiento, la dieta restringida en proteínas deriva el cero por ciento de sus calorías de proteínas. En particular, la dieta restringida en proteínas excluye sustancialmente los siguientes aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y arginina. En este contexto, "excluye sustancialmente" significa que el total de los aminoácidos excluidos es menor que, orden creciente de preferencia, 5 por ciento en peso, 3 por ciento en peso, 1 por ciento en peso y 0.5 por ciento en peso. En cambio, la dieta restringida en proteínas proporciona uno o más de los siguientes aminoácidos como una fuente de nitrógeno: alanina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, prolina, serina y tirosina. Las tablas 2 a 4 proporcionan las características de una dieta restringida en proteínas que incluye el suplemento dietético para los estudios en ratones que se exponen a continuación. Una dieta típica para ratones proporciona aproximadamente 19 kcal por día. Para otros mamíferos como los humanos, la dieta de PR se hace a escala para proporcionar las calorías requeridas. Por ejemplo, una ingesta calórica típica para adultos en los Estados Unidos es de aproximadamente 2200 kcalorías por día. La Tabla 5 proporciona las kilocalorías por día de cada fuente para humanos, mientras que la Tabla 6 proporciona los gramos por día de cada fuente para humanos.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

aspártico, 0.04 g de cisteína, 0.45 g de ácido glutámico, 0.05 g de glicina, 0.06 g de histidina, 0.23 g de prolina, 0.13 de serina y 0.13 g de tirosina. En otro refinamiento, cada uno de estos aminoácidos está dentro de un intervalo de más o menos 30 por ciento del valor especificado.

5 Tabla 8. Datos de ratones que proporcionan la cantidad de aminoácidos por kilogramo de dieta para la dieta normal (el control) y para la dieta experimental (PR). El factor es la proporción de PR a Control.

AA	g/kg de dieta		
	DIETA NORMAL	PR	Factor
Ala	10.00	8.30	0.83
Arg	12.00	0.00	0.00
Asp	18.00	20.10	1.12
Cys	3.00	6.30	2.10
Glu	28.00	63.90	2.28
Gly	8.00	7.70	0.96
His	5.00	8.60	1.72
Ile	8.00	0.00	0.00
Leu	17.00	0.00	0.00
Lys	10.00	0.00	0.00
Met	4.00	0.00	0.00
Phe	9.00	0.00	0.00
Pro	14.00	32.30	2.31
Ser	13.00	17.90	1.38
Thr	8.00	0.00	0.00
Trp	3.00	0.00	0.00
Tyr	8.00	17.90	2.24
Val	9.00	0.00	0.00
<i>Total</i>	<i>187</i>	<i>183</i>	

10 En algunas variaciones, los métodos expuestos anteriormente incluyen además una etapa de administrar una dieta normal (es decir, una dieta de control) a un sujeto durante un segundo período de tiempo que sigue al primer período de tiempo. La dieta normal proporciona al sujeto con una ingesta calórica normal sin restricciones en cuanto a proteínas. Además, ningún aminoácido se excluye explícitamente de la dieta normal. Normalmente, el segundo período de tiempo es de 5 días a 28 días o más. En una variación, al sujeto se le proporcionan dietas alternas restringidas en proteínas más suplementos de aminoácidos y dietas normales durante 1 o más iteraciones a través de la dieta restringida en proteínas y la dieta normal. La Tabla 2 proporciona un ejemplo del contenido de aminoácidos en una dieta normal. Las tablas 2 a 4 proporcionan las características de una dieta normal para los estudios en ratones que se exponen a continuación. Para otros mamíferos como los humanos, la dieta se hace a escala para proporcionar las calorías requeridas. Por ejemplo, una ingesta calórica típica para adultos en los Estados Unidos es de aproximadamente 2200 calorías por día, por lo tanto, los datos del ratón se multiplican por un factor (0.585) para proporcionar datos relevantes para sujetos humanos. La Tabla 5 proporciona las kilocalorías por día de cada fuente para la dieta normal para sujetos humanos, mientras que la Tabla 6 proporciona los gramos por día para cada fuente para la dieta normal para sujetos humanos.

25 Se proporciona un suplemento dietético para combinar con la dieta de un sujeto. En una variación, la dieta del sujeto tiene un porcentaje bajo (por ejemplo, menos de 5, 3, 1 o 0.5 por ciento en peso) o cero por ciento de proteínas. Por lo tanto, en esta variación, el suplemento dietético más la dieta del sujeto forman la dieta PR establecida anteriormente. En otra variación, la dieta del sujeto es la dieta normal del sujeto (por ejemplo, 2200 calorías/día para humanos) o cualquier dieta a la que se desee la adición de los aminoácidos especificados. El suplemento dietético incluye cantidades suficientes de los aminoácidos especificados para cumplir con los requisitos dietéticos

establecidos anteriormente. En particular, el suplemento dietético incluye alanina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, prolina, serina y tirosina, mientras que excluye sustancialmente isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y arginina. En un refinamiento, el suplemento dietético incluye cantidades suficientes de los aminoácidos especificados para proporcionar estos aminoácidos en las cantidades indicadas anteriormente. La Tabla 8 proporciona los intervalos de las proporciones de aminoácidos a cisteína en el suplemento dietético. En una variación, el suplemento dietético incluye una cantidad suficiente de aminoácidos para uno o más ciclos durante el primer período de tiempo. Normalmente, el suplemento dietético incluye instrucciones para llevar a cabo el protocolo dietético establecido anteriormente.

10 Los siguientes ejemplos ilustran las diversas realizaciones de la presente invención. Las personas experimentadas en la técnica reconocerán muchas variaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

15 La restricción dietética y/o calórica (CR) promueve la autorrenovación de las células madre intestinales y la regeneración neural, reduce la disminución del número de HSC durante el envejecimiento y conserva su capacidad regenerativa a largo plazo (1-4). Sin embargo, los efectos de la CR o el ayuno sobre inmunodeficiencia y regeneración del sistema hematopoyético a base de células madre se desconocían previamente. Además, la CR es una intervención crónica que no se puede separar de la pérdida de peso y que produce efectos moderados sobre el IGF-I y niveles de glucosa (5). Por el contrario, mostramos que los ciclos de ayuno, que permiten a los ratones recuperar y mantener un peso normal, promueven aumentos importantes de CD45<sup>+</sup>MSC/EPC pluripotentes y HSPC 20 adultos multipotentes, acompañados de la regeneración de múltiples sistemas, incluidos el cerebro, hígado y sangre, incluso bajo condiciones que provoquen su grave agotamiento. Estos resultados sugieren que los ciclos de privación completa de alimentos pueden actuar como desencadenantes de la autorrenovación de las células madre o de la desdiferenciación/reprogramación de forma jerárquica.

25 Con base en la evidencia de estudios en animales y humanos, los estilos de vida que incorporan diversas formas de ayuno durante la vida adulta promueven la salud al mismo tiempo que reducen el riesgo de muchas enfermedades crónicas, particularmente para aquellos con sobrepeso y sedentarios. En particular, diversas metodologías de ayuno siguen siendo un desafío, por ejemplo, debido a importantes intervenciones en el estilo de vida y hábitos alimenticios del sujeto, bajo cumplimiento y efectos secundarios de la desnutrición. Como tal, las dietas bajas en calorías que 30 imitan el ayuno (FMD) que inducen efectos similares al ayuno en sujetos presentan una alternativa al ayuno. Además, dietas, más que el ayuno, permiten aportar una nutrición de micronutrientes, preferiblemente en la medida de lo posible a través de fuentes alimenticias naturales. Aquí mostramos ejemplos de que los ciclos repetidos de una FMD promueven duración de salud, neurogénesis adulta, rendimiento cognitivo y mantenimiento de tejidos, así como la regeneración de tejidos en sujetos.

35 La Figura 1 proporciona la Tabla 9 que ilustra los efectos sobre la composición corporal en roedores y sujetos humanos. En ratones hembra BALB/c de 16.5 meses de edad, un ciclo de FMD redujo significativamente el peso corporal en un 18 % en comparación con los controles alimentados ad lib. Después de la realimentación, no quedó ninguna diferencia significativa en el peso, lo que indica que todos los ratones se recuperaron del régimen dietético 40 después de completar el primer ciclo. La disminución de peso se puede atribuir a la ingesta relativamente baja de calorías durante el ciclo de la FMD, que se redujo en ~80 % al considerar todos los 4 días del ciclo. No se observaron diferencias en la ingesta de calorías entre los grupos de dieta y control, ya que los ratones compensaron después de la alimentación FMD con un ligero consumo excesivo durante la realimentación; normalizando así la ingesta calórica. Los ciclos de alimentación repetidos de la dieta que imita el ayuno separaron el peso corporal de 45 los dos grupos. Mientras que los ratones en el grupo de control aumentaron su peso corporal durante diez ciclos de alimentación, los ratones del grupo FMD mantuvieron un peso corporal cercano a su peso antes del inicio del régimen de FMD durante aproximadamente 12 ciclos de alimentación antes de que se hiciera evidente una lenta disminución de peso. Por lo tanto, los efectos a largo plazo del régimen de FMD sobre la grasa corporal total, así como los depósitos de grasa subcategorizados (subcutáneos y viscerales), se evaluaron mediante tomografías 50 computarizadas (CT) de rayos X. A los 28 meses de edad y después de completar 23 ciclos de FMD, la grasa corporal total y visceral, que está estrechamente relacionada con patologías asociadas con la obesidad, se redujo en los ratones alimentados con FMD. Solo se pudo medir un efecto menor sobre los depósitos de grasa subcutáneos. En sujetos humanos, después de uno y tres ciclos de una dieta que imita el ayuno, el peso corporal (como % en 55 comparación con los valores de línea base antes del inicio de la FMD) se redujo significativamente y, por lo tanto, tiene efectos similares a los observados en los experimentos preclínicos. El porcentaje relativo de grasa del tronco para sujetos humanos se evaluó tras la finalización de tres ciclos de FMD mediante "absorciometría de rayos X de energía dual" (DEXA) en sujetos humanos.

60 La Figura 2 proporciona la Tabla 10 que ilustra la dieta FMD que logra una reducción en la incidencia de cáncer, retrasa la aparición de la muerte relacionada con el cáncer y/o afecta los biomarcadores asociados con la salud y la esperanza de vida de los sujetos. Tras la autopsia, las neoplasias fueron la alteración más prominente encontrada en los sujetos, aunque con una tasa de incidencia reducida en los sujetos alimentados con FMD. El análisis de regresión del riesgo competitivo mostró una reducción significativa ( $p= 0.02$ ) en las muertes relacionadas con neoplasias para los sujetos de la cohorte de FMD. Al considerar la incidencia de neoplasias, también se hizo evidente que los sujetos en la cohorte de FMD sucumbían a neoplasias más adelante en la vida. La glucosa y el IGF-1, que se ha demostrado que promueven el desarrollo y la progresión del tumor, se redujeron significativamente 65

durante el régimen de FMD. Se incrementó IGFBP-1, que se enlaza y reduce la biodisponibilidad de IGF-1; reduciendo así aún más la señalización de IGF-1. De manera similar a los datos preclínicos, el IGF-1 se redujo después del primer y tercer ciclo de FMD. Se incrementaron los niveles de IGFBP-1.

5 La Figura 3 proporciona la Tabla 11 que proporciona formulaciones nutricionales y métodos para reducir la inflamación en diversos tejidos y órganos. La inflamación juega un papel diverso en el desarrollo de muchas enfermedades relacionadas con la edad, como aterosclerosis, cáncer, obesidad, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades del sistema digestivo y enfermedad de Alzheimer (6). En comparación con los animales control alimentados ad lib, los sujetos mantenidos con la dieta FMD a partir de los 16.5 meses de edad tuvieron una 10 incidencia significativamente reducida de tejidos inflamados detectados en la necroscopia. Los tejidos inflamados incluyeron, entre otros, el hígado y tracto reproductivo de sujetos hembra (no mostrado). Una de las diversas enfermedades de fondo específicas de la cepa C57B1/6 (ambos sexos) es la aparición de alopecia focal que a menudo progresó a una dermatitis ulcerante grave. Los sujetos alimentados con la dieta FMD mostraron una 15 reducción del 50 % en la incidencia de dermatitis a lo largo de su vida en comparación con los sujetos control alimentados ad lib (10.3 % frente a 19.6 %, respectivamente).

La Figura 4 proporciona la Tabla 12 en la que los sujetos alimentados con la dieta FMD mostraron una pérdida retardada de la densidad mineral ósea relacionada con el envejecimiento. La densidad mineral ósea (BMD) disminuye con la edad y la BMD baja es uno de los factores de riesgo más importantes de fracturas. La densidad mineral ósea [en mg de hidroxiapatita (HA)/cm<sup>3</sup>] del hueso femoral se analizó mediante tomografía computarizada (CT) de rayos X en ratones alimentados con control a los 12 y 28 meses de edad, así como 7 días después de la realimentación de sujetos en la cohorte de FMD in vivo a los 28 meses de edad (FMD-realimentados). Despues de 12 meses de alimentación bimensual con la dieta de sustitución FMD, los niveles de hidroxiapatita/cm<sup>2</sup> en el fémur de los sujetos alimentados con FMD eran más altos ( $p < 0.05$ ) en comparación con los de los sujetos alimentados con la dieta estándar, lo que indica una reducción de la osteoporosis senil en este grupo.

La Figura 5 proporciona la Tabla 13 que proporciona formulaciones nutricionales y métodos para la regeneración del hígado. En comparación con los ratones de 20-22.5 meses de edad del control alimentado ad lib, los sujetos alimentados con la dieta experimental FMD a partir de los 16.5 meses de edad habían reducido significativamente el peso del hígado y habían perdido aproximadamente el 35 % de la masa hepática original al final del régimen de FMD. El nivel de alanina aminotransferasa (ALT), un marcador de diagnóstico clínico para la evaluación de la lesión hepatocelular y la salud hepática, se elevó al final del régimen de FMD, pero volvió a los niveles normales dentro de los 7 días de la realimentación. El aumento de ALT concuerda con la observación de que la dieta FMD provoca grandes alteraciones estructurales y autofagia de los hepatocitos (Tabla 13 B, asteriscos). 24 horas después de la 30 realimentación, el peso del hígado vuelve a, e incluso supera (+10 %), el peso normal, lo que indica la repoblación de la masa hepática perdida por medio de células recién generadas. La tinción con H&E hepático de los sujetos del grupo control (Tabla 13 A) y del grupo FMD 24 horas después de la realimentación demuestra la infiltración de 35 células desorganizadas alrededor de la vena (Tabla 13 B, flecha), lo que indica la regeneración del hígado y la repoblación con hepatocitos inmediatamente después de la realimentación.

40 La Figura 6 proporciona resultados para formulaciones y métodos nutricionales que aumentan las células madre/progenitoras. En ratones, las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC) comenzaron a aumentar en la médula ósea después de dos ciclos de inanición a corto plazo (STS, Tabla 14 A). La inducción de células madre/progenitoras mesenquimales y endoteliales (MSC/EPC) también se pudo observar en ratones después de 48 45 horas de inanición a corto plazo (Tabla 14 B); 12 ciclos de FMD tuvieron efectos similares (Tabla 14). En sujetos humanos, las HSPC (Tabla 14 C) y MSC/EPC (Tabla 14 D) comenzaron a aumentar después de completar un ciclo de FMD y los efectos permanecieron después de la realimentación.

50 La Figura 7 proporciona resultados para formulaciones y métodos nutricionales que promueven la regeneración hematopoyética. En ratones, múltiples ciclos de ciclofosfamida causaron deficiencia de glóbulos blancos (WBC) y sesgo linfoide/mieloide (L/M) (Tabla 15). Los ciclos de ayuno aceleraron la recuperación de los WBC y reconstruyeron la homeostasis de los linajes linfoides o mieloides (Tabla 15). En sujetos humanos que recibieron quimioterapia inmunosupresora, se observaron efectos prorregenerativos similares en WBC y L/M después de dos ciclos de ayuno (Tabla 15).

55 La Figura 8 proporciona resultados para la formulación nutricional y los métodos que alivian el sesgo mieloides dependiente de la edad. La homeostasis de los linajes sanguíneos se altera durante el envejecimiento y se sesga hacia los linajes mieloides (Tabla 16). Tanto en ratones como en seres humanos, los ciclos de FMD previenen la desviación de un equilibrio de linaje y revierten el efecto degenerativo en sujetos de mediana edad (Tabla 16).

60 Las Figuras 9 y 10 ilustran métodos que imitan el ayuno para estimular las células madre/progenitoras amortiguando la señalización de GHR/IGF-1 o PKA. Similar a la causada por el ayuno, la alteración direccional del gen del receptor de la hormona del crecimiento (GHRKO) provoca una reducción significativa en el IGF-1 circulante y la inducción de HSPC y MSC/EPC en ratones (Figura 9). El tratamiento con ARNsi de PKA que inhibe la actividad de PKA también provocó una inducción similar en células madre/progenitoras ex vivo. La capacidad regenerativa del 65 aumento de células regenerativas fue evidente en ratones receptores inmunocomprometidos in vivo (Figura 10).

Las Figuras 11-14 proporcionan resultados de experimentos para formulaciones y métodos nutricionales que inducen la neurogénesis en adultos y mejoran el rendimiento cognitivo (Tabla 17). El índice de proliferación y la neurogénesis adulta en sujetos se evaluó en función de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) que se inició 5 4 días antes del ciclo 12 de la dieta FMD y se comparó con sujetos de control alimentados ad lib de la misma edad (23 meses). Las células positivas para BrdU están elevadas en la zona subgranular. Se realizó tinción con DCX+ para medir las neuronas inmaduras en la circunvolución dentada. En la cohorte de FMD, el 17.6 % de las células de 10 retención de BrdU también fueron positivas para DCX en comparación con el 3.1 % en los controles, lo que indica que los sujetos del grupo FMD tuvieron un aumento en las células precursoras neurales comprometidas con el linaje neuronal. La neurogénesis adulta se ha relacionado con las habilidades de coordinación motora, el reconocimiento a corto plazo y el rendimiento del reconocimiento espacial a largo plazo en ratones de edad avanzada. Los sujetos mantenidos en FMD fueron evaluados para el aprendizaje espacial y memoria a largo plazo (laberinto de Barnes), memoria a corto plazo (reconocimiento de objetos nuevos) y memoria de trabajo (laberinto en Y), así como la 15 coordinación y el equilibrio (varilla giratoria) y se compararon con sujetos alimentados con pienso normal para roedores. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron entre 10 y 12 ciclos de dieta (5-6 meses en la dieta FMD) a la edad de 23-24 meses. Para prevenir la hiperactividad inducida por la inanición o movimiento inusual, los sujetos con FMD fueron expuestos a las pruebas de comportamiento no antes de 3 días después de la realimentación, que es el tiempo aproximado que les tomó a los sujetos recuperar el peso corporal normal. Para probar la coordinación motora y el aprendizaje de las habilidades motoras, los sujetos de la cohorte de control y de 20 FMD se probaron con la varilla giratoria de aceleración (Tabla 17A). La mejor calificación (en segundos) de las 6 sesiones de prueba mejoró significativamente para los sujetos de la cohorte de FMD en comparación con los sujetos alimentados ad lib a los 23 meses de edad. El reconocimiento espacial y la memoria a corto plazo se evaluaron con la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (Tabla 17 B) y laberinto en Y (Tabla 17 C). La prueba de comportamiento de reconocimiento de objetos nuevos evalúa la memoria dependiente del contexto y se calcula 25 como un índice de reconocimiento definido como la proporción de tiempo (en segundos) transcurrido entre un objeto familiar y un objeto nuevo. Durante la fase de ajuste, dos objetos idénticos se colocan dentro de una jaula rectangular y se registró el tiempo dedicado a explorar ambos objetos. Despues de este período de ajuste, se reemplazó un objeto por un objeto nuevo y se registró el tiempo dedicado a explorar ambos objetos (Tabla 17B). Los sujetos de la cohorte de FMD se desempeñaron significativamente mejor en esta prueba, lo que indica una mejor 30 memoria a corto plazo relacionada con el objeto. La función de la memoria de trabajo se investigó con base al comportamiento de alternancia espontánea (SAB) en un laberinto en Y (Tabla 17C). Los sujetos alimentados con FMD se desempeñaron en esta prueba significativamente mejor que los sujetos alimentados ad lib. El aprendizaje espacial se evaluó con el laberinto de Barnes a los 23 meses de edad para sujetos de los grupos de control y de FMD (Tabla 17D-H). El número de errores (Tabla 17D, definida como pinchazos con la nariz y desviaciones de la 35 cabeza sobre cualquier agujero de objetivo falso), desviaciones de la caja de escape (Tabla 17E, cuántos agujeros lejos de la caja de escape fue el primer error), latencia (Tabla 17F, se registró el tiempo que tardó el ratón en entrar en la caja de escape) y la tasa de éxito (Tabla 17G, 100 %, encontrar un cuadro de escape en 2 minutos o 0 %, no encontrar el cuadro de escape en 2 minutos). La retención de la memoria se evaluó probando a cada sujeto el día 15 y se promediaron las mediciones de dos pruebas para obtener el valor de cada sujeto. Las estrategias de búsqueda 40 se clasificaron como aleatorias (búsquedas de agujeros localizadas separadas por cruces a través del centro del laberinto), en serie (búsquedas sistemáticas de agujeros en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario a las agujas del reloj) o espaciales (navegar directamente a la caja de escape con calificaciones de error y desviación de no más de 3) (Tabla 17H). Los sujetos de la cohorte alimentada con FMD mostraron estrategias de búsqueda superiores y una mejor retención de su caja de escape el día 15, demostrando así una mejora de las capacidades 45 cognitivas en el aprendizaje motor y la memoria a corto y largo plazo dependiente del hipocampo.

El régimen de PRC no causa un estado de bajo peso crónico ni una disminución general en la ingesta de calorías. A diferencia de los animales control alimentados con una dieta normal, después de siete días de dieta PR, tanto los ratones 3xTg-AD como los WT perdieron entre el 13 y el 17 % del peso corporal inicial, que se recuperó por 50 completo durante los siguientes siete días de realimentación con la dieta normal (Figura 15B, medidas repetidas ANOVA seguido de prueba de Newman-Keuls:  $p < 0.001$ , regímenes de control en comparación con regímenes de PRC). Los ratones sometidos a un régimen de PCR mantuvieron un perfil de peso corporal similar durante las 18 semanas completas de tratamiento dietético (Figura 15C, medidas repetidas ANOVA seguido de prueba de Newman-Keuls:  $p < 0.001$ , regímenes de control en comparación con regímenes de PRC). Además, encontramos 55 una diferencia significativa entre los grupos WT y 3xTg-AD, con los roedores 3xTg-AD perdiendo peso de forma gradual y leve en la semana 6-7 (Figura 15C, medidas repetidas ANOVA seguido de prueba de Newman-Keuls:  $p < 0.05$ , control 3xTg-AD frente a control WT y 3xTg-AD PRC frente a WT PRC). Teniendo en cuenta la caída gradual del peso corporal en el grupo de control 3xTg-AD, la pérdida de peso dependiente de la edad de los ratones 3xTg-AD PRC con la dieta PR parece depender principalmente de las mutaciones y no de la dieta. Tomados en conjunto, 60 estos datos indican que el régimen de PRC no se asoció con un bajo peso crónico tanto en ratones WT como en ratones 3xTg-AD, aunque sugieren que pueden ser necesarios períodos más prolongados de realimentación con dieta normal para permitir el mantenimiento del peso después de ciclos prolongados de restricción de proteínas.

A continuación, con el fin de investigar un posible impacto de CR en el régimen de dieta, se monitorizó la ingesta de 65 calorías al comienzo del tratamiento (semanas 1 y 2) y al final (semanas 17 y 18). Al comienzo del tratamiento (semanas 1 y 2), durante los siete días iniciales de la dieta PR (días 1-7), la ingesta calórica promedio se redujo en

un 24.3 % en ratones WT y un 24.2 % en ratones 3xTg-AD (Figura 21A, prueba t: F = 2.46 y 3.79 respectivamente, p < 0.001). Una dieta que carece de AA esenciales presenta una baja palatabilidad y la mayoría de los animales, incluidos los roedores, reducen su ingesta de alimentos después de ingerir alimentos que carecen de AA esenciales (Gietzen et al. 2007). Sin embargo, durante la realimentación (días 8-14 del ciclo PR) la ingesta calórica promedio se incrementó en un 22.5 % en ratones WT y en un 17.2 % en ratones 3xTg-AD (Figura 21A, prueba t: F = 1.53 y p < 0.01 para WT, F = 1.62 y p < 0.05 para 3xTg-AD). Se detectó un perfil de ingesta calórica similar al final del tratamiento (semanas 17 y 18). La ingesta calórica promedio se redujo en un 20.3 % en WT y un 10.5 % en ratones 3xTg-AD durante la alimentación con la dieta PR (Figura 21B, prueba t: F = 3.57 y p < 0.05 para WT, F = 27.78 y p > 0.05 para 3xTg-AD). Nuevamente, el período de realimentación se acopló con un aumento significativo del consumo calórico (Figura 21B, 40.1 % en WT y 25.3 % en 3xTg-AD prueba t: F = 3.47 y p < 0.001 para WT, F = 1.50 y p < 0.05 para 3xTg-AD).

La ingesta calórica promedio calculada combinando los valores para los períodos de PR y realimentación con dieta normal fue similar al promedio del régimen de control tanto para la primera como para la última semana del tratamiento (Figura 15D y 15E, prueba t, p > 0.05). Concluimos que el régimen de PRC se asoció con una CR modesta pero inevitable solo durante la fase de dieta de PR (aunque con un efecto decreciente a largo plazo), que oscilaba entre el 19 y el 17 % para WT y entre el 25.6 y el 13 % para 3xTg-AD, compensado por un aumento de la ingesta de calorías durante el siguiente período de realimentación de la dieta normal. El perfil de ingesta calórica de la intervención PRC fue diferente no solo del régimen de CR, sino también del ayuno intermitente (IR) (o alimentación en días alternos: EODF), otra restricción dietética que consiste en la privación de alimentos durante 24 horas en días alternos y se caracteriza por una reducción del 20-30 % de la ingesta calórica a lo largo del tiempo y efectos beneficiosos similares a la CR (Martin et al. 2006).

El régimen de PRC no provoca una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre. Los niveles de glucosa en sangre sufren cambios notables durante la restricción de alimentos. Por ejemplo, una CR prolongada del 20 al 40 % en roedores puede provocar una reducción de la glucosa en sangre del 20 al 40 % (Lee & Longo 2011). El régimen de PRC, sin embargo, no promovió un cambio significativo en los niveles de glucosa en sangre, pero provocó una tendencia a la reducción de la concentración de glucosa (17 % en ratones WT y 8 % en ratones 3xTg-AD) solo al final del período de alimentación con dieta PR (Figura 16A). Estos datos apoyan nuestra conclusión de que los efectos de la PRC no se deben a la CR.

El régimen de PRC reduce los niveles de IGF-1 circulante en un 30-70 %, IGFBP-3 en un 20-40 % y aumenta IGFBP-1 en 3-8 veces en ratones 3xTg-AD. Se ha demostrado que aproximadamente el 95 % del IGF-1 que actúa sobre el cerebro se deriva del hígado (Yamamoto & Murphy 1995). Aunque el IGF-1, su receptor y sus proteínas de enlace también están presentes y se producen localmente en el cerebro, el IGF-1 se transporta activamente a través de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, cambios en el IGF-1 circulante pueden provocar cambios en la entrada de IGF-1 al cerebro (Carro et al. 2000). La biodisponibilidad y bioactividad de IGF-1 está regulada por proteínas de enlace a IGF (IGFBP), una familia de seis proteínas que actúan como portadores de IGF (Jones & Clemons 1995). Entre las diferentes proteínas de enlace, IGFBP-3 e IGFBP-1 juegan un papel destacado en la biodisponibilidad de IGF-1.

La IGFBP-3 es cuantitativamente la IGFBP más representada, enlazando más del 80 % del IGF-1 circulante y protegiéndolo de la rápida degradación o eliminación del suero (Jones & Clemons 1995).

A diferencia de las otras IGFBP, IGFBP-1 inhibe la acción de IGF-1 enlazándose al mismo IGF-1 y previniendo su enlace a los receptores de IGF (Jones & Clemons 1995).

La medición de IGF-1 reveló que 3xTg-AD tenía niveles circulantes más altos de la hormona en comparación con WT (Figura 16B, prueba t: WT frente a 3XTg-AD, p < 0.05). En ratones 3xTg-AD, los niveles de IGF-1 se redujeron con el régimen de PRC no solo durante el período de dieta PR (Figura 16B, reducción del 70 %, control 3xTg-AD frente a PRC 3xTg-AD al final del ciclo de dieta PR, p < 0.001) pero también durante la realimentación con dieta normal (Figura 16B, reducción del 28 %, control 3xTg-AD frente a PRC 3xTg-AD al final del ciclo de realimentación con dieta normal, p < 0.001). Se detectó un efecto similar pero más débil en ratones WT al final de la dieta PR (Figura 16B, reducción del 44 %, control WT frente a PRC WT al final de la dieta PR, p < 0.05). Los niveles circulantes de IGFBP-3 disminuyeron significativamente con el régimen PRC al final de la dieta PR y los ciclos de realimentación en ratones 3xTg-AD (Figura 16C, reducción del 37 %, control 3xTg-AD frente a PRC 3xTg-AD al final del ciclo de PR, p < 0.001; reducción del 17 %, control de 3xTg-AD frente a 3xTg-AD PRC al final de la realimentación con dieta normal, p < 0.01). En ratones WT, aunque notamos una tendencia a una reducción durante la alimentación con la dieta de PR, la intervención de PRC no provocó cambios significativos en los niveles de IGFBP-3. Finalmente, en ratones 3xTg-AD, el régimen PRC promovió un aumento significativo de los niveles circulantes de IGFBP-1 al final del ciclo PR (Figura 16D, aumento de 8 veces, control 3xTg-AD frente a PRC 3xTg-AD al final de ciclo PR, p < 0.01). Aunque observamos una tendencia a un aumento de IGFBP-1 durante la dieta PR, el régimen PRC no provocó una modulación significativa de sus niveles séricos en ratones WT.

Tomados en conjunto, estos resultados indican claramente que 18-19 semanas de régimen PRC promovieron una fuerte modulación de IGF-1 e IGFBP cuyo efecto final fue una reducción de los niveles circulantes de IGF-1. El efecto fue mayor en ratones 3xTg-AD.

5 El régimen PRC alivia los déficits de memoria de trabajo dependientes de la edad en ratones 3xTg-AD. Para determinar si el régimen PRC está asociado con un mejor rendimiento cognitivo, realizamos el laberinto en Y (memoria de trabajo dependiente del hipocampo) tanto en ratones 3xTg-AD como WT. Los ratones se probaron antes del inicio de la intervención dietética (de 8 a 9 meses de edad) y cada mes del tratamiento. De acuerdo con la literatura (Rosario et al. 2006), los ratones macho 3xTg-AD de 8-9 meses de edad mostraron un deterioro cognitivo 10 detectable con el laberinto en Y en comparación con WT de la misma edad (Figura 17A ANOVA unidireccional:  $F = 3.46$ ,  $p < 0.05$  grupos 3xTg-AD frente al control WT). A la edad de 12.5-13.5 meses, los ratones de control 3xTg-AD todavía presentaban un déficit de memoria de trabajo significativo en comparación con los ratones WT, mientras que los ratones 3xTg-AD sometidos a 18 semanas de régimen PRC no lo hicieron, lo que indica un efecto de protección 15 proporcionado por la dieta (Figura 17B, ANOVA unidireccional:  $F = 3.46$ ,  $p < 0.05$  control 3xTg-AD frente a control WT). Curiosamente, después de 12 semanas de tratamiento, los ratones 3xTg-AD PRC todavía mostraban un déficit 20 de memoria significativo en comparación con WT, lo que sugiere que la intervención dietética puede requerir un período de latencia antes de ser efectiva (Figura 22A, ANOVA unidireccional:  $F = 2.41$ ,  $p < 0.05$  grupos 3xTg-AD frente al control WT). No encontramos diferencias significativas en el número de entradas de brazos entre los grupos WT y 3xTg-AD, lo que sugiere que las dietas no interfieren con los niveles de actividad de los roedores (Figura 23A, ANOVA unidireccional:  $F = 4.23$ ).

25 El régimen PRC alivia los déficits de memoria espacial a corto plazo en ratones 3xTg-AD. Los ratones descritos fueron probados para la memoria espacial a corto plazo usando la prueba de Reconocimiento de Objetos Nuevos (NOR). La prueba NOR se realizó una vez al final del tratamiento (edad: 12.5-13.5 meses de edad). La prueba se basa en el comportamiento natural de los roedores para explorar preferentemente objetos nuevos y se ha utilizado para estudiar la memoria espacial de trabajo en ratones 3xTg-AD (Gulinello et al. 2009). En el ensayo 1 de la prueba, se permitió a los roedores explorar una caja que contenía dos objetos idénticos y se registró el tiempo dedicado a explorarlos. Como era de esperar, no se detectó una preferencia significativa entre los dos objetos en los diferentes grupos experimentales (Figura 23B,  $p > 0.05$ , objeto A frente al objeto B, prueba t). Al final del ensayo, los 30 ratones fueron devueltos a sus jaulas de origen durante tres minutos, luego se colocaron nuevamente en la caja donde uno de los objetos fue reemplazado por uno nuevo (prueba dos) y el tiempo dedicado a explorar los objetos se registró nuevamente para calcular los valores de RI. Los ratones de control 3xTg-AD mostraron un RI significativamente menor en comparación con WT, mientras que los animales 3xTg-AD en régimen PRC no lo hicieron (Figura 17C, ANOVA unidireccional:  $F = 2.43$ ,  $p < 0.05$  control 3xTg-AD frente a control WT). Estos 35 resultados indican que la PCR puede aliviar los déficits de memoria espacial causados por las mutaciones 3xTg-AD en ratones.

40 El régimen de PRC no afecta la ansiedad en los ratones estudiados. Para funcionar correctamente, el CNS requiere los AA que se encuentran en la dieta, incluidos Triptófano, Fenilalanina, Tirosina, Histidina, Glutamina y Arginina, como sustratos para la síntesis de diversos neurotransmisores y neuromoduladores y la disponibilidad de algunos de ellos puede jugar un papel importante en regulación del estado de ánimo (Young 1996).

45 Para analizar el impacto de la dieta sobre la ansiedad, realizamos pruebas en ratones WT y 3xTg-AD en el laberinto en cruz elevado (EPM), una prueba utilizada para analizar modificaciones de comportamiento causadas por subnutrición proteica (Young 1996). La prueba se realizó antes del tratamiento (de 8 a 9 meses de edad) y después de 18 semanas de intervención dietética (de 12.5 a 13.5 años de edad) y se calificó el tiempo pasado en brazos abiertos. Pasar más tiempo en brazos abiertos refleja un menor nivel de ansiedad.

50 Antes de la intervención de la dieta no se detectó ninguna diferencia significativa en el parámetro calificado entre los grupos experimentales tanto en 3xTg-AD como en WT (Figura 22B, prueba t,  $F = 1.65$ ,  $p > 0.05$  control frente a PRC). Después de 18 semanas de tratamiento dietético, notamos una reducción en el tiempo que los roedores pasaban con los brazos abiertos, lo que indica un mayor nivel de ansiedad. La gran diferencia entre el parámetro calificado en la línea base y al final de la intervención dietética es común a todos los grupos experimentales y puede ser el resultado de la manipulación de los ratones. Sin embargo, todavía no detectamos ninguna diferencia significativa en el tiempo pasado en brazos abiertos (Figura 17D, prueba t,  $F = 2.45$ ,  $p > 0.05$  control frente a PRC). Aunque no podemos descartar por completo los posibles efectos secundarios sobre la regulación del estado de ánimo causados por la restricción de proteínas, estos resultados muestran que la intervención de la dieta no causa un cambio significativo en el nivel de ansiedad en los ratones tratados. El régimen PRC no reduce la acumulación de A $\beta$  en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Para determinar si el régimen PRC se acopló con una disminución en la 55 acumulación de A $\beta$  en el cerebro de ratones 3xTg-AD de edad avanzada, se hizo inmunotinción en secciones de cerebro usando un anticuerpo específico contra A $\beta$ . No encontramos ninguna diferencia significativa en A $\beta$  IR entre los regímenes de control y PRC ni en el subículo (Figura 18A, prueba t:  $F = 2.60$ ,  $p = 0.76$ ) ni en el CA1 (Figura 18B, prueba t:  $F = 1.73$ ,  $p = 0.87$ ) regiones del hipocampo. Además, no hubo diferencia en el número (Figura 18C, prueba t:  $F = 4.09$ ,  $p = 0.17$ ) o el tamaño de las placas A $\beta$  entre los grupos de dieta de control y PCR (Figura 18D, prueba t:  $F = 1.76$ ,  $p = 0.44$ ).

El régimen de PRC reduce la fosforilación de tau en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. Además de la acumulación de A $\beta$ , los ratones 3xTg-AD desarrollan una acumulación dependiente de la edad de tau fosforilada que se cree que es central en el deterioro cognitivo progresivo observado en AD. Para investigar el efecto del régimen PRC sobre los niveles de fosforilación de tau, cuantificamos el número de células inmunorreactivas con el anticuerpo AT8, que reconoce la fosforilación de la proteína tau en Ser 202 y 305 que está asociada con la patología de la AD (Goedert et al. 1995). Encontramos que los ratones sometidos al régimen PRC mostraron una reducción significativa en los niveles de tau fosforilada en comparación con los ratones alimentados con la dieta normal (Figura 19, prueba t: F = 1.31, p < 0.05). Estos resultados indican que PRC puede inhibir la fosforilación de tau independientemente o corriente abajo de A $\beta$ .

El régimen de PRC no reduce la activación de microglía en el hipocampo de ratones 3xTg-AD. A continuación, decidimos investigar si el régimen de PRC puede afectar la inflamación cerebral. La neuroinflamación es una característica destacada de la AD y se ha reportado de un aumento de los marcadores de activación de la microglía en modelos de roedores con AD, incluidos los ratones 3xTg-AD. Primero, cuantificamos la presencia de microglía activada en el hipocampo de los ratones estudiados utilizando el marcador específico de microglía CD11b. Nuestros datos confirmaron un aumento dramático del número total de células CD11b-ir en el hipocampo de ratones 3xTg-AD en comparación con WT (Figura 20A, \*\*\* = p < 0.001 control 3xTg-AD frente a control WT). Sin embargo, el número total de células CD11b-ir en ratones 3xTg-AD PRC no difirió del valor calificado en ratones 3xTg-AD alimentados con dieta normal (Figura 20A, p > 0.05 3xTg-AD PRC frente a 3xTg-AD control, \*\*\* = p < 0.001 3xTg-AD PRC frente al control WT).

En segundo lugar, cuantificamos la activación microglial en base a una clasificación morfológica de cuatro etapas que oscila desde células en reposo, ramificadas activadas, ameboideas, hasta fagocíticas (Zhang et al. 2011). Los ratones de control 3xTg-AD mostraron una prevalencia de etapas más activadas en comparación con WT (Figura 20B: etapa 1, control 3xTg-AD 20 % frente a control WT 42 %; etapa 3, control 3xTg-AD 35 % frente a control WT 22 %; etapa 4, control 3xTg-AD 7 % frente a control WT 1 %. \*\*\* = p < 0.001 control 3xTg-AD frente a control WT). Nuevamente, el régimen de PRC no influyó en la morfología de microglía en el hipocampo de ratones 3xTg-AD (Figura 20B, p > 0.05 3xTg-AD PRC frente al control 3xTg-AD, \*\*\* = p < 0.001 3xTg-AD PRC frente a control WT). Estos datos indican que el PRC no afecta a la fosforilación de tau ni a los defectos de comportamiento en ratones 3xTg-AD al alterar las vías proinflamatorias.

#### Discusión

Nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que los ciclos semanales de dieta normal y restricción de proteínas regulan los niveles circulantes de IGF-1 e IGFBP, pero también reducen la fosforilación de tau y alivian los déficits de memoria dependientes de la edad en un modelo animal de AD.

Aunque PRC no pudo revertir completamente el deterioro cognitivo en el modelo de ratón con AD, los resultados son importantes a la luz del hecho de que comenzamos el tratamiento con PRC en ratones que ya mostraban un deterioro cognitivo significativo y una patología tipo AD. Los ratones 3xTgAD alimentados con una dieta normal mostraron una memoria de trabajo y espacial obstaculizadas en comparación con los ratones de control no transgénicos. Por el contrario, los ratones 3xTgAD mantenidos en régimen PRC durante 18-19 semanas no se comportaron significativamente peor que los ratones WT. Además, cabe señalar que todas las pruebas de comportamiento se realizaron durante el período de realimentación de la dieta normal. Suponiendo una conexión entre el nivel de hormonas circulantes transitorias y el rendimiento de la memoria positiva, no podemos excluir que podamos obtener resultados aún mejores durante el ciclo de PR. Curiosamente, dos características importantes de la patología de la AD, la acumulación de A $\beta$  y activación de la microglía, no se modificaron en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD restringidos en proteínas. Por otro lado, encontramos que 3xTg-AD sometido al régimen PRC exhibió niveles reducidos de tau fosforilada en comparación con ratones 3xTg-AD alimentados con dieta normal. La evidencia indica una fuerte asociación entre los niveles de tau fosforilada y los déficits cognitivos en sujetos humanos afectados por AD y deterioro cognitivo leve (MCI) (de Leon et al. 2006). Una reducción de la fosforilación de tau puede aliviar el deterioro de la memoria, como indican los estudios realizados en modelos de AD (Roberson et al. 2007).

El efecto beneficioso de la fosforilación de tau reducida independientemente de la deposición de A $\beta$  puede explicarse por el hecho de que la patología de A $\beta$  precede a la patología de tau en este modelo de AD (Oddo et al. 2003). De hecho, mientras que la deposición de A $\beta$  está presente a los 6 meses de edad en el hipocampo de ratones 3xTg-AD, no es hasta aproximadamente 12 meses que la inmunorreactividad de AT8 para tau fosforilada es fácilmente detectable (Oddo et al. 2003). Por lo tanto, los niveles de A $\beta$  en cerebros 3xTg-AD pueden no haber sido influenciados por la intervención de PRC, como también se reportó en estudios anteriores sobre CR (Patel et al. 2005; Wang et al. 2005; Halagappa et al. 2007; Mouton et al. 2009), por el estadio avanzado de la patología A $\beta$  al inicio del tratamiento.

En los cerebros de 3xTg-AD, el A $\beta$  extraneuronal también precede a la activación de la microglía y juega un papel principal en el inicio de la inflamación (Kitazawa et al. 2005). Por lo tanto, el fallo de detectar un efecto beneficioso de la restricción de proteínas sobre la activación de la microglía, como se observó en estudios previos sobre CR

(Wang et al. 2005), puede deberse al inicio tardío de la intervención dietética o por los efectos de otros componentes de la dieta (glucosa, etc.) sobre la inflamación.

5 El régimen de restricción de proteínas se acopló a una modulación de niveles circulantes de IGF-1, IGFBP-3 e IGFBP-1 que, al menos en parte, podría ser responsable de la mejora del resultado en ratones AD.

10 Recientemente, hemos publicado sobre la incidencia reducida de cáncer y diabetes en sujetos deficientes en GHR e IGF-1 (Guevara-Aguirre et al. 2011), de acuerdo con los resultados de ratones enanos deficientes en GHR/IGF-1 y levadura deficiente en Tor/Sch9 (Brown-Borg et al. 1996; Coschigano et al. 2000; Fabrizio et al. 2001; Fontana et al.

15 2010). Aunque la población mundial conocida de GHRD es pequeña (menos de 400) y pocos de ellos han alcanzado edades por encima de los 90, todavía no se han reportado casos de AD por GHRD, lo que aumenta la posibilidad de que su sistema nervioso también pueda estar protegido del envejecimiento y demencia. Por lo tanto, los métodos que subregulan negativamente la señalización de GHR/IGF-1 deben probarse por su potencial para proteger contra el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad.

15 20 Por otro lado, IGF-1 es crítico en el mantenimiento del cerebro y está involucrado en aspectos principales del CNS, como el desarrollo neuronal y plasticidad. La disponibilidad local de IGF-1 en el cerebro puede desempeñar un papel neuroprotector en la AD aumentando la neurogénesis y la supervivencia neuronal y modulando el aclaramiento de A $\beta$  cerebral (Carro et al. 2002).

20 25 Nuestra medición de IGF-1 en suero mostró niveles significativamente más altos de la hormona circulante en ratones 3xTg-AD en comparación con el grupo WT. También se ha observado un aumento de IGF-1 circulante en pacientes con AD (Vardy et al. 2007) y puede ser causado por un intento de superar un estado de resistencia a la señalización de IGF-1 caracterizado por la pérdida de sensibilidad a la acción de la hormona (Carro & Torres-Aleman 2004).

25 30 Recientemente, Arnold y sus colaboradores proporcionaron una demostración directa de que el cerebro con AD es resistente a IGF-1 y demostraron que las formas activadas de moléculas corriente abajo de la señalización de insulina/IGF-1 están dramáticamente elevadas en el cerebro de los pacientes con AD (Talbot et al. 2012).

30 35 Aunque en este estudio no analizamos la señalización cerebral de IGF-1, especulamos que la reducción sistémica crónica en los niveles de IGF-1 inducida por el régimen de PRC puede aumentar la sensibilidad de IGF-1 en el cerebro de 3xTg-AD que conduce a un efecto beneficioso significativo sobre la cognición y la patología de tau. De acuerdo con nuestros resultados, los cortes organotípicos de hipocampos de ratones enanos Ames adultos, caracterizados por niveles elevados de proteína IGF-1 en el hipocampo y deficiencia de IGF-1 circulante, son resistentes a la hiperfosforilación de tau inducida por A $\beta$  (Schrag et al. 2008). Además, los ratones Ames y GHR-KO de edad avanzada muestran un mejor rendimiento de la memoria en comparación con WT de la misma edad (Kinney et al. 2001, Sharma et al. 2010) y los ratones Ames exhiben un aumento de la neurogénesis después de una agresión al hipocampo (Sharma et al. 2012), lo que sugiere que la reducción del IGF-1 circulante junto con un nivel más alto de la hormona en el cerebro puede proporcionar protección adicional y promover la función cognitiva a través de la proliferación neuronal.

40 45 50 En conclusión, los resultados presentados aquí muestran que el régimen PRC es una intervención capaz de aliviar síntomas tipo AD en ratones 3xTg-AD posiblemente modulando la fosforilación de tau. En particular, la intervención de la dieta no está acoplada a CR y no causa efectos secundarios aparentes en ratones 3xTg-AD. Estos hallazgos, combinados con el hecho de que la intervención dietética fue eficaz en ratones que ya mostraban síntomas significativos de tipo AD, plantean la posibilidad de que la PRC, más que la intervención de la CR, pueda traducirse clínicamente en un tratamiento a largo plazo para pacientes afectados por AD temprana moderada. Las condiciones de tratamiento aplicables a los pacientes deben establecerse determinando el período de tiempo necesario para tener cambios similares en IGF-1 e IGFBP-1 en humanos, como se logra mediante una restricción de proteínas de 1 semana en ratones. En el futuro, se necesitan más estudios para investigar más a fondo la seguridad de este prometedor tratamiento y para dilucidar su mecanismo de acción.

#### Procedimientos experimentales

##### Composición de la dieta

55 60 Se han utilizado las siguientes dietas experimentales:

- Dieta normal (Harlan Teklad LM-485, Indianapolis, IN, Estados Unidos).
- Dieta de restricción de proteínas (PR) (dieta que carece de 9 AA: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina) (Teklad, Indianápolis, IN, Estados Unidos).

65 A diferencia de la dieta normal, la dieta PR no contiene proteínas y las fuentes de nitrógeno están representadas únicamente por AA libre. Las dos dietas son similares en contenido de nitrógeno, por lo tanto, similares en densidad calórica (Tabla 2). Para mantener un contenido de nitrógeno equivalente en las dietas normales y de PR, equilibraron la falta de AA designados aumentando la cantidad de los restantes (Tabla 7).

Los mamíferos no pueden sintetizar AA esenciales de novo y, por tanto, deben suministrarse a través de la dieta. El agotamiento de AA esenciales a largo plazo puede causar graves problemas de salud y eventualmente conducir a la muerte. Se eligió un régimen de dietas alternas normales y de PR para superar el agotamiento crónico de AA esenciales. Se utilizaron los siguientes regímenes dietéticos (Figura 15A): Control (dieta normal), Ciclos de restricción de proteínas (PRC) (7 días de dieta de PR seguidos de 7 días de realimentación con dieta normal).

5 Ratones y diseño experimental

10 En este estudio se utilizaron ratones 3xTg-AD y los correspondientes ratones de tipo salvaje (WT) (C57BL/6/129S).

15 Los ratones 3xTg-AD sobreexpresan tres genes humanos que albergan mutaciones relacionadas con la AD (presenilina-1, APP) y demencia frontotemporal (tau), que dan como resultado el desarrollo tanto de placas A $\beta$ , como de ovillos de tau hiperfosforilados, así como también el deterioro cognitivo tipo Alzheimer dependiente de la edad (Oddo et al. 2003). Las colonias de los ratones descritos se criaron y mantuvieron en la Universidad del Sur de California de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de Salud sobre el uso de animales de laboratorio y un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad del Sur de California (Los Ángeles, CA). Se colocaron ratones macho 3xTg-AD y WT, uno por jaula (con el fin de controlar la ingesta de alimento) pocos días antes del comienzo del régimen de dieta. A la edad de 8-9 meses (a esta edad, los déficits cognitivos, como el deterioro de la memoria de trabajo, son detectables en ratones 3xTg-AD Figura 22A y (Rosario et al. 2006)) los animales 3xTg-AD y WT se dividieron en dos grupos (12-14 ratones por grupo) y asignados a los regímenes dietéticos descritos anteriormente.

20 25 Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos dietéticos con base en el peso corporal (peso corporal medio de 29.6 g para 3xTg-AD, 32.4 g para WT). Los roedores se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y se les proporcionó acceso ad libitum al agua y a las dietas descritas. Los alimentos se renovaron de acuerdo con el régimen dietético cada 2 o 3 días (día 0, 2 y 4 del ciclo de dieta de 7 días). Los animales se sometieron al régimen alternado durante 18 a 19 semanas.

30 35 Durante los diferentes regímenes dietéticos, se midieron semanalmente los pesos corporales. Además, el peso de los ratones y la ingesta de alimentos se midieron todos los días al inicio del tratamiento dietético, en la semana 1 y 2, y al final, en la semana 17 y 18. Ratones sometidos a los diferentes regímenes de dieta que no lograron recuperar peso durante el período de realimentación o mostraron signos de malestar se eliminaron del estudio (se excluyó un ratón 3xTg-AD del grupo Control y uno del grupo PRC).

40 45 Antes del inicio del tratamiento y cada 4 semanas durante el régimen dietético, se realizaron pruebas a los ratones con el laberinto en Y (memoria de trabajo dependiente del hipocampo) y laberinto en cruz elevado (detección de ansiedad). Al final de la intervención dietética, se realizaron pruebas a los animales también con la prueba de reconocimiento de objeto (memoria espacial a corto plazo). Con el fin de minimizar cualquier posible comportamiento anormal causado por la diferencia en las composiciones de la dieta, las pruebas de comportamiento se realizaron durante el período de realimentación de la dieta normal.

50 55 Al final del tratamiento con dieta, los ratones se sacrificaron bajo anestesia con isoflurano y se recolectaron sangre y cerebro. La sangre se recolectó mediante un corte de cola para medir la glucosa y mediante punción cardíaca para el análisis de hormonas. Todo el suero obtenido se mantuvo a -80 ° C hasta su análisis. El cerebro se dividió en dos: un hemisferio se diseccionó, se congeló y se almacenó a -80 ° C, el otro se fijó por inmersión en paraformaldehído fresco al 4 %/PBS 0.1 M durante 48 horas y luego se almacenó a 4 ° C en PBS 0.1 M/azida sódica al 0.2 %.

Medición de glucosa

50 Los niveles de glucosa se midieron antes del sacrificio, en sangre recolectada mediante un corte de cola usando un sistema de monitorización de glucosa en sangre Precision Xtra (Abbott, Abbott Park, IL, Estados Unidos).

Medición de IGF-1, IGFBP-3 e IGFBP-1

55 60 Los niveles de IGF-1 e IGFBP-3 en suero de ratón se midieron mediante ELISA de mIGF-1 y mIGFBP-3 internos, como se describió previamente (Hwang et al. 2008). El ensayo de IGF-1 tiene una sensibilidad de 0.1 ng/ml y no tiene reactividad cruzada con IGF-2. Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo fueron < 10 % en el intervalo de 1 a 10 ng/ml. El ensayo de IGFBP-3 de ratón tiene una sensibilidad de 0.2 ng/ml. Los CV de intraensayo e interensayo fueron < 6 % y < 8 %, respectivamente, en el intervalo de 1 a 6 ng/mL. Los niveles séricos de IGFBP-1 de ratón se midieron mediante ensayos ELISA internos usando proteínas de ratón recombinantes y anticuerpos de R&D Systems (MAB 1240 como anticuerpo de captura y BAF 1240 como anticuerpo de detección, R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos). El ensayo tiene una sensibilidad de 0.1 ng/ml y los CV de intraensayo e interensayo fueron < 10 %, respectivamente.

65 Pruebas de comportamiento:

## Laberinto en Y

Se evaluó la memoria de trabajo de 12-14 ratones por grupo usando un laberinto en Y (brazos de 21 cm (largo) por 4 cm (ancho) con paredes de 40 cm). Se les realizaron pruebas a los ratones antes de la intervención dietética, a la edad de 8-9 meses, y cada mes de tratamiento hasta la edad de 12.5-13.5 meses. La prueba comenzó colocando al roedor en uno de los brazos del laberinto. Se permitió que el ratón explorara libremente el entorno durante 8 minutos y se registró el número total de entradas de brazos y elecciones de brazos. La elección del brazo se definió cuando tanto las patas delanteras como las traseras entraron completamente en el brazo. La calificación del comportamiento de alternancia espontánea (SAB) se calculó como la proporción de alternancias (una elección de brazo diferente de las dos opciones anteriores) al número total de oportunidades de alternancia (Carroll et al. 2010; Rosario et al. 2006).

## Prueba de reconocimiento de objeto nuevo (NOR)

Se realizaron pruebas en 12-14 ratones por grupo para determinar la memoria espacial a corto plazo usando la prueba de reconocimiento de objeto nuevo (NOR). Las pruebas se realizaron en los ratones una vez al final del tratamiento dietético a la edad de 12.5-13.5 meses. El laberinto consiste en una caja de plástico opaco de 61 cm (largo) x 36 cm (ancho) x 30 cm (alto). La prueba se basa en el protocolo descrito por Gulinello y colaboradores (Gulinello et al. 2009). Brevemente, en el primer día de la prueba (día de habituación) los ratones se colocaron en la caja y se les permitió explorar el campo durante 5 minutos. Veinticuatro horas más tarde (día de la prueba), los ratones habituados se colocaron de nuevo en la caja en presencia de dos objetos idénticos, no tóxicos y se dejaron explorar libremente durante 5 minutos (prueba 1). Se registró el tiempo dedicado a la exploración de los objetos, considerando la exploración cualquier contacto físico con un objeto y/o acercamiento con orientación obvia al mismo dentro de 5 cm. Al final de la prueba 1, los animales se devolvieron a la jaula de origen. Después de 3 minutos, los ratones regresaron al campo de prueba donde uno de los objetos familiares fue reemplazado por un objeto nuevo. A los ratones se les permitió explorar la arena durante 5 minutos y se monitorizó nuevamente el tiempo para explorar los objetos. El índice de reconocimiento (RI) se calculó como el tiempo que los animales dedicaron a explorar el objeto nuevo al tiempo total que dedicaron a explorar ambos objetos.

## Laberinto en cruz elevado (EPM):

Se evaluó la ansiedad de 12-14 ratones por grupo usando un laberinto en cruz elevado (EPM). Se les realizaron pruebas a los ratones antes de la intervención dietética, a la edad de 8 a 9 meses, y cada mes de tratamiento hasta la edad de 12.5 a 13.5 meses. El EPM tiene la forma de una cruz formada por dos brazos alternos abiertos y dos brazos alternos cerrados que se extienden desde una plataforma central, cada brazo mide 30 cm de largo, 5 cm de ancho y 15 cm de alto (Carroll et al. 2010). La prueba se basa en el comportamiento exploratorio de los roedores, equilibrado por la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos. Evitar los brazos abiertos elevados es una indicación de la intensidad de la ansiedad. Durante la prueba, el ratón se colocó en el campo central y se le permitió explorar libremente el laberinto durante 5 minutos, y se midió el tiempo pasado en los brazos abiertos, correspondiente a niveles más bajos de ansiedad.

## Inmunohistoquímica

Se seccionaron exhaustivamente 8-10 hemicerebros fijos por grupo (40  $\mu$ m) en el plano horizontal usando un vibratomo Leica V1000S (Leica) y luego se procesaron para inmunohistoquímica. Cada séptima sección (10 por cerebro) se realizó inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra A $\beta$  (71-5800 A $\beta$ , Zymed Laboratories, San Francisco, CA, Estados Unidos), tau hiperfosforilado (AT8, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) o CD11b (MCA711, Serotec, Kidlington, Reino Unido) utilizando kits ABC Vector Elite y DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). Para todos los experimentos, la cuantificación de inmunorreactividad fue evaluada por dos observadores ciegos a la identidad de la muestra y se promediaron los valores.

A $\beta$ :

Para potenciar la inmunorreactividad (IR) de A $\beta$ , las secciones se enjuagaron durante 5 minutos en ácido fórmico al 99 %. Se calculó A $\beta$  IR como valores de carga. Brevemente, se capturaron y digitalizaron campos seleccionados de secciones de hipocampo no superpuestas inmunomarcadas (dos campos para el subículo y tres para CA1-Cornu Ammonis área 1) usando un sistema de captura de video acoplado a un microscopio. Con el software NIH Scion image 1.62C, las imágenes se convirtieron en datos binarios/negativos y se cuantificaron los píxeles positivos (equivalente al área IR) (Carroll et al. 2010). Además, las placas de A $\beta$  se definieron como depósitos inmunorreactivos de A $\beta$  extracelulares que exhiben una forma esférica y una morfología distinta de la A $\beta$  IR intraneuronal (Rosario et al. 2006). Para la cuantificación, se examinaron las regiones subiculares y CA1 del hipocampo combinadas de las secciones definidas anteriormente bajo microscopía óptica y se contó el número total de placas extracelulares. El área de cada placa se cuantificó utilizando el software ImageJ.

## Tau

Las neuronas inmunorreactivas de AT8 se definieron como células que muestran un fuerte inmunomarcado de AT8 sobre la mayor parte de la superficie celular. Las células positivas se contaron dentro de las regiones subiculares y CA1 del hipocampo combinadas (Carroll et al. 2010).

5 CD11b:  
Las células de microglía positivas inmunorreactivas para CD11b (ir) se definieron como células cubiertas por inmunotinción de CD11b sobre el cuerpo celular y procesos. Se contaron las células CD11b-ir en dos secciones 10 inmunomarcadas adyacentes no superpuestas (cinco secciones en total) del subículo del hipocampo y las regiones CA1 combinadas. Además, la etapa de activación de las células se identificó por su morfología. Brevemente, definimos cuatro etapas de activación de la microglía (Zhang et al. 2011):

- 15 • Etapa 1: Microglía en reposo. Soma en forma de varilla con muchos procesos ramificados largos y delgados.  
• Etapa 2: Microglía ramificada activada. Cuerpo celular alargado, los procesos son más gruesos.  
• Etapa 3: microglía ameboidea que muestra una hipertrofia celular marcada y procesos cortos y gruesos  
20 • Etapa 4: Células fagocíticas. Células redondas, los procesos no son detectables.

Se contaron las células CD11b-ir en las diferentes etapas de activación y se representaron gráficamente como porcentaje del número total de células ir.

25 Análisis estadístico  
Los cambios en el peso corporal y la ingesta de calorías a lo largo del tiempo se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Newman-Keuls. Los datos de comportamiento brutos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguida de comparaciones entre grupos utilizando la prueba de diferencia 30 significativa mínima de Fisher. Se utilizó la prueba T cuando fue adecuado. Todos los datos representan valores medios +/- SEM.

## REIVINDICACIONES

1. Un paquete de dieta para usar como medicamento que comprende:

- 5 un primer conjunto de raciones para una primera dieta que se administrará por un primer periodo de tiempo a un sujeto, la primera dieta proporciona de 4.5 a 7 kilocalorías por 0.45 kg (libra), por lo tanto 10.0 a 15.5 kilocalorías por kg, de sujeto para un primer día y de 3 a 5 kilocalorías por 0.45 kg (libra), por lo tanto 6.7 a 11.1 kilocalorías por kg, de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta, en donde el contenido calórico de la dieta del primer día es mayor que el contenido calórico de la dieta del segundo al quinto día, el paquete de la dieta incluye:
- 10 menos de 30 g de azúcar en el primer día;  
menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día;  
menos de 28 g de proteínas en el primer día;  
menos de 18 g de proteínas en el segundo al quinto día;
- 15 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día;  
10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día;  
entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día;  
3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día;  
menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día;
- 20 menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y  
12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.

2. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1, que comprende además un segundo conjunto de raciones para una segunda dieta que se administrará al sujeto durante un segundo período de tiempo, proporcionando la segunda dieta un consumo total de calorías que está dentro del 10 por ciento del consumo normal de calorías de un sujeto durante 25 a 26 días después de la primera dieta.

3. El paquete de dieta para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para uso en un método de regeneración de tejidos en un paciente que lo necesite.

30 4. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método para el tratamiento de inmunosupresión, inmunodeficiencia o inmunodepresión.

35 5. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método para el tratamiento del cáncer, una enfermedad inflamatoria, preferiblemente dermatitis cutánea, pérdida de densidad ósea o daño hepático.

40 6. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método para el tratamiento de un sujeto que requiera regeneración de células madre, células progenitoras o células madre de tipo embrionario, o regeneración de glóbulos blancos (WBC) o una regeneración equilibrada de proporción linfoide/mieloide análoga a la observada en mamíferos/humanos jóvenes y sanos.

45 7. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

45 8. El paquete de dieta para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método para el tratamiento de la osteoporosis.

50 9. El paquete de dieta para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 cuando depende de la reivindicación 2, en donde la combinación de la primera dieta y la segunda dieta proporciona al sujeto con un número total de calorías dentro del 10 por ciento de la ingesta calórica normal del sujeto.

55 10. El paquete de dieta para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la primera dieta incluye al menos el 50 % de la cantidad diaria recomendada de fibra dietética en todos los días.

55 11. Un método no terapéutico para modificar la dieta en un sujeto que necesita perder peso, que comprende: administrar una primera dieta a un sujeto por un primer período de tiempo, proporcionando la primera dieta de 4.5 a 7 kilocalorías por 0.45 kg (libra), por lo tanto, 10.0 a 15.5 kilocalorías por kg, de sujeto para un primer día y de 3 a 5 kilocalorías por 0.45 kg (libra), por lo tanto, 6.7 a 11.1 kilocalorías por kg, de sujeto por día durante un segundo a quinto día de la primera dieta, en donde el contenido calórico de la dieta del primer día es mayor que el contenido calórico de la dieta del segundo al quinto día; la primera dieta incluye:

menos de 30 g de azúcar en el primer día;  
menos de 20 g de azúcar en el segundo al quinto día;  
menos de 28 g de proteínas en el primer día;  
menos de 18 g de proteínas en el segundo al quinto día;

- 20 a 30 gramos de grasas monoinsaturadas en el primer día;  
10 a 15 gramos de grasas monoinsaturadas en el segundo al quinto día;  
entre 6 y 10 gramos de grasas poliinsaturadas en el primer día;  
3 a 5 gramos de grasas poliinsaturadas en el segundo al quinto día;  
5 menos de 12 g de grasas saturadas en el primer día;  
menos de 6 gramos de grasas saturadas en el segundo al quinto día; y  
12 a 25 gramos de glicerol por día en el segundo al quinto día.
- 10 12. El método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además administrar una segunda dieta durante un segundo período de tiempo, proporcionando la segunda dieta un consumo total de calorías que está dentro del 10 por ciento del consumo normal de calorías de un sujeto durante 25 a 26 días después de la primera dieta.

Ratón	Marcador	Control (16,5 meses)		FMD (16,5 meses, 1er ciclo)		FMD-realimentación (17 meses)	
				Efecto		Efecto	
Peso corporal (g)		36.62 ± 1.22		↓ 30.04 ± 0.62 ***		36.31 ± 0.71	
Ingesta de alimento (kcal)		14.25 ± 0.45		↓ 2.60 ***		15.68 ± 0.68	
Grasa corporal total (volumen rel.) (28 meses, 23 ciclos)		2232 ± 521		n.a.		808 ± 287	
Grasa corporal subcutánea (volumen rel.) (28 meses, 23 ciclos)		566 ± 149		n.a.		369 ± 86	
Grasa corporal visceral (volumen rel.) (28 meses, 23 ciclos)		1727 ± 403		n.a.		404 ± 187 *	
Humanos Marcador		<u>Línea base</u>		<u>Ciclo #1</u>		<u>Ciclo #3</u>	
Peso corporal (% comparado a la línea base)		100		↓ 95.69 ± 0.38 ***		94.38 ± 0.35 ***	
Grasa del tronco (% comparado a la línea base)		100		n.a.		96.89 ± 3.70	

Tabla 9. Efectos de dieta que imita el ayuno (FMD) en la composición corporal de ratones y humanos.

Fig. 1

Ratón	Marcador	Control		FMD		FMD-realimentación	
			Efecto		Efecto		Efecto
	<b>Incidencia de cáncer (%)</b>	66,7		0,0		39,3 ***	
	<b>Inicio del cáncer (edad en meses)</b>	23,3 ± 0,7		0,0		28,8 ± 0,7 **	
	<b>Glucosa (mg/dl) (18 meses 3 ciclos)</b>	180,6 ± 4,2	↓	101,4 ± 8,1 ***	↓	170,2 ± 11,4	
	<b>IGF-1 (ng/ml) (20,5 meses 8 ciclos)</b>	321,8 ± 22,7	↓	205,8 ± 25,3 ***	↓	323,3 ± 28,6	
	<b>IGFBP-1 (ng/ml) (20,5 meses 8 ciclos)</b>	5,2 ± 0,9	↑	46,0 ± 2,9 ***	↑	5,2 ± 0,6	
Humano	Marcador	<u>Línea base</u>		<u>Ciclo #1</u>		<u>Ciclo #3</u>	
			Efecto		Efecto		Efecto
	<b>Glucosa (mg/dl)</b>	90,6 ± 2,7	-	86,5 ± 3,7	-	88,3 ± 1,2	
	<b>Cortisol (% comparado a la línea base)</b>	100	-	203,9 ± 63,3	-	134,7 ± 40,4	
	<b>IGF-1 (ng/ml)</b>	145,3 ± 22,7	↓	104,4 ± 24,1 *	↓	122,7 ± 17,2 *	
	<b>IGFBP-1 (ng/ml)</b>	24,8 ± 4,3	↑	58,3 ± 17,0 *	↑	46,6 ± 16,3	

Tabla 10. Efectos de dieta que imita el ayuno (FMD) en biomarcadores sanguíneos

Fig. 2

Ratón	Marcador	Control		FMD-realimentación	
			Efecto		
	Incidencia de inflamación (%)	20.0	↓	7.1 *	
	Incidencia de dermatitis (%)	13.6	↓	10.3 *	

Tabla 11. Una dieta que imita el ayuno reduce inflamación en roedores.

Fig. 3

Ratón	Tejido	Marcador	Mediana edad (12 meses)		Viejo (28 meses)		FMD-realimentación (28 meses, 24 ciclos)	
			Hueso	Densidad mineral (Fémur) ( $\text{mg/cm}^3$ )	Efecto	Viejo	Efecto	Viejo
				1995 $\pm$ 6	↓	1834 $\pm$ 22 ***	↓	1923 $\pm$ 9 *** *

Tabla 12. Efecto de dieta que imita el ayuno (FMD) en la densidad mineral ósea.

Fig. 4

Ratón	Tejido	Marcador	Control (20-22.5 meses)		FMD (7-11 ciclos)		FMD-realimentación (7-11 ciclos)	
			Efecto		Efecto		Efecto	
Hígado	Peso (g)	1.5 ± 0.04	↓	1.0 ± 0.13 **		~	1.7 ± 0.03	
	ALT (U/L)	16.9 ± 1.25	↑	30.5 ± 3.14 **		~	16.7 ± 1.67	
Humano			<u>Línea base</u>		<u>Ciclo #1</u>		<u>Ciclo #3</u>	
	Tejido	Marcador		Efecto		Efecto		
Hígado	ALT (U/L)	20.6 ± 3.22	~	21.6 ± 4.36		~	19.7 ± 6.69	

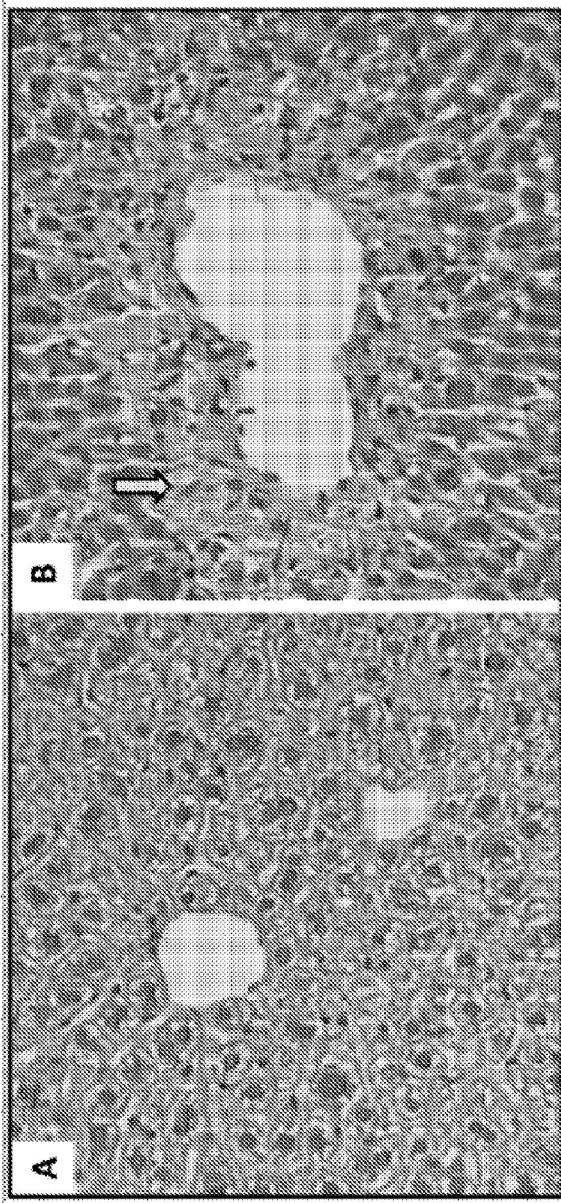


Tabla 13. Efecto de dieta que imita el ayuno (FMD) en el hígado.

Fig. 5

<b>Medula ósea de ratón</b>			
		HSPCs (%)	MSC/EPC (%)
<b>Línea base</b>		0.25 ± 0.09	0.01 ± 0.01
<b>Ayuno</b>	Ciclo # 1	0.25 ± 0.06	0.02 ± 0.01
	Ciclo # 2	0.50 ± 0.16	0.02 ± 0.01
<b>FMD</b>	Ciclo # 12	0.36 ± 0.18	0.05 ± 0.01
<b>Sangre periférica humana</b>			
		HSPCs (%)	MSC/EPC (%)
<b>Línea base</b>		0.01 ± 0.01	0.92 ± 1.30
<b>FMD</b>	Ciclo # 1	0.16 ± 0.14	5.57 ± 5.30
	Ciclo # 3	0.26 ± 0.26	2.24 ± 3.10
	realimentación	0.29 ± 0.22	4.04 ± 5.31

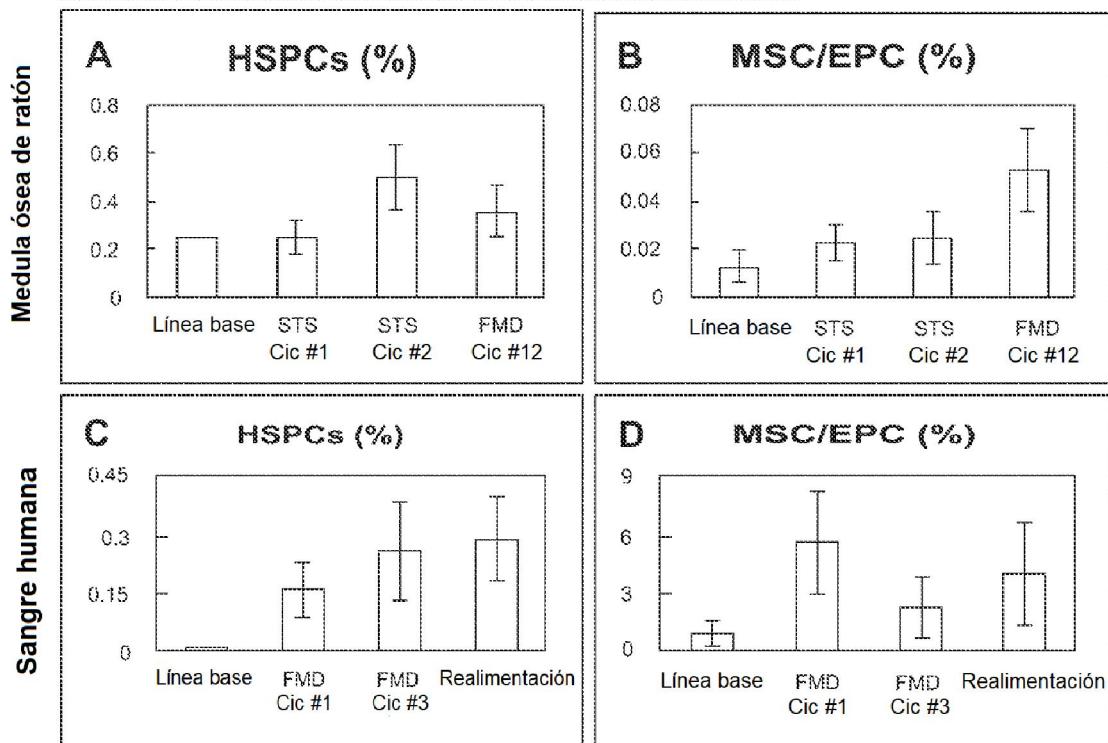


Tabla 14. Ciclos de inanición a corto plazo (STS) o una dieta que imita el ayuno (FMD) estimulan las células madre/progenitoras en ratones y sujetos humanos.

Fig. 6

Ratón (después de 8 ciclos)		Quimioterapia		Ayuno + Quimio	
	Línea base		Efecto		Efecto
WBC ( $10^3/\mu$ )	10.26 ± 4.27	↓	5.26 ± 1.95	~	10.32 ± 5.23
Linfocitos ( $10^3/\mu$ )	7.89 ± 2.09	↓	2.05 ± 1.22	~	7.84 ± 3.17
L/M	2.65 ± 0.50	↓	1.36 ± 0.12	~	2.11 ± 0.60
Humano (después de 2 ciclos)					
	Línea base		Quimioterapia		Ayuno + Quimio
			Efecto		Efecto
WBC ( $10^3/\mu$ )	6.90 ± 3.69	↓	3.85 ± 0.72	~	6.04 ± 3.31
Linfocitos ( $10^3/\mu$ )	1.96 ± 0.71	↓	0.94 ± 0.41	~	1.98 ± 0.38
L/M	0.55 ± 0.19	↓	0.38 ± 0.26	~	0.70 ± 0.51

Tabla 15. Ciclos de ayuno mejoran la regeneración hematopoyética en ratones y sujetos humanos después de mielosupresión inducida por quimioterapia.

Fig. 7

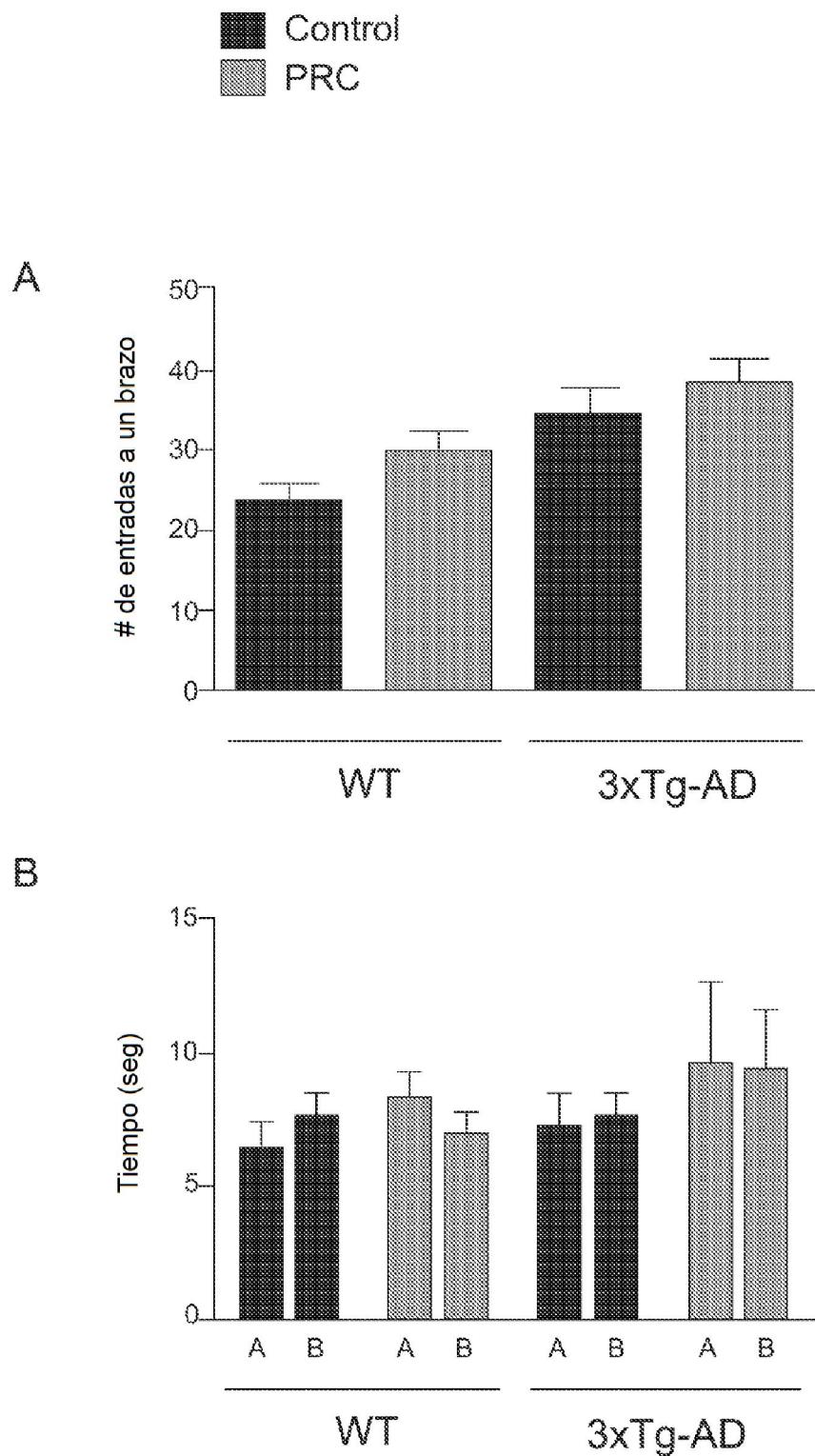


Fig. 23

<b>Ratón</b> (12-20 ciclos de FMD)				
<b>Edad</b> (mes)	<b>Control</b>		<b>FMD</b>	
	<i>Efecto</i>	<b>L/M</b>	<i>Efecto</i>	<b>L/M</b>
4		<b>2.96 ± 1.14</b>		
16	↓	0.55 ± 0.28	~	1.27 ± 0.76
20	↓	0.51 ± 0.13	~	2.63 ± 3.27

<b>Humano</b> (1 ciclo completo de FMD)				
<b>Edad</b> (años)	<b>Control</b>		<b>FMD</b>	
	<i>Efecto</i>	<b>L/M</b>	<i>Efecto</i>	<b>L/M</b>
<20		<b>0.52 ± 0.22</b>		~
20-40	↓	0.41 ± 0.13	~	0.46 ± 0.13
40-60	↓	0.39 ± 0.11	~	0.50 ± 0.13
>60	↓	0.33 ± 0.04		<i>no medido</i>

Tabla 16. Ciclos de una dieta que imita el ayuno (FMD) mejoran la regeneración hematopoyética en ratones y sujetos humanos y retrasan la mielo supresión dependiente de la edad.

Fig. 8

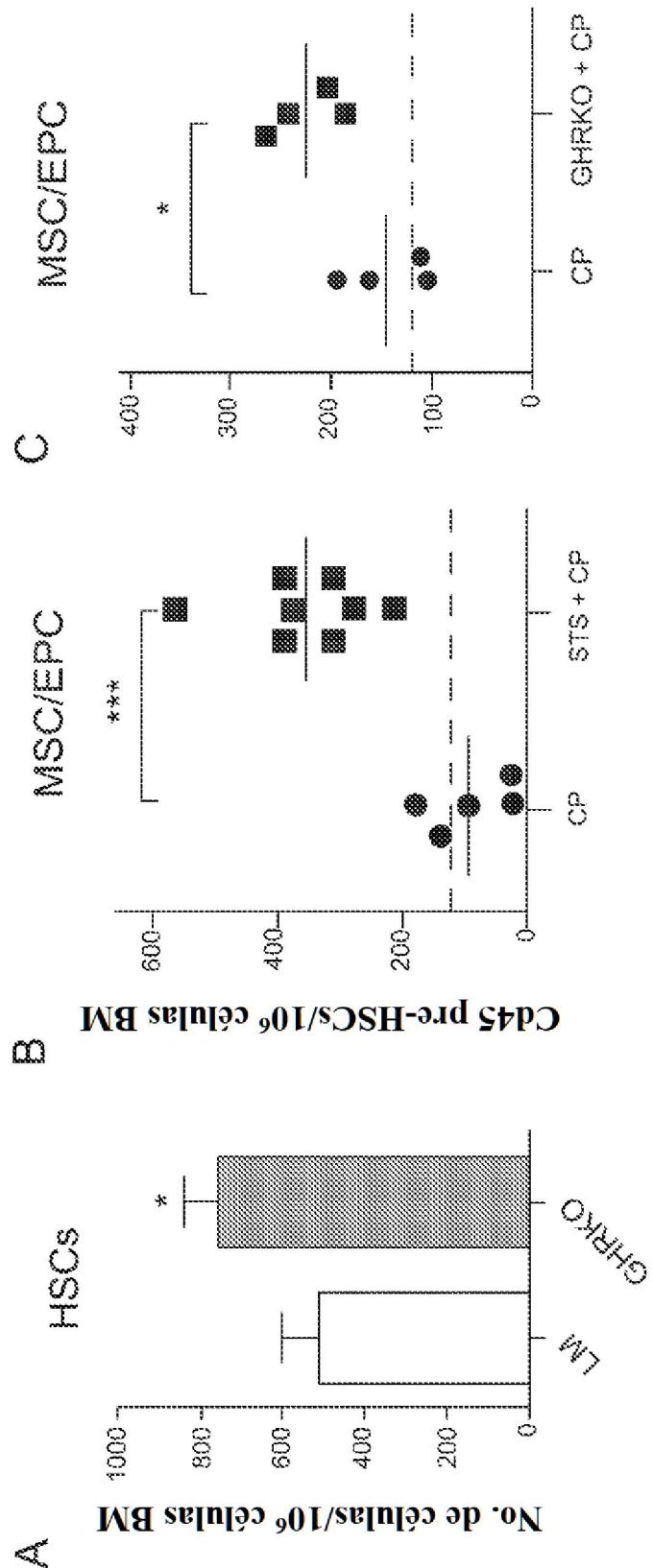


Fig. 9

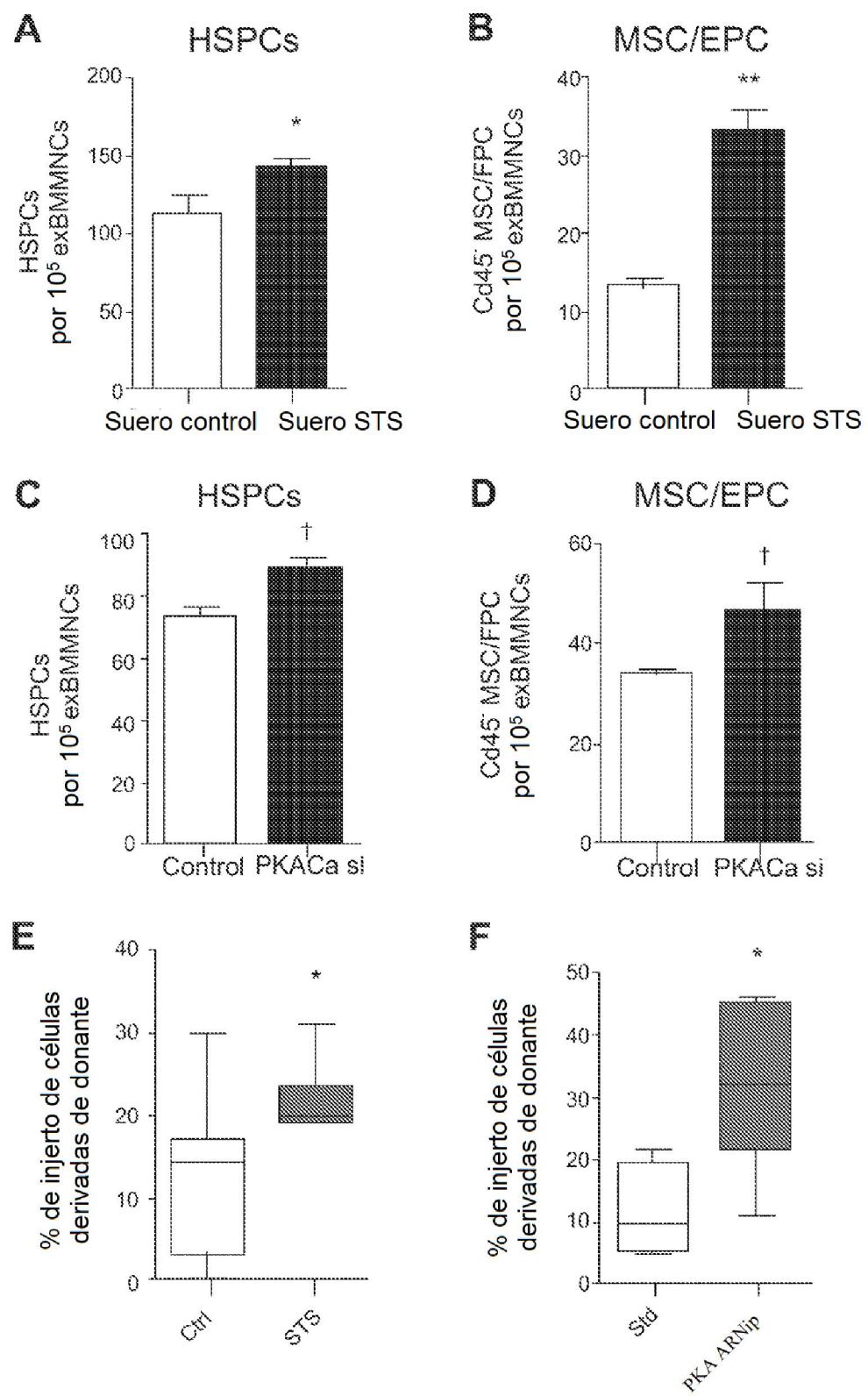


Fig. 10

Ratón	Tejido	Marcador	Control (23 meses)	FMD-realimentación (13 ciclos)
<b>Cerebro</b>				<i>Efecto</i>
Zona sub granular	Índice proliferativo (BrdU)	24.0 ± 10.7	↑	72.0 ± 8.8 *
Circunvolución dentada	Neuronas inmaduras (DCX)	711.0 ± 50.0		1010.0 ± 184.0
	Doble positivo (BrdU/DCX)	3.1 ± 3.1	↑	17.6 ± 4.4 *

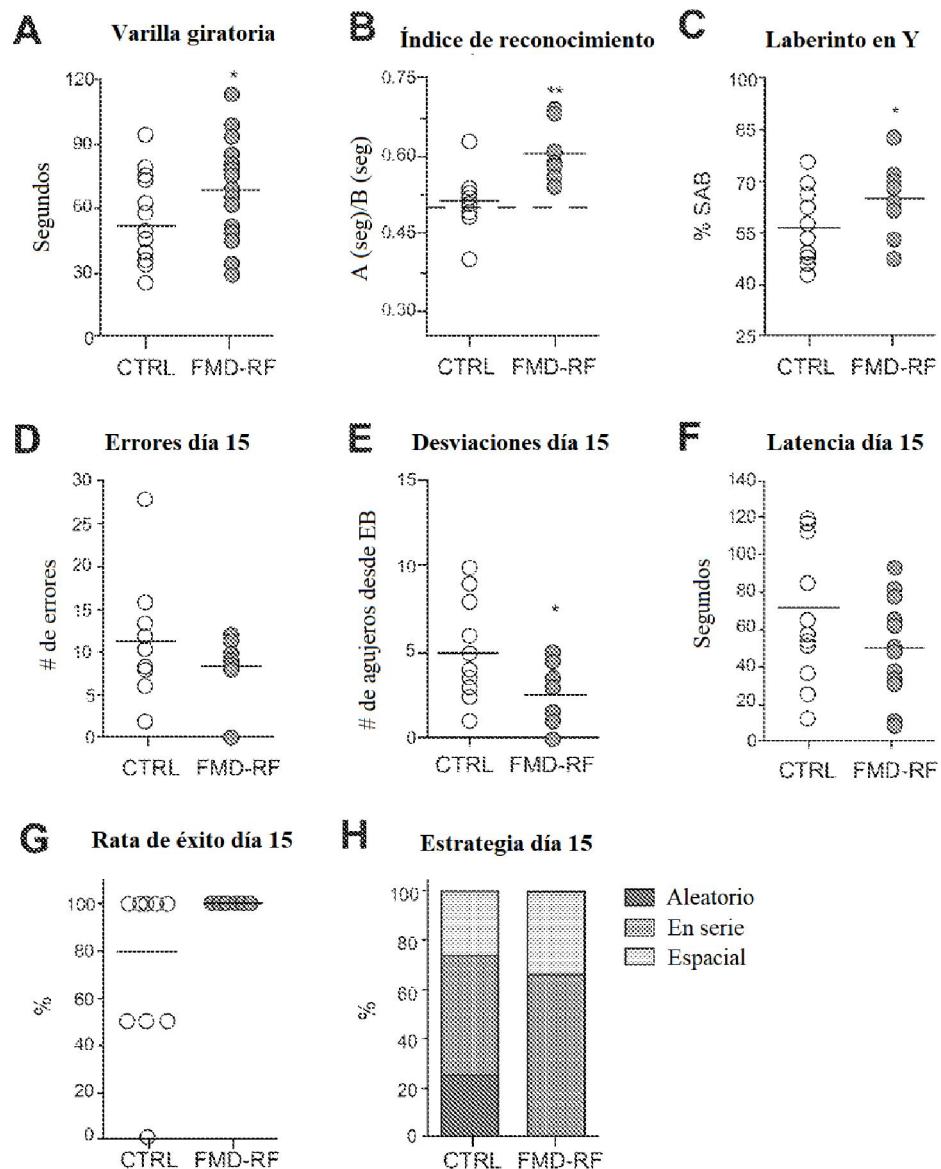


Tabla 17. Efecto de dieta que imita el ayuno (FMD) en el cerebro y funciones cognitivas.

Fig. 11

Peso corporal	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	$\Delta 5\text{-día 1}$	$\Delta 5\text{-día 2}$
<i>kcal/día</i>							
>200 lbs	1170	828	768	810	833	-5591	-9591
161-200 lbs	1134	790	737	774	795	-5772	-7772
≤150 lbs	1098	751	706	738	756	-5952	-5952

Peso corporal	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	$\Delta 5\text{-día 1}$	$\Delta 5\text{-día 2}$
<i>kcal/lb</i>							
250 lbs	4.7	3.3	3.1	3.2	3.3		
200 lbs	5.7	3.9	3.7	3.9	4.0		
150 lbs	7.3	5.0	4.7	4.9	5.0		

Peso corporal	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	$\Delta 5\text{-día 1}$	$\Delta 5\text{-día 2}$
<i>kcal/kg</i>							
113 kg	10.3	7.3	6.8	7.1	7.3		
91 kg	12.5	8.7	8.1	8.5	8.8		
68 kg	16.1	11.0	10.4	10.8	11.1		

<sup>1</sup> con base en una dieta de 2,000 calorías por día

<sup>2</sup> con base en dietas de 2,800, 2,400 y 2,000 calorías por el peso de la persona  $\geq 200$ , 150-200, y  $\leq 150$  lbs, respectivamente.

Tabla 18. La dieta que imita el ayuno (FMD), Prolon, fue desarrollada por el L-Nutra para inducir una respuesta tipo ayuno mientras se maximiza la nutrición.

Fig. 12

	<b>Día 1</b>	<b>Día 2,3,4,5</b>
<b>Calorías totales</b>	1152	809
Grasa	56%	46%
Carbohidrato	34%	46%
Azúcar	10%	9%
Proteína	10%	9%

Tabla 19. El contenido de macronutrientes para cada día del régimen FMD de 5 días con base en una persona promedio de 180-200 lbs

*Fig. 13*

	Unidad	Día 1	% DV*	Día 2,3,4,5	% DV*	Promedio % DV
Proteína	g	29		18		
Grasa	g	72		41		
Carb (por dif)	g	98		91		
de azucares	g	29		17.6		
Fibra dietética	g	22	86%	14	56%	62%
Calcio	mg	604	60%	426	43%	46%
Hierro	mg	13	77%	10	55%	60%
Magnesio	mg	387	97%	230	58%	65%
Fosforo	mg	390	39%	276	28%	30%
Potasio (K)	mg	2519	72%	1795	51%	55%
Sodio (Na)	mg	2427	101%	1750	73%	79%
Zinc	mg	7	46%	4.2	28%	32%
Cobre	mg	1.5	76%	1.2	59%	63%
Manganoso	mg	3	148%	1.9	95%	105%
Selenio	mcg	7	10%	5.3	8%	8%
Vit A	IU	39254	785%	27549	551%	598%
Vit C	mcg	236	393%	137	229%	261%
Vit B1 Tiamina	mg	4	209%	2.2	113%	132%
Vit B2 Riboflavina B2	mg	3.8	191%	2	109%	126%
Vit B3 Niacina	mg	28.5	143%	18	92%	102%
Vit B5 Ácido pantoténico	mg	1.2	12%	1.0	10%	10%
Vit B6 Fosfato de piridoxal	mg	4.0	200%	2.2	111%	129%
Vit B9 Folato	mg	479	120%	317	79%	87%
B12 Cobalamina	mcg	16	227%	16	227%	227%
Vit D	IU	952	238%	952	238%	238%
Vit E	mcg	25	127%	16	80%	89%
Vit K	mg	1795	2243%	1110	1387%	1559%

Tabla 20. El contenido de micronutrientes para cada día del régimen FMD de 5 días con base en una persona promedio de 180-200 lbs.

*Fig. 14*

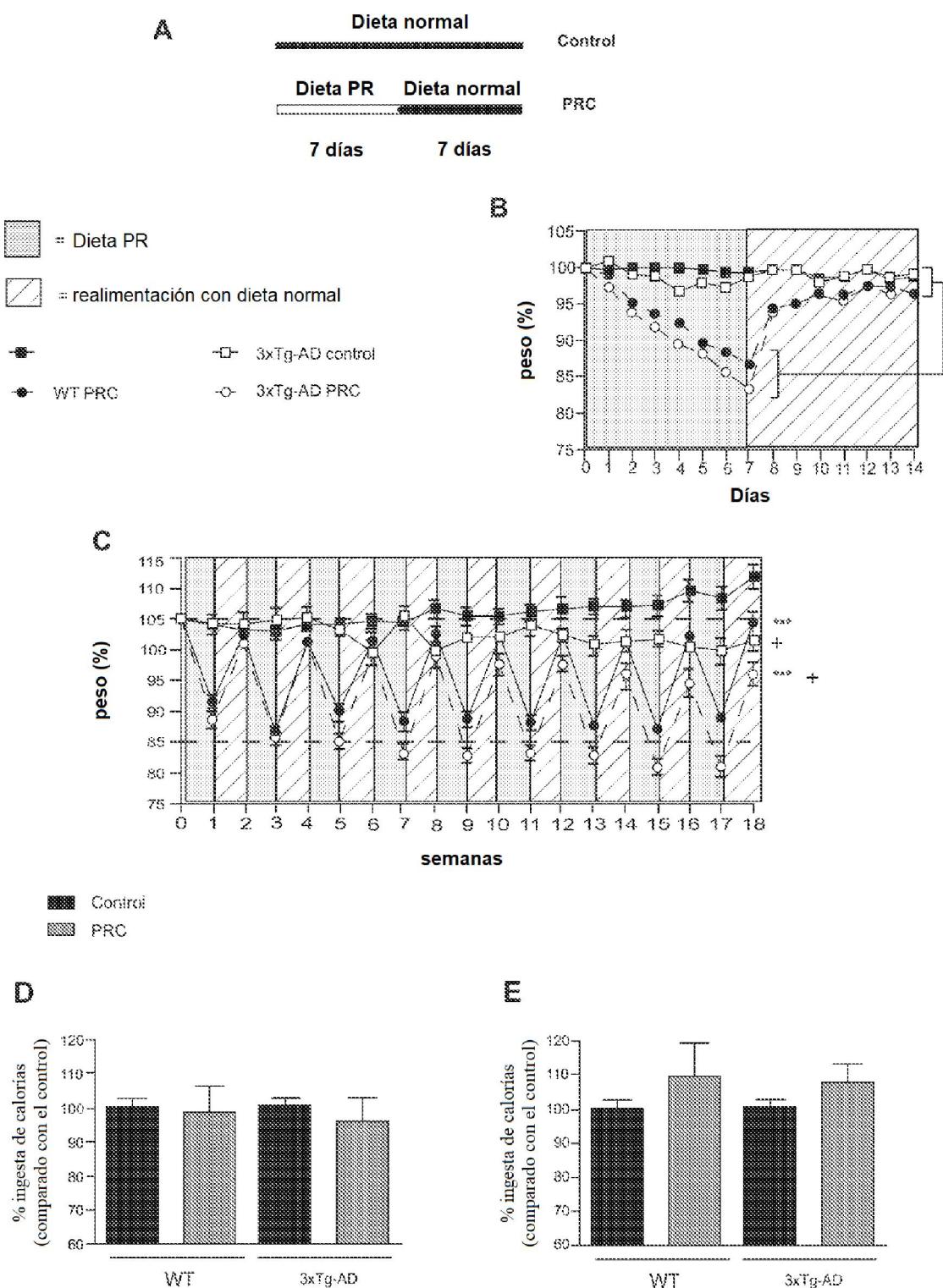


Fig. 15

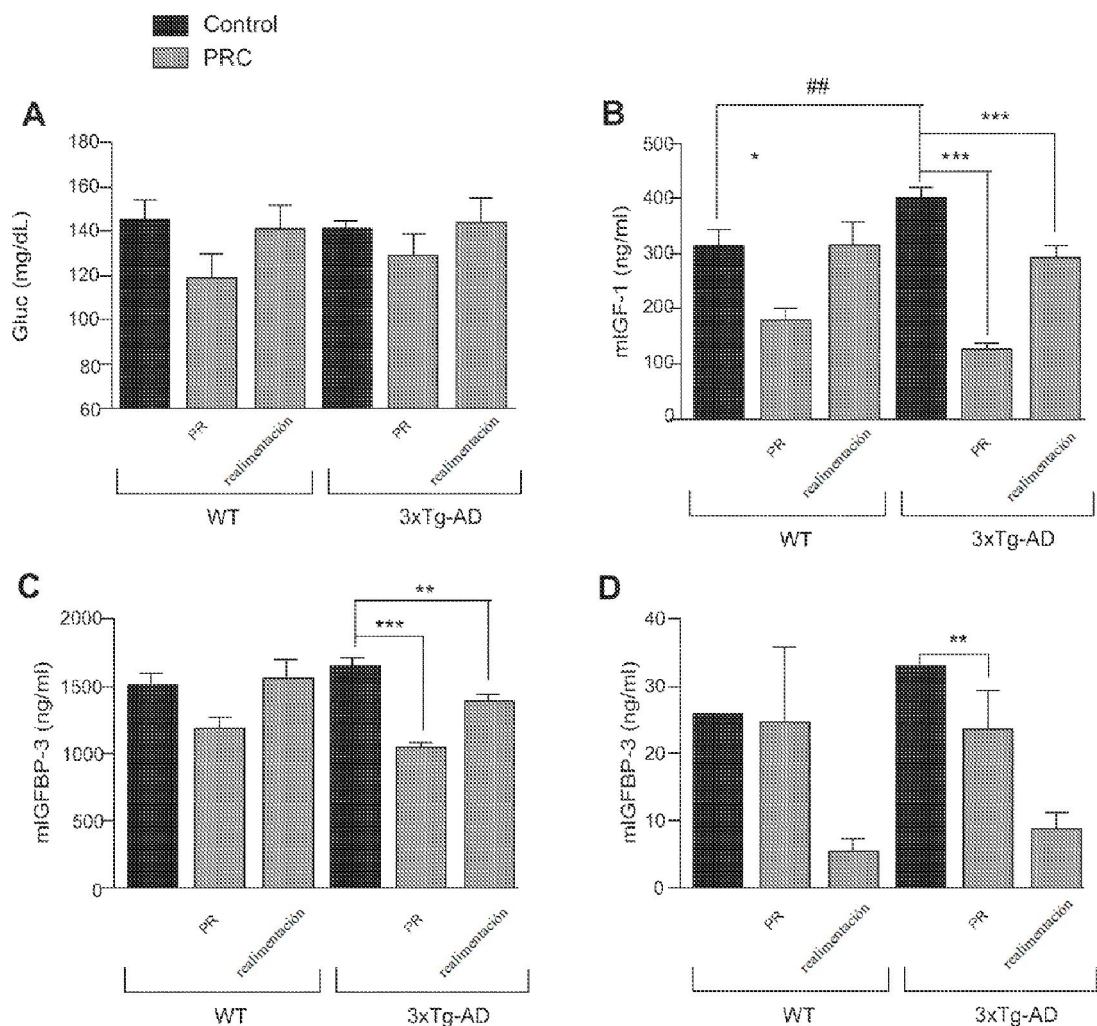


Fig. 16

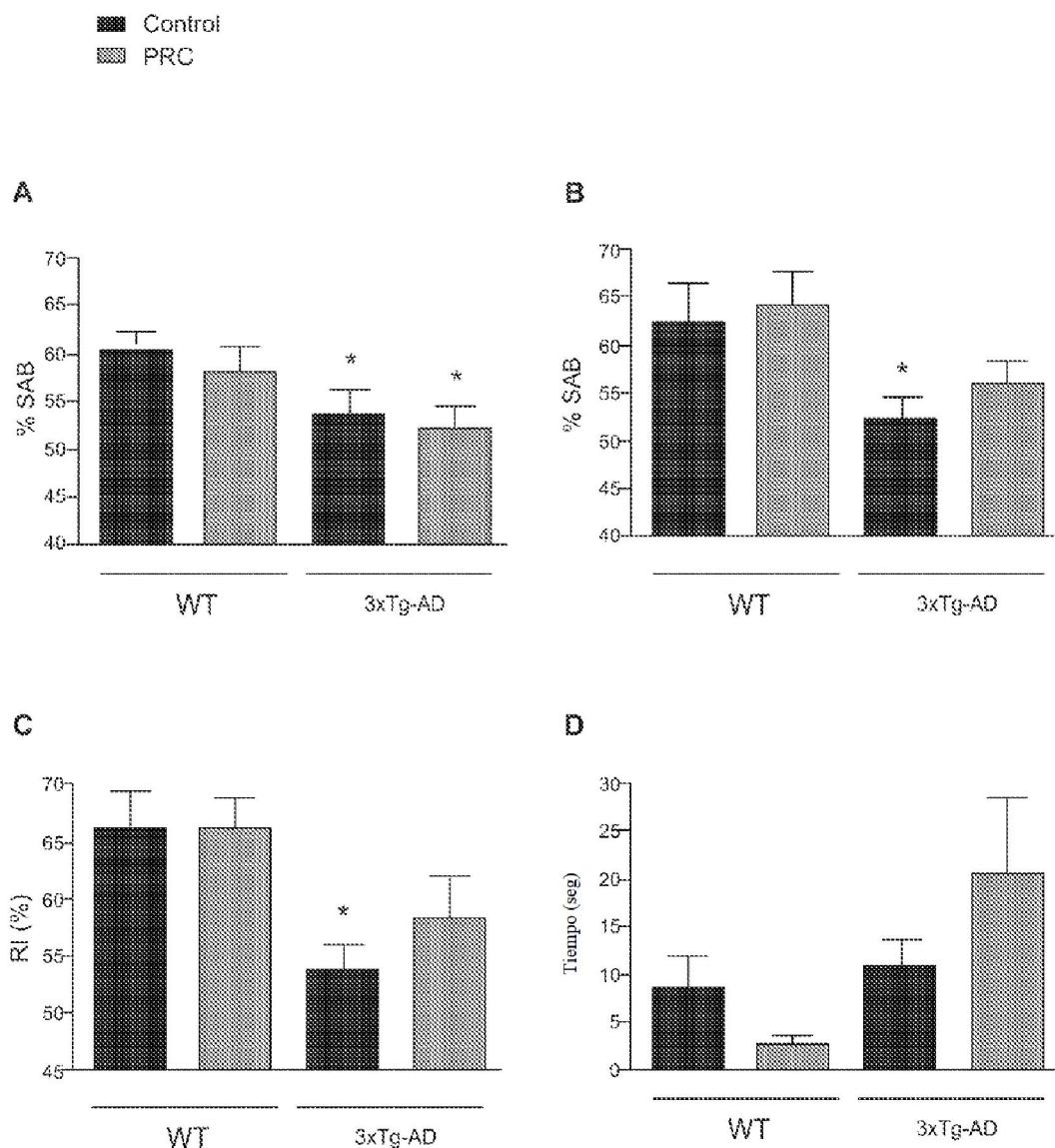


Fig. 17

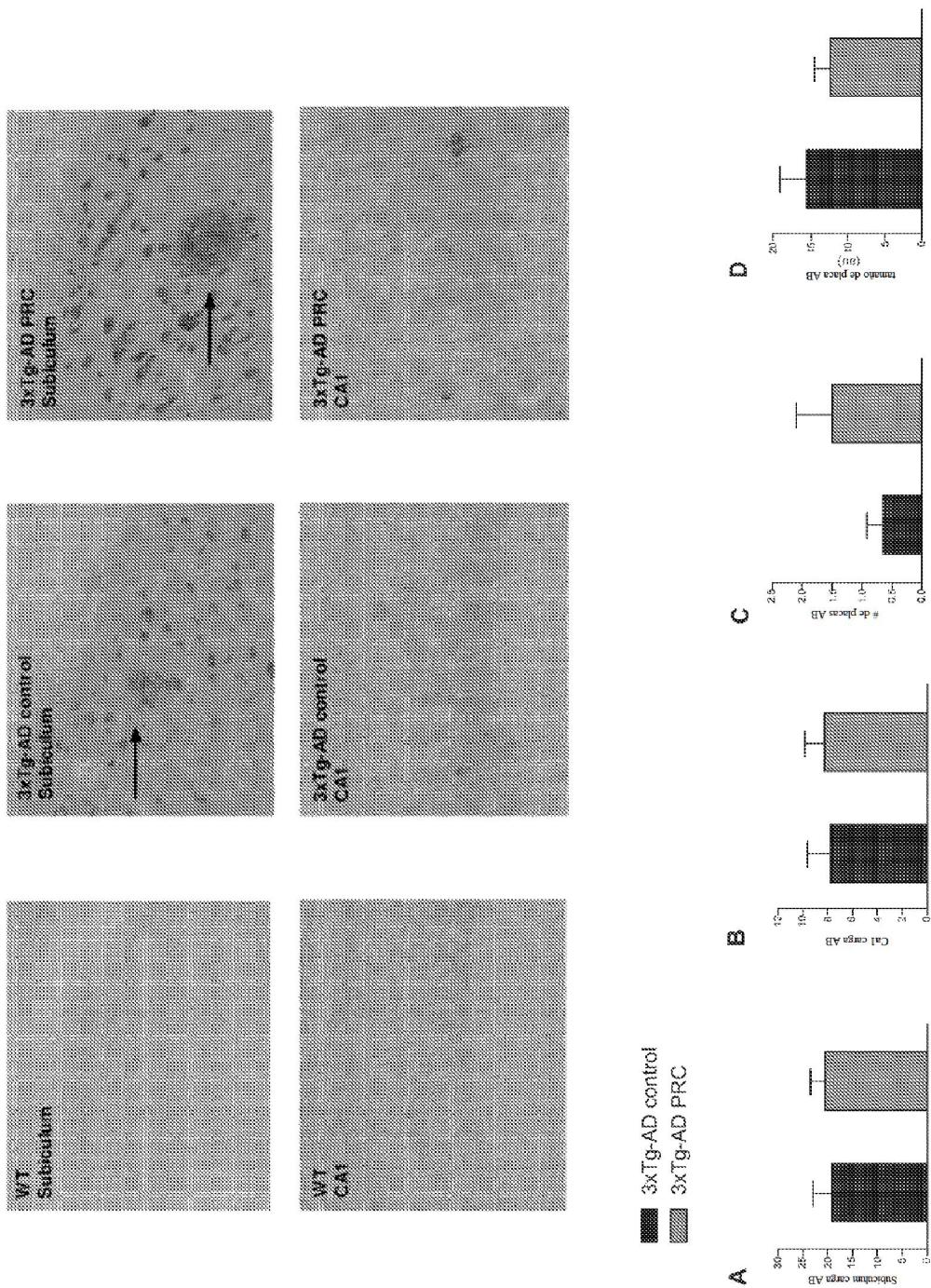


Fig. 18

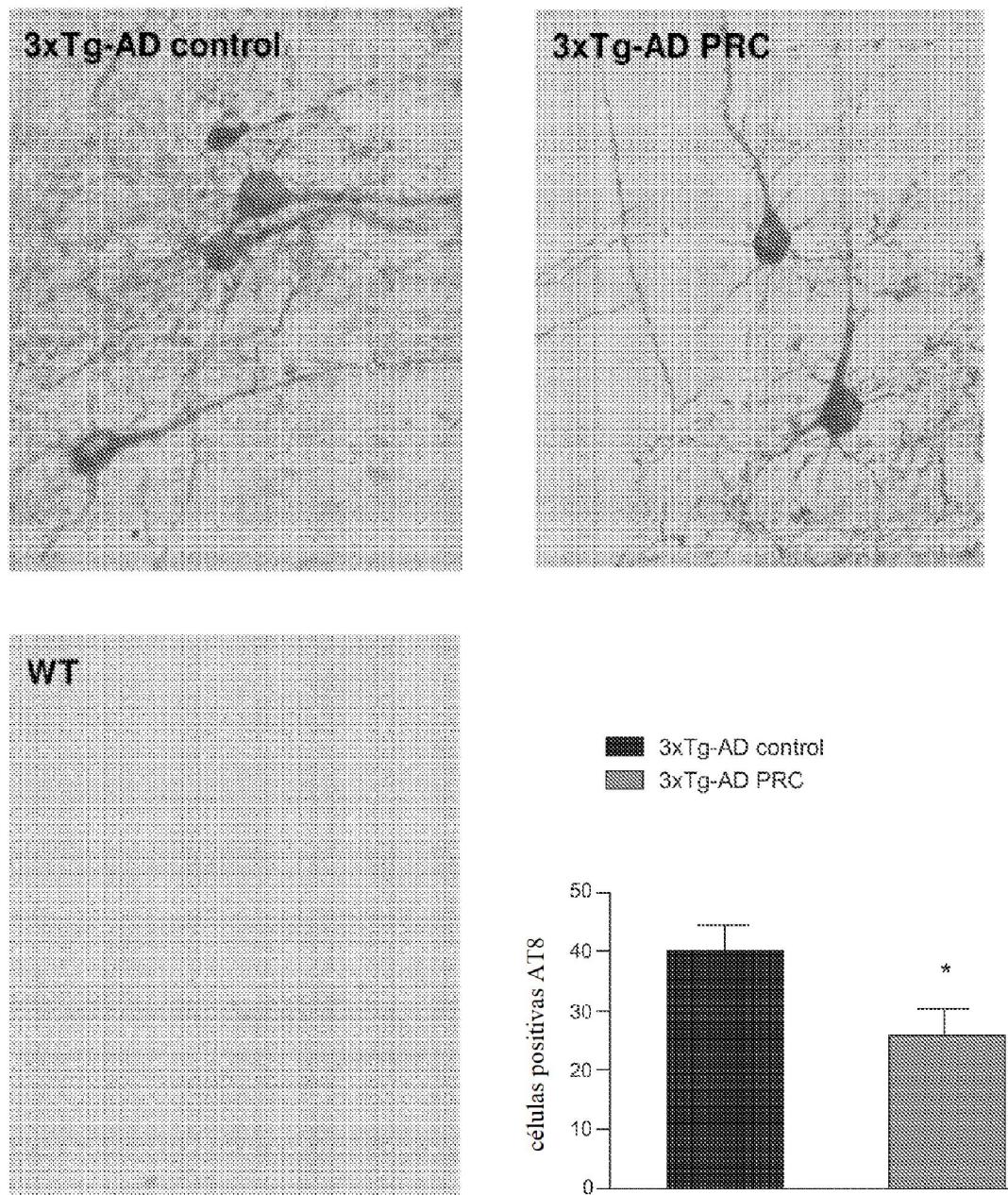


Fig. 19

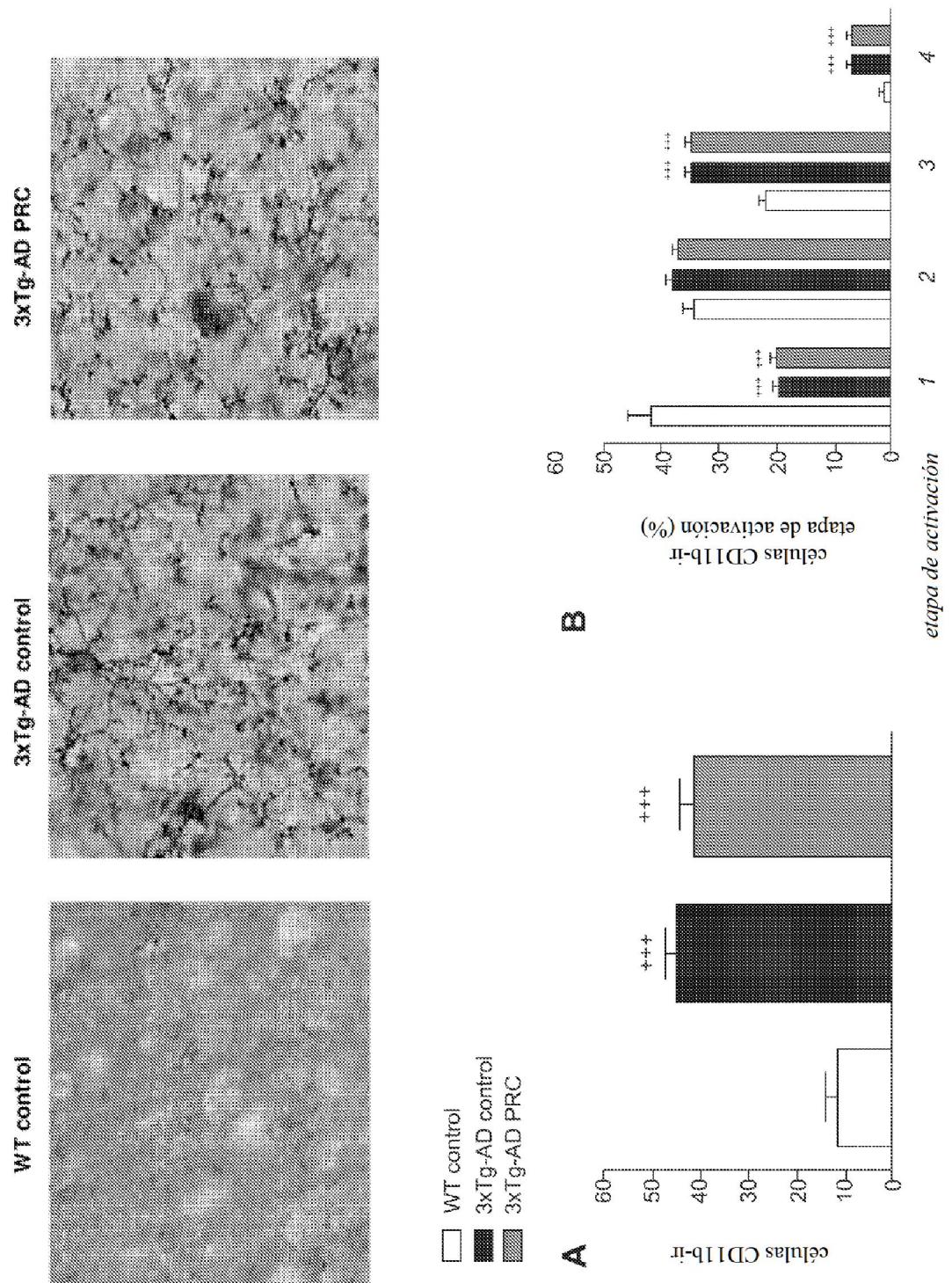


Fig. 20

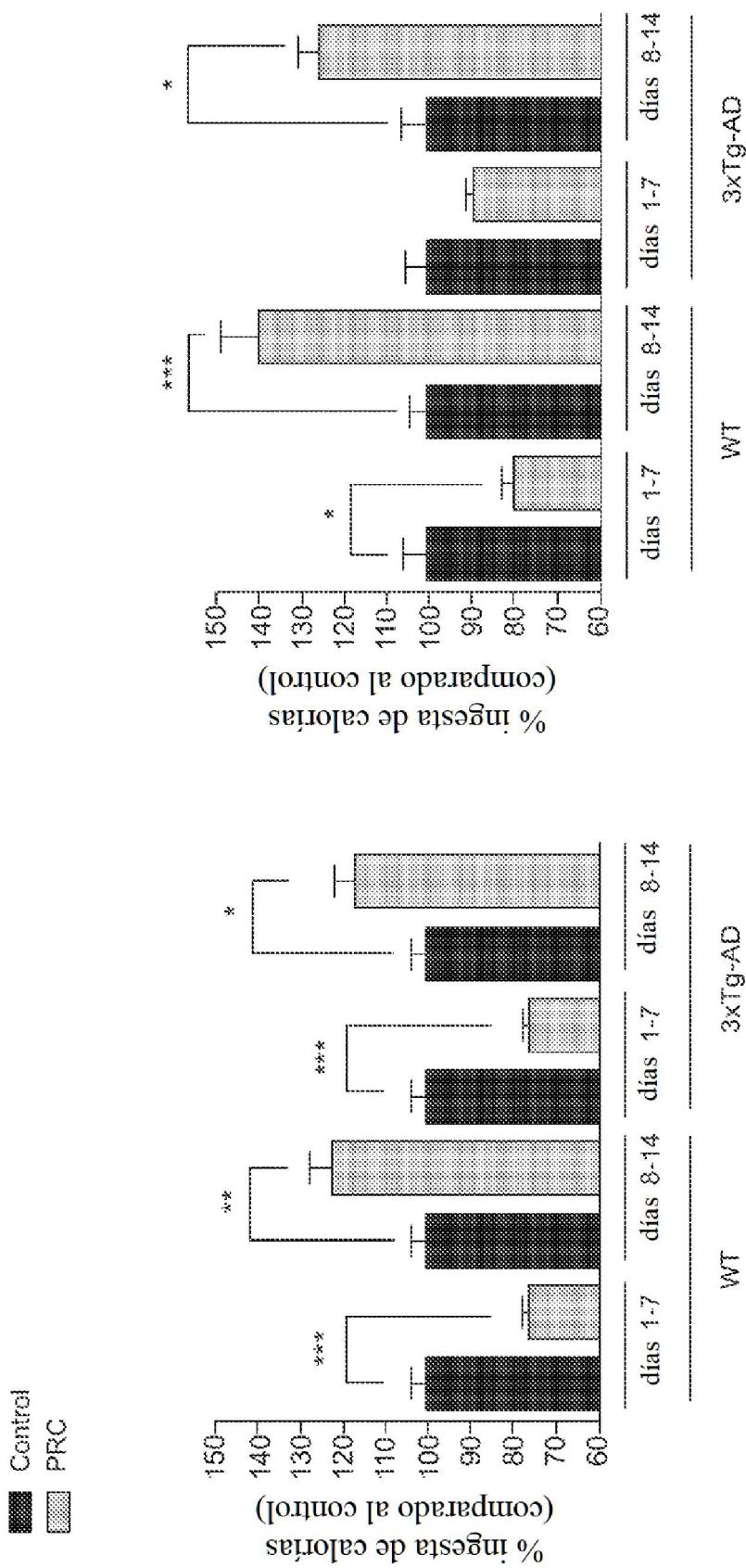


Fig. 21

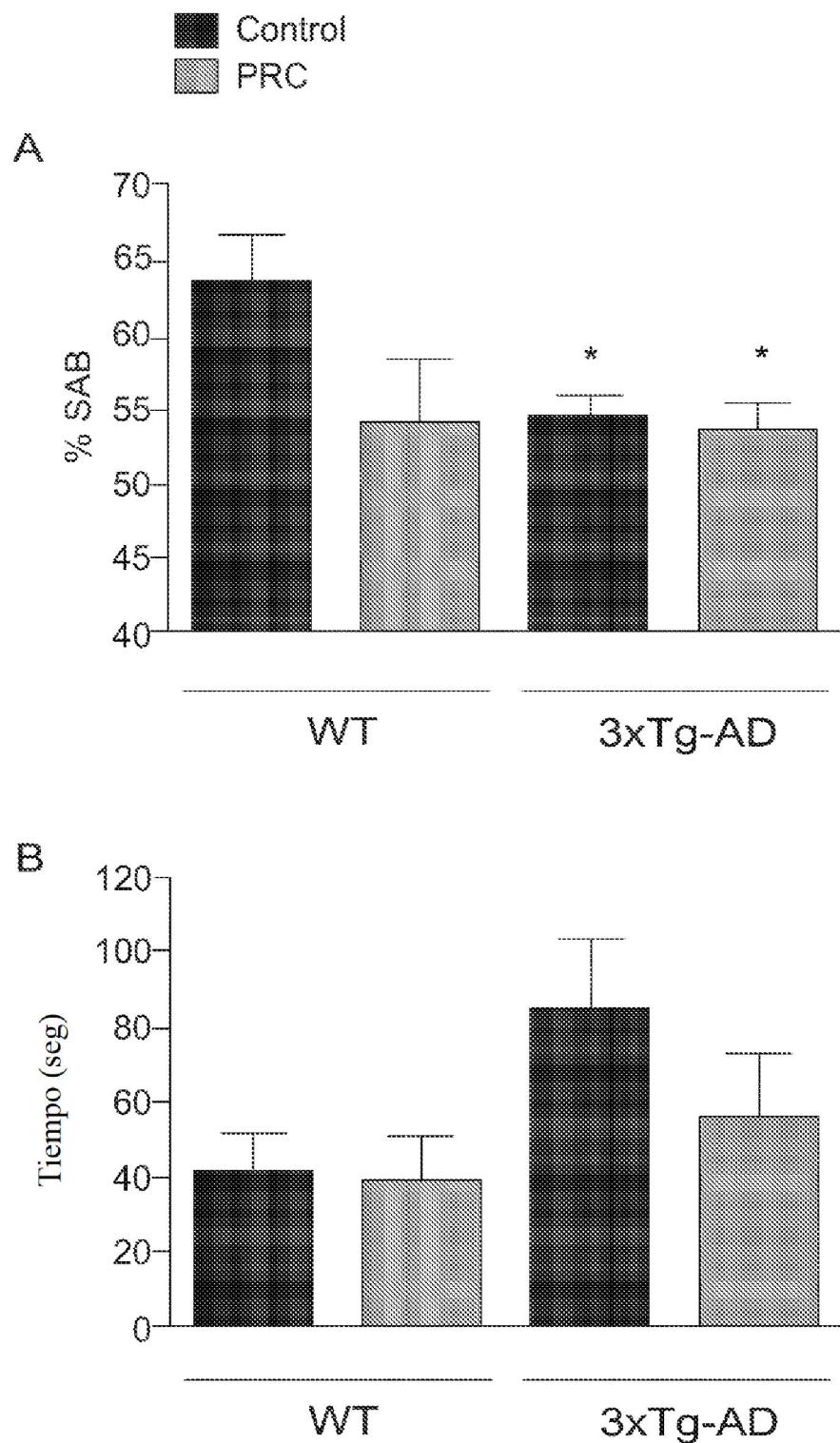


Fig. 22