



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Autorizo a la Facultad de Química de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: MURGUIA MECA  
PILAR FERNANDA  
FECHA: 15-OCT-2002  
FIRMA: [Firma]

EFFECTO DE LA PROTEINA DE SOYA SOBRE LA EXPRESION GENICA DE ALGUNAS ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS DURANTE EL SINDROME NEFROTICO CRONICO EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

PILAR FERNANDA MURGUIA MECA



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES 2002  
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

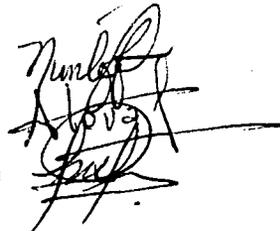
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	<b>Profra. Irma Ofelia Bernal Lugo</b>
<b>Vocal</b>	<b>Profra. Luz del Carmen Castellanos Román</b>
<b>Secretaria</b>	<b>Profra. Nimbe Torres y Torres</b>
<b>1er. Suplente</b>	<b>Profra. Raquel Ortega Muñoz</b>
<b>2o. Suplente</b>	<b>Profra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera</b>

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

<b>Asesora:</b>	<b>Dra. Nimbe Torres y Torres</b>
<b>Supervisor Técnico:</b>	<b>Dr. Armando Tovar Palacio</b>
<b>Sustentante:</b>	<b>Pilar Fernanda Murguía Meca</b>

Handwritten signatures in black ink, corresponding to the names listed in the table. The signatures are stylized and overlapping.

**"Las cosas científicas se demuestran y enseñan mediante principios; los hechos, a través de la experiencia"**

**A. Gaudí**

## **DEDICATORIAS**

**Principalmente quiero dedicar mi trabajo a mis papás, por que el esfuerzo de todos estos años es más de ustedes que de nadie.**

**A Meche, por que mi cansancio lo hiciste tuyo y así me fue más sencillo continuar.**

**A la Chapa, por que te solidarizas conmigo en los enojos y siempre tienes el comentario más práctico.**

**Gracias a los cuatro que siempre han estado y estarán conmigo.**

**Al Juan Jo Plata, por tu objetividad y amor, y por que me muestras que el motor para seguir adelante es uno mismo.**

**A mi recién adquirido hermano Gro., por saber escuchar y siempre estar dispuesto a ayudar.**

**A todos mis amigos por entender mi genio y así quererme.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la UNAM y a la Facultad de Química, por las vivencias que me dejaron.**

**A la Dra. Nimbe Torres y Torres por mostrarme que la dedicación es esencial para el conocimiento.**

**Al Dr. Armando Tovar Palacio por su apoyo y conocimientos.**

**A Eduardo Marambio por mostrarme el significado del apoyo desinteresado.**

**A Víctor por enseñarme el amor al laboratorio y por permitirme conocer a un verdadero amigo.**

**A Héctor Orozco por su amistad y apoyo no sólo para este trabajo.**

**A Tino Cruz (Tinito) por su ayuda y risas en largas jornadas de trabajo.**

**A Octavio Villanueva por su buen humor, optimismo y a el cuidado a mis animalitos.**

**A mis compañeros del laboratorio de Nutriología Molecular porque también fueron parte de esto.**

**A mis ratas por el regalo de su vida.**

**....y a la Zorra por su insistencia, que siempre no pudo faltar.**

**GRACIAS A TODOS**

**Este trabajo de investigación se llevó a cabo  
en el Área de Nutriología Molecular del  
Departamento de Fisiología de la Nutrición  
de la Dirección de Nutrición  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas  
y Nutrición Salvador Zubirán.**

**La realización de este trabajo de  
investigación fue posible gracias  
al financiamiento otorgado por  
CONACyT-Omnilife 2000 No. 0050  
y por la Asociación Americana  
de la Soya.**

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Generalidades sobre la soya	2
1.1.1	La proteína de soya y la salud	4
1.1.2	Mecanismos propuestos para el efecto de la soya en los lípidos	6
1.2	Generalidades sobre el síndrome nefrótico	8
1.2.1	Fisiopatología del SN	9
1.2.2	Generalidades del aminonucleósido de puromicina (ANP)	12
1.3	Metabolismo de lípidos	14
1.3.1	Biosíntesis de ácidos grasos	14
1.3.2	Biosíntesis del colesterol	18
II.	JUSTIFICACIÓN	25
III.	HIPÓTESIS	26
IV.	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo General	27
4.2	Objetivos Específicos	27
V.	METODOLOGÍA	29
5.1	Diagrama de bloques	29
5.2	Diseño del estudio	30
5.3	Tipo de estudio	30
5.4	Consideraciones éticas	31
5.5	Animales y muestras	31
5.6	Preparación de dietas	33

<b>5.7 Determinación del peso corporal</b>	<b>34</b>
<b>5.8 Determinación del consumo de alimento</b>	<b>34</b>
<b>5.9 Determinaciones bioquímicas en orina</b>	<b>34</b>
<b>5.9.1 Proteínas totales</b>	<b>34</b>
<b>5.9.2 Depuración de creatinina</b>	<b>35</b>
<b>5.10 Determinaciones bioquímicas en suero</b>	<b>35</b>
<b>5.10.1 Albúmina</b>	<b>35</b>
<b>5.10.2 Nitrógeno de urea en suero (BUN)</b>	<b>36</b>
<b>5.10.3 Creatinina</b>	<b>36</b>
<b>5.10.4 Colesterol</b>	<b>37</b>
<b>5.10.5 Triglicéridos</b>	<b>37</b>
<b>5.10.6 Perfil de lipoproteínas</b>	<b>37</b>
<b>5.11 Análisis histológico y morfométrico</b>	<b>38</b>
<b>5.11.1 Técnicas histológicas</b>	<b>39</b>
a.) Tinción de hematoxilina y eosina	39
b.) Tinción tricrómica de Masson	40
c.) Reacción del ácido periódico de Schiff (PAS)	41
<b>5.12 Northern blot</b>	<b>42</b>
<b>5.12.1 Preparación de sondas</b>	<b>43</b>
a.) Diseño de oligonucleótidos para las enzimas del metabolismo de lípidos y receptor de LDL	43
b.) RT-PCR	46
1. Reacción de la Transcriptasa Reversa (RT)	46
2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
c.) Electroforesis del producto de RT-PCR	49
d.) Electroelución de los productos de RT-PCR	50
e.) Cuantificación de sondas	51
<b>5.12.2 Extracción de RNA por TRIZOL</b>	<b>52</b>
<b>5.12.3 Cuantificación de RNA</b>	<b>53</b>

5.12.4 Electroforesis de RNA	54
5.12.5 Fotografía del gel	56
5.12.6 Transferencia de RNA del gel a la membrana	56
5.12.7 Hibridación del mRNA con la sonda	57
5.12.8 Autoradiografía electrónica	59
5.12.9 Autoradiografía en cassette	60
5.13 Análisis estadístico	60
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
Consumo de alimento	61
Ganancia de peso	62
Proteinuria	64
Proteínas totales en suero	66
Albumina sérica	68
Depuración de creatinina	70
Creatinina sérica y nitrógeno de urea en sangre (BUN)	71
Triglicéridos y colesterol séricos	74
Perfil de lipoproteínas	77
Análisis histológico	79
Expresión génica de FAS, ME, HMGCoA-R y r-LDL	82
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>84</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>103</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b>	<b>Biosíntesis de ácidos grasos</b>	<b>17</b>
<b>Fig. 2</b>	<b>Biosíntesis del colesterol</b>	<b>19</b>
<b>Fig. 3</b>	<b>Regulación de la HMGCoA-R</b>	<b>20</b>
<b>Fig. 4</b>	<b>Resumen esquemático de la vía del colesterol</b>	<b>21</b>
<b>Fig. 5</b>	<b>Esquema del transporte de lipoproteínas</b>	<b>24</b>
<b>Fig. 6</b>	<b>Consumo de alimento</b>	<b>61</b>
<b>Fig. 7</b>	<b>Ganancia de peso</b>	<b>63</b>
<b>Fig. 8</b>	<b>Proteínas totales en orina</b>	<b>65</b>
<b>Fig. 9</b>	<b>Proteínas totales en suero</b>	<b>66</b>
<b>Fig. 10</b>	<b>Albumina sérica</b>	<b>68</b>
<b>Fig. 11</b>	<b>Depuración de creatinina</b>	<b>70</b>
<b>Fig. 12</b>	<b>Creatinina sérica</b>	<b>72</b>
<b>Fig. 13</b>	<b>Nitrógeno de urea en sangre (BUN)</b>	<b>73</b>
<b>Fig. 14</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>75</b>
<b>Fig. 15</b>	<b>Colesterol</b>	<b>76</b>
<b>Fig. 16</b>	<b>Análisis histológico</b>	<b>81</b>
<b>Fig. 17</b>	<b>Northern blot</b>	<b>83</b>

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	<b>Componentes principales de la soya</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Tipos de lipoproteínas</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Ingredientes de las dietas y sus proporciones</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>Diseño de oligonucleótidos para FAS</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 5</b>	<b>Diseño de oligonucleótidos para ME</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 6</b>	<b>Diseño de oligonucleótidos para HMGC<sub>o</sub>A-R</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 7</b>	<b>Diseño de oligonucleótidos para r-LDL</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 8</b>	<b>Perfil de lipoproteínas que contienen triglicéridos</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 9</b>	<b>Perfil de lipoproteínas que contienen colesterol</b>	<b>78</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento renal progresivo caracterizado por: proteinuria, hipoalbuminemia, hiperlipidemia, hipercoagulabilidad y edema (1), cuyos efectos deletereos van más allá del compromiso glomerular; daña el organismo de forma sistémica y puede llevar al desarrollo de complicaciones ateroscleróticas si no se trata en forma oportuna (2). La pérdida urinaria de proteínas promueve el daño mensangial y conduce a hipoalbuminemia, ocasionando una disminución en la presión oncótica del plasma, por lo que el aumento en la biosíntesis de lípidos plasmáticos representa un intento del organismo por recuperar el equilibrio oncótico. La hiperlipidemia resultante no sólo no es capaz de compensar la pérdida de proteínas, sino que además, produce efectos nocivos a nivel sistémico, entre ellos hipercoagulabilidad y aterosclerosis causantes del daño cardiovascular asociado con el SN (3). El tratamiento de los pacientes con este padecimiento tiene como objetivos el control de la pérdida proteica, la disminución en la biosíntesis de lípidos y evitar la aparición de complicaciones cardiovasculares (4). La restricción en la ingestión de proteínas (5) consigue disminuir la proteinuria a rangos no nefróticos, atenuar la hipercolesterolemia y los niveles de nitrógeno uréico en sangre, sin embargo, para conseguir el efecto, las dietas deben tener un bajo contenido de proteínas, lo que desafortunadamente favorece el desarrollo de malnutrición proteica (6).

Se ha propuesto que el consumo de dietas con proteínas de origen vegetal pueden ratrasar el daño renal producido por la hiperfiltración glomerular y la aterosclerosis de los vasos renales. D'Amico y Gentile demostraron que una dieta basada en proteína de soya disminuye los niveles de proteínas urinarias en pacientes nefrópatas (7); por otro lado Anderson y colaboradores en un meta-análisis observaron que el consumo de proteína de soya en la dieta mejora los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad (LDL-Colesterol) y triglicéridos (8). Estos hallazgos permiten pensar en el uso de proteína de soya como herramienta para detener la progresión del daño renal en el SN.

### **1.1 Generalidades sobre la soya**

La soya es una leguminosa con un excelente valor nutritivo: contiene un 40% de proteína, provee la mayoría de los aminoácidos indispensables para el organismo y cuenta con un alto contenido de isoflavonas. Además contiene un elevado porcentaje de fibra dietética soluble e insoluble, hidratos de carbono complejos, un adecuado balance de ácidos grasos, pequeñas proporciones de grasa saturada, oligosacáridos, vitaminas, minerales (9, 10) y por su origen vegetal no contiene colesterol (Tabla 1).

<b>Nutriemento</b>	<b>Contenido por 100 g base seca</b>
Hidratos de carbono complejos (g)	21
Hidratos de carbono simples (g)	9
Estaquiosa(mg)	3300
Rafinosa (mg)	1600
Proteína (g)	36
Ácidos grasos totales (g)	19
Grasa saturada (g)	2.8
Grasa monoinsaturada (g)	4.4
Grasa poliinsaturada (g)	11.2
Relación ácidos $\alpha$ -linolénico/linoleico (mg)	1.3 : 9.9
Fibra insoluble (g)	10
Fibra soluble (g)	7
Calcio (mg)	276
Magnesio (mg)	280
Potasio (mg)	1797
Hierro (mg)	16
Zinc (mg)	4.8
Isoflavonas (mg)	530

**Tabla 1. Componentes principales de la soya (11, 12)**

La soya es considerada una proteína completa con un índice químico corregido por su digestibilidad igual a 1 similar a la albúmina de huevo, utilizada como estándar de oro (11). De acuerdo a lo anterior la proteína de soya puede ser utilizada como un excelente equivalente de la proteína animal en la alimentación del ser humano. Esta proteína contiene un adecuado patrón de amino ácidos con excepción de su contenido de metionina, el cual se

encuentra por debajo de los requerimientos y de la relación lisina:arginina que es mayor de lo habitual, características a las que la soya debe parte de su efecto cardioprotector (13).

### **1.1.1 La proteína de soya y la salud**

Recientemente el consumo de proteína de soya ha sido señalado en diversos estudios como una herramienta útil en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (14), dislipidemias (15), osteoporosis (16), prevención del desarrollo de cáncer (9, 17), manejo del climaterio (14, 18), y tratamiento de enfermedades renales, inflamatorias e inmunes.

La composición de la dieta repercute directamente en los niveles de lípidos en sangre. Gran parte del interés en el estudio de la soya se debe a su efecto hipocolesteromiante. Estudios epidemiológicos han demostrado que altos niveles de colesterol representan un factor de riesgo independiente para muerte de origen cardiovascular (4, 6, 19), por ello la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), recomienda 25 g de proteína de soya por día (20), como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol para la prevención de estos padecimientos (21).

Se ha sugerido que la soya juega un papel importante en la prevención del desarrollo de ciertas neoplasias (17), y en una menor incidencia de cáncer de mama, cervix, colon (15), y próstata (11) y que su efecto protector es debido a la presencia de saponinas e isoflavonas (22). En nuestro país, el cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte (16), debido a ello, los esfuerzos por incluir el consumo de soya en nuestra alimentación deberían reforzarse.

Muchos de los beneficios de la soya se han atribuido a su contenido de isoflavonas. Estos compuestos antioxidantes poseen una estructura química muy similar a la de los estrógenos tanto endógenos como exógenos. Tradicionalmente, los países orientales han privilegiado el consumo de esta proteína en su dieta, gracias a lo cual la incidencia de osteoporosis y alteraciones propias del climaterio son menos frecuentes (14, 15).

Finalmente, el alto contenido de fibra soluble e insoluble y los inhibidores de tripsina de la soya, benefician la función gastrointestinal: las primeras a través de estímulos mecánicos, y los segundos por medio de la secreción de colecistocinina, hormona encargada de la contracción vesicular y la secreción de sales biliares (17).

### **1.1.2 Mecanismos propuestos para el efecto de la soya en los lípidos**

Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales la soya ejerce su efecto hipolipemiante:

La proporción insulina:glucagon es regulada por los niveles de algunos aminoácidos de la dieta por ejemplo: la proteína de soya posee una alta cantidad de glicina y arginina, lo que produce una disminución en la relación insulina:glucagon (17), esto aumenta la gluconeogénesis (23) por un incremento en la secreción de glucagon lo que disminuye la biosíntesis y/o aumenta el catabolismo del colesterol, produciendo un efecto hipocolesterolémico.

Otro mecanismo probable se refiere a que la soya disminuye la secreción de insulina y de otras hormonas pancreáticas e intestinales, produciendo una disminución en la síntesis de lipoproteínas y lípidos por parte del hígado, en especial de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (24, 25).

Por otro lado, estudios en animales muestran que al ingerir soya (26), la secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) se encuentre inhibida y también existe un aumento en la

remoción de ellos en el hígado, por lo que al entrar el colesterol al hígado se favorece la síntesis de ácidos biliares, dando como resultado una disminución en los niveles séricos de colesterol (27).

La soya posee varios componentes que favorecen la excreción del colesterol, a través de ácidos biliares. Las saponinas poseen una estructura triterpenoide o esteroideal similar al colesterol, llamada aglicón, por lo que su concentración circulante, junto con la de la fibra, favorecen la activación de la vía de excreción a través de los ácidos biliares.

El ácido fítico de la soya tiene un efecto a nivel de ciertos minerales como Fe, Ca, Zn y Mg; la absorción de ellos disminuye al ingerir esta proteína por el efecto quelante del ácido, lo que puede mediar la disminución en las concentraciones de colesterol sérico (17).

Finalmente, el efecto hipocolesterolémico de la soya se atribuye a su contenido de isoflavonas: la genisteína, una de las principales isoflavonas, impide la oxidación de las partículas de las LDL (28), la migración y proliferación de células esponjosas, y la supresión de la formación de trombos, inhibiendo la activación y agregación plaquetaria (29). Por lo tanto, previene la promoción y progresión del proceso aterosclerótico (30). Además las isoflavonas son estructuralmente similares a los estrógenos (10), por lo que se

unen a sus receptores (31), actuando como sus agonistas y teniendo un efecto protector contra la aterosclerosis.

Como se revisó anteriormente, la soya posee un efecto hipolipemiante y uno de los padecimientos en los que se elevan los niveles séricos de lípidos, a consecuencia del daño renal, es el síndrome nefrótico (SN).

## **1.2 Generalidades sobre el síndrome nefrótico**

El síndrome nefrótico (SN) es un padecimiento caracterizado por proteinuria, hipoalbuminemia, hiperlipidemia, hipercoagulabilidad y edema (1, 3, 5). El defecto morfológico básico, es una alteración en la pared capilar glomerular, que permite una hiperfiltración de proteínas plasmáticas (32), disminuyendo la concentración sérica de albumina y elevando los niveles de lípidos. Estas alteraciones bioquímicas tienen como consecuencia defectos en el sistema inmune y una mayor susceptibilidad del mismo (33) .

Las alteraciones que el SN produce en el perfil de lípidos son: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia (34), aumento en la concentración de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones

remanentes, así como disminución de las concentraciones normales de lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuyo efecto final es una elevación en la relación LDL/HDL (35).

### **1.2.1 Fisiopatología del SN**

La excreción normal de proteínas a través del riñón se encuentra influenciada por la tasa de filtración glomerular, la concentración plasmática de albúmina y el aporte de proteínas de la dieta (36). En el SN el daño estructural de la membrana glomerular permite una mayor depuración de macromoléculas aniónicas, produciendo una pérdida en la carga negativa de la superficie glomerular (37). Ambos mecanismos traen como consecuencia una pérdida en la selectividad tanto de tamaño como de carga, ocasionando proteinuria no selectiva (38). Además de albúmina en la orina, también se pierden proteínas como: transferrina (39), renina, angiotensina (40), globulinas y algunas involucradas en la cascada de la coagulación (41).

La proteinuria sostenida, produce hipoalbuminemia. En individuos normales se sintetizan diariamente entre 12 y 14 g de albúmina (42). Principalmente el endotelio vascular y los túbulos renales en menor grado, se encargan de catabolizar diariamente la misma cantidad (38). La reserva

intravascular de albúmina que se cataboliza normalmente es del 5 al 12% y en los pacientes nefróticos este valor alcanza del 16 al 50%. En el SN una porción de las proteínas filtradas se pierden por la orina (más de 3.5 g/1.73 m<sup>2</sup>/24 hs) (1, 37), mientras que otra parte se reabsorbe y metaboliza en el túbulo proximal (43), por lo que hay una pérdida de proteínas del espacio intravascular mayor de lo cuantificado en la orina (44). El catabolismo de proteínas aumenta al no haber una compensación de la síntesis proteica hepática, contribuyendo al desarrollo de hipoalbuminemia y edema. Esto trae como consecuencia una disminución en el volumen plasmático efectivo, hipotensión postural, síncope, choque e insuficiencia renal aguda (40).

Al haber hipoalbuminemia, disminuye la presión coloidosmótica produciendo un mayor movimiento de agua y solutos hacia el espacio intersticial, esto genera edema tisular e hipovolemia como evidencia funcional (37). Se activan los sensores de volumen y mandan la señal al riñón para la retención de sodio y agua en un intento por restituir el volumen sanguíneo (45). Finalmente la retención de sodio incrementa el edema, considerándose una consecuencia de factores intrarrenales y no sistémicos (46).

Como se mencionó anteriormente, al tener una pérdida elevada de proteínas por orina, se presenta una disminución en la presión oncótica del plasma. Como mecanismo homeostático el hígado trata de compensar esta

pérdida incrementando la síntesis de lipoproteínas y colesterol conduciendo a anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas (47), encontrándose incrementadas las concentraciones séricas de colesterol total, triglicéridos, fosfolípidos, y apolipoproteínas B, C y E. Las VLDL, LDL e IDL se encuentran incrementados (48) por un aumento significativo de colesterol (49) a expensas de triglicéridos (50, 51).

Los pacientes con SN presentan desnutrición proteica secundaria a la proteinuria, a la incrementada degradación de ellas en el riñón (52) y al aumento en el catabolismo sistémico.

Durante la insuficiencia renal crónica existe un balance negativo de nitrógeno (53), y disminución en los siguientes parámetros: nitrógeno proteico,  $K^+$ , peso, altura y crecimiento (niños), grasa corporal, masa muscular, contenido proteico en músculo, relación RNA: DNA, relación de amino ácidos esenciales y no esenciales en plasma y músculo, valina, relación tirosina:fenilalanina y proteínas séricas (54).

El SN es considerado un estado protrombótico en el que existen trastornos importantes en la cascada de la coagulación y en la fibrinólisis, todos ellos consecuencia de alteraciones en la síntesis y el recambio de proteínas, así como a pérdidas de éstas en la orina. Las anomalías

características de la coagulación en el SN son: aumento de los factores V, VIII y fibrinógeno, disminución de antitrombina III, trombocitosis y aumento en la agregación plaquetaria (55).

A nivel experimental, una de las formas de inducir SN en animales, es a través de la inyección de aminonucleósido de puromicina (40).

### **1.2.2 Generalidades del aminonucleósido de puromicina (ANP)**

El aminonucleósido de puromicina (ANP) (6-dimetil-amino-9-[3'amino-3'desoxirribosil] purina) es un potente agente nefrotóxico (56). Su administración subcutánea o intravenosa ocasiona alteraciones en las células epiteliales del glomérulo, similares en muchos casos, al síndrome nefrótico producido por la enfermedad de cambios mínimos en el humano (41) .

La administración subcutánea repetida de ANP en animales produce un síndrome nefrótico crónico experimental (SNCE) (57), que puede progresar a insuficiencia renal crónica terminal. Los animales con este padecimiento son un buen modelo para estudiar la enfermedad de cambios mínimos en el laboratorio.

Químicamente el ANP es una purina con un grupo dimetilamina en la posición 6' y una aminodesoxirribosa en la posición 3'. Se obtiene a partir de la hidrólisis de la puromicina, antibiotico inhibidor de la síntesis de proteínas. El residuo *p*-metoxi-tirosil que posee la puromicina se pierde al momento de la hidrólisis, y con ello la capacidad del ANP para ya no inhibir la síntesis de proteínas (58). Se sugiere que el ANP interfiere en la ruta del metabolismo de purinas, bloqueando las vías de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas nucleares. El mecanismo por el cual esta droga causa el daño glomerular no es bien conocido aun, sin embargo se cree que puede interferir con la adhesión de célula-célula, célula-matriz, alterar proteínas del citoesqueleto y/o la membrana celular, modificar la regulación transcripcional, o bien a través de radicales libres ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $OH^-$ ), productos del metabolismo del ANP (5).

La nefrosis resultante por la administración del ANP, es causada por la toxicidad dirigida al epitelio glomerular (59), por lo que posterior a la administración de la droga es aparente el desarrollo de infiltrado intersticial (60) y depuración fraccional de macromoléculas aniónicas y sin carga elevada, por lo tanto la selectividad de tamaño y de carga se encuentran alterados (55).

### **1.3 Metabolismo de lípidos**

Como se mencionó, el SN altera directamente el metabolismo de los lípidos y de ácidos grasos. En este padecimiento están elevadas prácticamente todos los lípidos y lipoproteínas séricas, incluyendo al colesterol y sus fracciones (total, libre y esterificado) (2, 61). De acuerdo a lo anterior, es importante revisar las rutas metabólicas de los lípidos, y conocer las enzimas limitantes involucradas, con la finalidad de comprender mejor a qué nivel ocurren las alteraciones en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol durante el SN.

#### **1.3.1 Biosíntesis de ácidos grasos**

La lipogénesis en el organismo se lleva a cabo principalmente en el citosol de los hepatocitos a partir de acetil-CoA.

Durante la biosíntesis de ácidos grasos existen varios pasos limitantes, por ejemplo: uno de ellos es a nivel de la enzima málica (ME) y el otro involucra a la sintasa de ácidos grasos (FAS).

La enzima málica (ME), cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato en el ciclo del piruvato-malato, considerándosele enzima clave en la ruta de la síntesis de ácidos grasos (62), ya que genera equivalentes reductores (NADPH) indispensables para la biosíntesis *de novo*.

La FAS es considerada una enzima importante en la lipogénesis, ya que cataliza reacciones de condensación, deshidratación y reducción que darán lugar a la formación del ácido graso. La FAS comprende un complejo multienzimático que consta de un dímero de dos subunidades con siete actividades enzimáticas cada una. Cada subunidad contiene una proteína transportadora de acilo que es la responsable de situar la cadena del ácido graso en la zona activa de la FAS, aumentando el proceso sintético y minimizando reacciones secundarias (63).

Teniendo una visión en conjunto de la lipogénesis, los pasos implicados en la formación de los ácidos grasos, y en este caso de palmitato, se observan en la Fig. 1: inicialmente ocurre la formación de acetil-CoA como precursor a partir del piruvato en la mitocondria (I). Posteriormente esta molécula viaja al interior del citosol y junto con el oxalacetato forman citrato para poder salir de la mitocondria (II). Ya en el citoplasma y gracias a la acetil-CoA carboxilasa, ocurre la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA (III). La iniciación de una nueva molécula de ácido graso requiere de acetil-CoA y malonil-CoA, ambas

se unen a la ácido graso sintasa (FAS) y se condensan para formar acetoacetil. Posteriormente éste sufre una secuencia de reacciones catalizadas por la FAS para fabricar un ácido graso saturado de cuatro carbonos (IV); esta enzima también cataliza la adición secuencial de otras unidades de dos carbonos del malonil-CoA a la cadena del ácido graso en crecimiento (V). La elongación que lleva a cabo la FAS se detiene cuando se llega a la formación del palmitato, ácido graso de 16 carbonos (VI). La elongación de la cadena e inserción de dobles enlaces se lleva a cabo posteriormente con la ayuda de otras enzimas (VII).

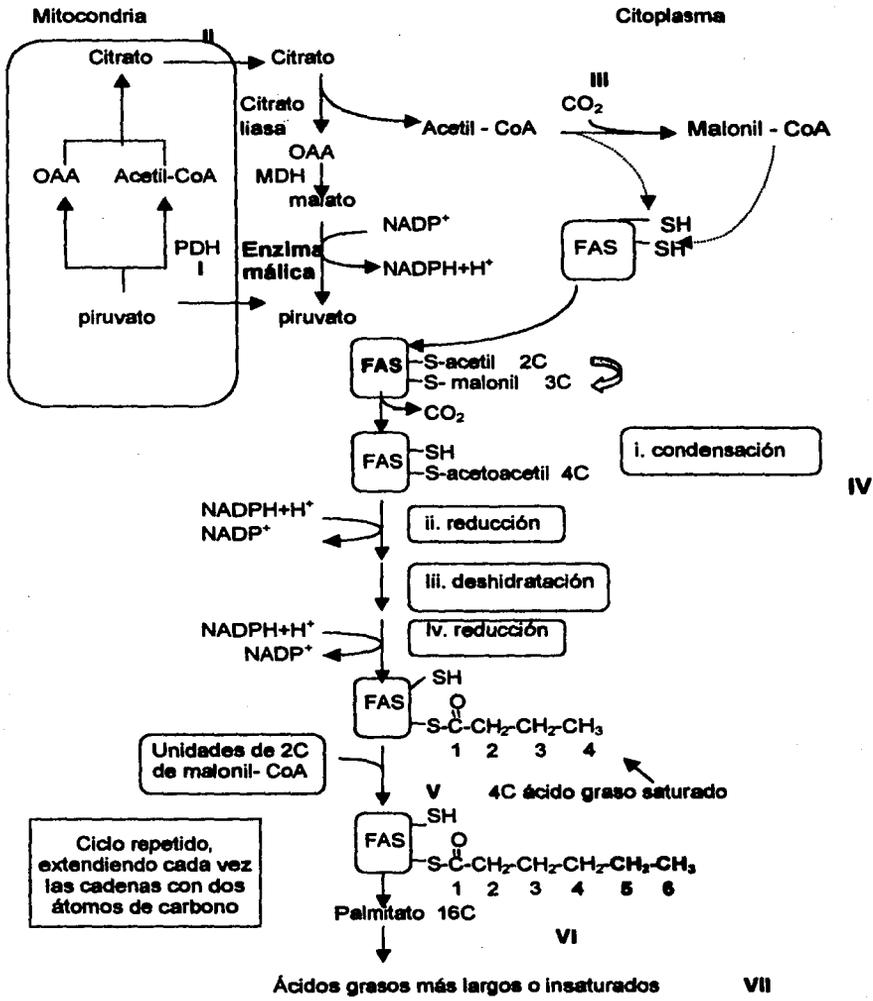
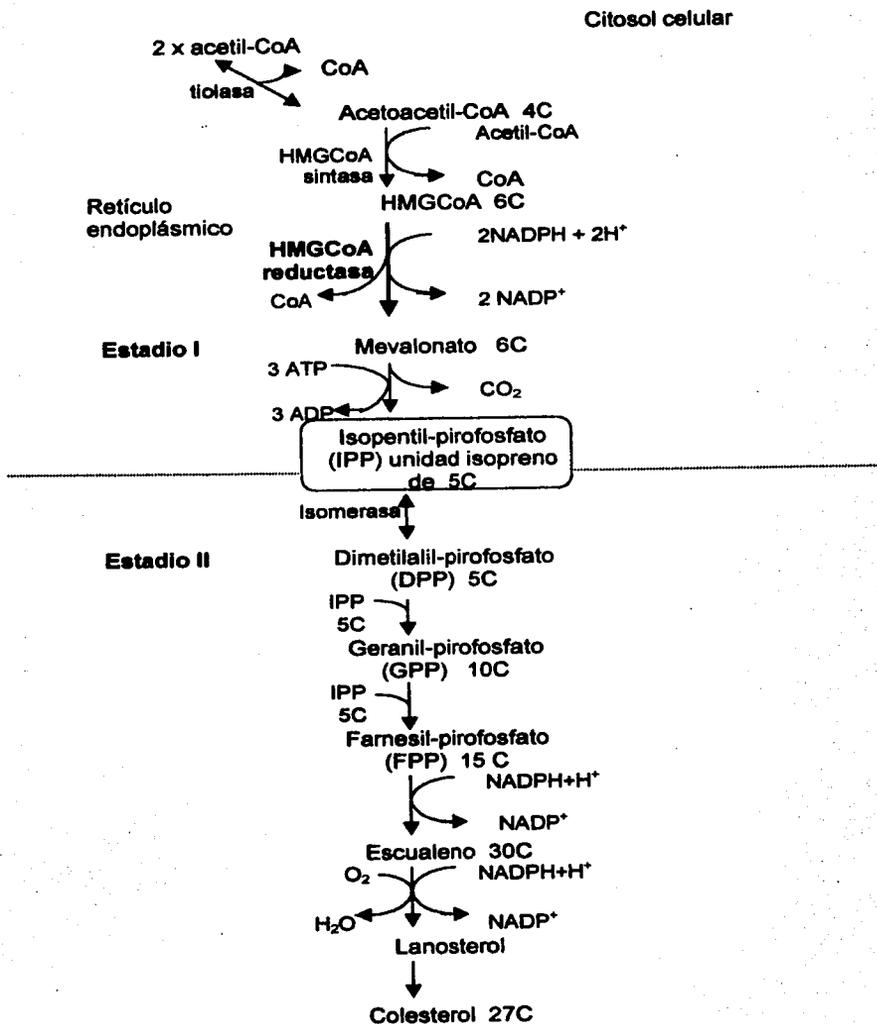


Fig. 1 Biosíntesis de ácidos grasos(63)

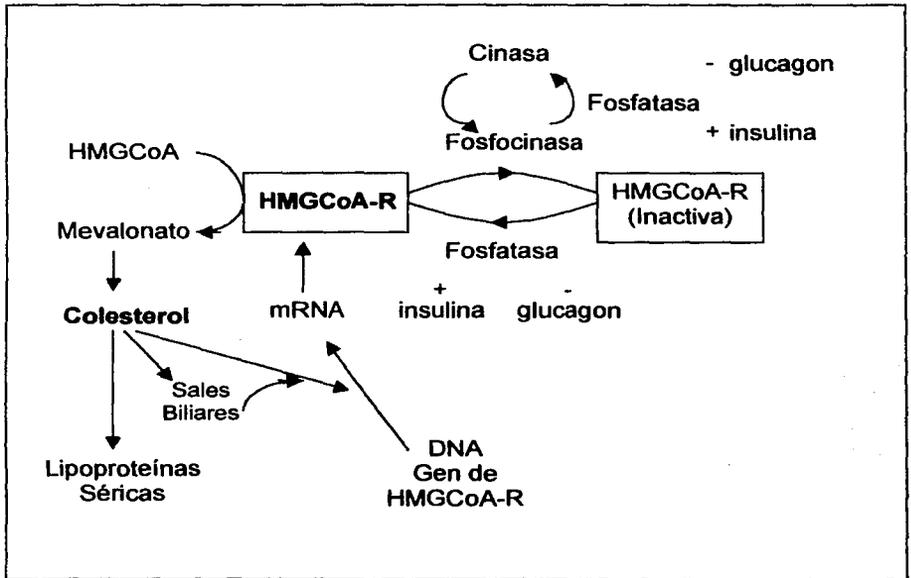
### **1.3.2 Biosíntesis del colesterol**

El colesterol se sintetiza principalmente en el citosol de los hepatocitos y es una molécula de 27 carbonos provenientes de la acetil-CoA y su síntesis se puede apreciar mejor si se divide en dos estadios como se observa en la Fig. 2: el primero, consta de la formación de la unidad de isopreno por la condensación de tres moléculas de acetil-CoA para generar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) y perder  $\text{CO}_2$ . El segundo consiste en la condensación progresiva de estas unidades de isopreno para formar colesterol; esto se logra con la ligación de seis unidades de isopreno para la formación de escualeno, que posteriormente se ciclará para formar lanosterol de donde deriva el colesterol (63, 64).



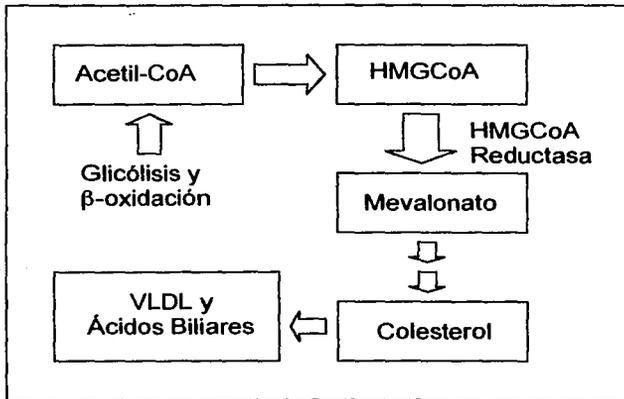
**Fig. 2 Biosíntesis del colesterol (63)**

La regulación de la síntesis del colesterol es muy importante y una de las enzimas principales para su control es la HMGC<sub>o</sub>A Reductasa (HMGC<sub>o</sub>AR) (65), ya que es la enzima limitante en la velocidad de reacción de formación de mevalonato; es regulada alostéricamente por el colesterol (66), y por fosforilaciones/defosforilaciones (67).



**Fig. 3. Regulación de la HMGC<sub>o</sub>A-R. El control de la HMGC<sub>o</sub>A reductasa (HMGC<sub>o</sub>AR) no sólo está regulado alostéricamente por el colesterol sérico, también por la transcripción de su mismo gen (66, 67).**

La siguiente figura, muestra un resumen esquemático de la ruta del colesterol desde su síntesis hasta su excreción.



**Fig. 4 Resumen esquemático de la vía del colesterol (65)**

### 1.3.3 Transporte de lípidos mediado por lipoproteínas

En condiciones fisiológicas, el transporte de lípidos se lleva a cabo por dos vías: la exógena, que transporta los lípidos de la dieta y cuyos protagonistas son los quilomicrones, y la endógena, en la que participan las lipoproteínas, transportando los triacilglicérols y colesterol sintetizados en el hígado hacia los tejidos (68).

Como se observa en la Tabla 2, existen 4 clases de lipoproteínas: lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad

(LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (65, 69).

<b>Lipoproteína</b>	<b>Componentes</b>	<b>Características y Función</b>
Quilomicrones	90% Triglicéridos	Tienen su origen en el intestino y transportan triglicéridos exógenos a tejidos periféricos (500 nm).
VLDL	65% Triglicéridos 20% Colesterol	Se sintetizan en el hígado a partir de triglicéridos y poseen una densidad <1 (43 nm). Transportan triglicéridos endógenos a tejidos extrahepáticos.
LDL	60% Colesterol	Producto del catabolismo de las VLDL, por la lipoproteinlipasa. Densidad $\approx$ 1 (27 nm). Transportan colesterol del hígado a otros tejidos. Entran al hígado a través de su receptor.
IDL	35% Fosfolípidos 25% Colesterol	Proviene tanto de HDL como de VLDL. Densidad $\approx$ 1.05 (22 nm).
HDL	55% Proteínas 25% Fosfolípidos	Producidas por tejidos extrahepáticos. Densidad $\approx$ 1.15 (8 nm). Transportan colesterol de tejidos periféricos al hígado.

**Tabla 2. Tipos de lipoproteínas (51, 63).**

En general, la función de la lipoproteínas es tanto solubilizar a los lípidos como proporcionarles un sistema de transporte eficaz (70).

El colesterol proveniente de la recirculación y el de la dieta, entra al torrente sanguíneo a través del conducto torácico y es transportado en forma de triglicéridos por los quilomicrones. En el intestino la lipoprotein lipasa hidroliza los quilomicrones, dando como resultado quilomicrones remanentes pobres en triglicéridos, que son internalizados al hígado, a través de los receptores de quilomicrones remanentes.

Una vez en el hígado el colesterol puede tener varios caminos: Por un lado, el colesterol hepático se secreta como constituyente de las partículas de VLDL sintetizadas por el hígado. Estas partículas, por acción de la protein lipasa se convierten a IDL y a LDL, aumentan su densidad y son removidas por el hígado. Las partículas de LDL plasmáticas también pueden ser removidas por células extra hepáticas para ser utilizadas en la síntesis de membranas celulares. El exceso de colesterol que proviene de las células extra hepáticas es removido por las HDL<sub>3</sub>, para ser almacenados en las HDL. Posteriormente, las HDL<sub>3</sub> incrementan su tamaño a HDL<sub>2</sub> y pueden donar su colesterol a LDL en una reacción mediada por la proteína de transferencia de colesterol ésteres (CETP) o pueden ser removidas por el hígado para la síntesis de ácidos biliares (69).

Otro camino que puede seguir el colesterol una vez que entra al hígado, es directamente hacia la síntesis de ácidos biliares o ser excretado como colesterol biliar. Finalmente, el colesterol libre se puede utilizar para la síntesis de membranas celulares, y el colesterol esterificado se almacena en los hepatocitos (64).

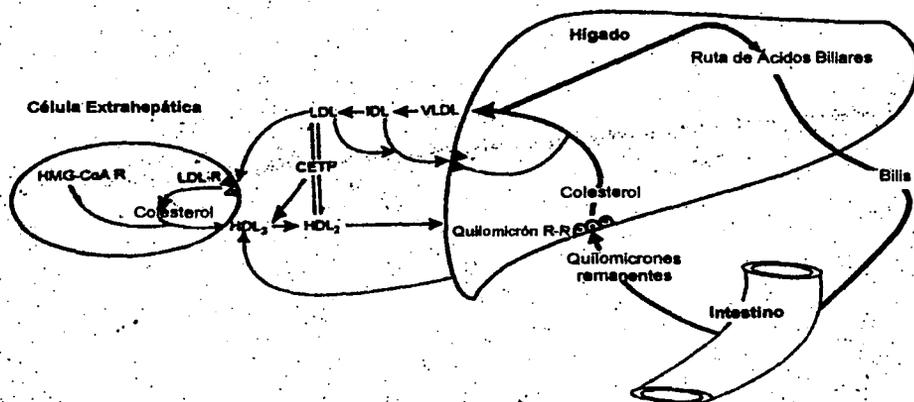


Fig. 5 Esquema del transporte de lipoproteínas (69)

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Se ha descrito que la proteína de soya disminuye la concentración de lipoproteínas y colesterol tanto en humanos como en animales (17, 71). Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual esta proteína ejerce su efecto hipocolesteromiante.

Por otro lado, es necesario describir la regulación de enzimas involucradas en la síntesis de lípidos durante el síndrome nefrótico crónico.

El modelo del síndrome nefrótico crónico experimental nos permitirá determinar si la proteína de soya ejerce un efecto protector en el riñón, de tal manera que se corrijan las anomalías de lípidos circulantes, elucidando si es a través de una modificación en la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y del colesterol.

### **III. HIPÓTESIS**

**La soya ejercerá su efecto hipocolesteromiente e hipolipemiante, a través de una inducción o represión de genes involucrados en la biosíntesis de lípidos en ratas con síndrome nefrótico crónico experimental, inducido por ANP, lo que llevará a una disminución del daño renal.**

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del consumo de proteína de soya sobre la expresión génica de enzimas de la biosíntesis de lípidos en ratas con síndrome nefrótico crónico experimental (SNCE) y su repercusión sobre el daño renal.

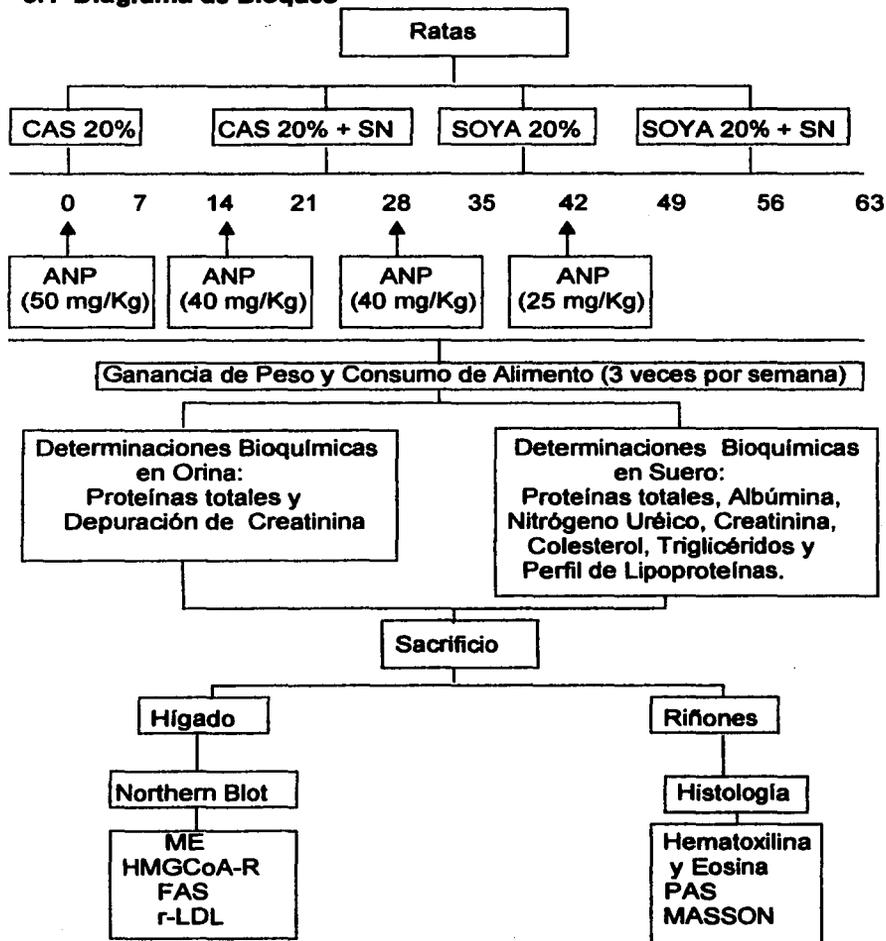
### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Comparar el efecto de una dieta con 20% de proteína de soya con respecto a una dieta con 20% de caseína sobre la ganancia de peso y el consumo de alimento en ratas con SNCE.**
- 2. Evaluar el efecto de la proteína de soya sobre las concentraciones de colesterol, triglicéridos, albúmina, proteínas totales y nitrógeno de urea en sangre (BUN), en ratas con SNCE.**

- 4. Evaluar el efecto de una dieta con 20% de proteína de soya sobre el perfil de lipoproteínas séricas en ratas con SNCE.**
  
- 5. Determinar la concentración de mRNA de Enzima Málica (ME), 3-Hidroxi-metil-glutaril-CoA Reductasa (HMGCoA-R), Sintasa de los Ácidos Grasos (FAS) y receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL) en ratas alimentadas con 20% proteína de soya durante SNCE.**
  
- 6. Comparar el daño renal durante el SNCE entre ratas alimentadas con una dieta al 20% de caseína y ratas alimentadas con 20% de soya.**

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Diagrama de Bloques



## **5.2 Diseño del Estudio**

Las ratas de un peso de entre 90 y 100 g se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 10 animales cada uno:

- Grupo CASEÍNA 20% (grupo control)
- Grupo CASEÍNA 20% + SN (síndrome nefrótico)
- Grupo SOYA 20%
- Grupo SOY 20% + SN

Durante el tiempo de estudio las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta 20% de caseína o soya, en polvo.

### **5.12 Tipo de Estudio**

El estudio fue experimental y longitudinal. El seguimiento de las ratas se realizó durante un periodo de 64 días.

#### **5.4 Consideraciones Éticas**

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

#### **5.5 Animales y Muestras**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 90-100 g de peso, proporcionadas por el Departamento de Investigación Experimental y Cuidado de Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Todos los animales se mantuvieron en cajas metabólicas individuales durante el tiempo de estudio y tuvieron libre acceso al agua. Los cuartos tuvieron un ciclo de luz entre las 7:00 y las 19:00 horas y de obscuridad de las 19:00 a las 7:00 horas de la mañana. El peso corporal y el consumo de alimento se registraron cada tercer día. El síndrome nefrótico crónico experimental (SNCE) se indujo por la inyección subcutánea de aminonucleósido de puromicina (ANP) (Sigmachemical Co., St. Louis, Mo, USA), 50, 40, 40 y 25 mg/Kg de peso corporal los días 0, 14, 21 y 42 respectivamente. Los grupos controles fueron inyectados con solución salina

al 0.9%. El suero utilizado para la determinación de los parámetros bioquímicos durante las diferentes etapas del estudio, se obtuvo de ratas previamente anestesiadas con éter, a las que se les tomó una muestra de sangre de 1.5 mL aprox. de la cola. Posterior a centrifugar las muestras a 3000 r.p.m. durante 10 min. (centrífuga Beckman mod. J2-MC con un rotor JA-20) se separó el suero y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de las determinaciones.

Los animales fueron ejecutados el día 64, previa anestesia con bióxido de carbono. Tanto el tejido hepático, como el renal, se obtuvieron después de la decapitación del animal, enjuagándolos con solución salina isotónica fría al 0.9%. Proteínas totales, albúmina, colesterol total, creatinina, nitrógeno de urea en sangre (BUN) y triglicéridos, se midieron cada semana. Al final del experimento, se obtuvieron muestras de suero, para la determinación del perfil de lipoproteínas y muestras de 200 mg de hígado para la extracción de RNA, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. También se tomaron muestras de riñón para los análisis histológicos y morfométricos y fueron fijadas en formalina al 10%.

## 6. Preparación de Dietas

Como fuente de proteína se utilizaron: caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad) y proteína aislada de soya Supro 710 (Protein Technologies International); dextrosa y almidón (Droguería Cosmopolita, Méx., D. F.), como fuentes de hidratos de carbono; aceite de maíz (comercial) como fuente de lípidos y cloruro de colina. Se utilizó una mezcla de vitaminas TD 94047, (Harlan-Teklad), basada en la última recomendación del American Institute of Nutrition (AIN-93).

A continuación se muestra una tabla con los porcentajes de cada ingrediente para la preparación de las dietas. Estas cantidades se utilizaron de igual manera tanto para la dieta de caseína, como para la de soya.

Ingrediente	Porcentaje en la dieta	g / Kg de dieta
Proteína	20%	200 g
Vitaminas	1%	10 g
Mezcla de minerales	5%	50 g
Aceite de maíz	5%	50 g
Citrato de colina	0.165%	1.65 g
Almidón de maíz	34.4175%	344 g
Dextrosa	34.4175%	344 g

Tabla 3. Ingredientes de las dietas y sus proporciones.

## **5.7 Determinación del Peso Corporal**

Desde el inicio del experimento las ratas se pesaron en la mañana tres veces por semana en una báscula Sartorius (mod. BP-1200). Se tomó la lectura y se registró el peso en gramos por día.

## **5.8 Determinación del Consumo de Alimento**

Durante todo el estudio, se pesaron 2 veces por semana los comederos con dieta en una báscula Sartorius (mod. BP-1200). El consumo de alimento se registró en gramos/24 horas, a partir de la diferencia del registro de peso del comedero un día y un día después.

## **5.9 Determinaciones Bioquímicas en Orina**

### **5.9.1 Proteínas totales**

Las proteínas totales en orina y suero se determinaron espectrofotométricamente por el método de Lowry. Esta técnica utiliza como patrón albúmina sérica de bovino en concentraciones que van de 25 a 250  $\mu\text{g/mL}$ . La técnica consta de dos fases: en la primera, se forma un complejo de

reacción proteína-cobre en solución alcalina y en la segunda el complejo se reduce a un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin y Ciocalteu), produciendo un intenso color azul, que es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra. Los reactivos se adquirieron de J.T. Baker de México y Sigma-Aldrich Química, S.A. de C. V. Las unidades en las que se reportaron los valores fueron mg/vol (orina) y g/dL (suero).

### 5.9.2 Depuración de creatinina (CrCl)

La depuración de creatinina es un parámetro que nos da información del estado de la función renal. Se calculó mediante la siguiente fórmula o ecuación:

$$\text{CrCl} = \frac{\text{Creatinina urinaria (mg/dL)} \times \text{Volumen urinario (mL/24 h)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dL)}}$$

## 5.10 **Determinaciones Bioquímicas en Suero**

### 5.10.1 Albúmina

Se utilizó un método cuantitativo colorimétrico a 628 nm utilizando el reactivo Sigma Diagnostic Albumin Reagent (cat. 631-2) que contiene verde de bromocresol (BCG). El procedimiento es una modificación del método de

Doumas. La albúmina se une al BCG para producir un color azul verdoso con una absorbancia máxima a 628 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

#### 5.10.2 Nitrógeno de urea en suero (BUN)

Esta determinación se realizó por un método enzimático con un Analizador 2 (Beckman, USA), que mide la velocidad de cambio de la conductividad en la reacción, es decir, la conversión de urea (especie no iónica), en carbonato de amoníaco (especie iónica). Los resultados se expresaron en mg/dL. Los estuches fueron provistos por Beckman Coulter de México, S. A. de C. V.

#### 5.10.3 Creatinina

La creatinina excretada en orina proviene del catabolismo de fosfatos de creatinina que están principalmente en el músculo, por lo que es un parámetro que nos puede dar una buena idea del índice de masa corporal (72). Tanto la creatinina sérica, como la urinaria, se determinaron por un método colorimétrico con ayuda de un Analizador 2, (Beckman, USA). Se utiliza el reactivo de Jaffé, el cual se basa en el aumento de la absorción por la formación del picrato de creatinina. Los resultados fueron reportados en mg/dL. Los estuches para las determinaciones fueron adquiridos de Beckman Coulter de México, S. A. de C. V

#### **5.10.4 Colesterol**

El colesterol se determinó a través de un estuche comercial de Lakeside Diagnostics. Este estuche emplea el método de Chod-Pad que es una prueba enzimática colorimétrica que mide la velocidad de formación de un cromógeno de colesterol libre. Las unidades en las que se expresaron los valores fueron mg/dL..

#### **5.10.5 Triglicéridos**

Los triglicéridos en suero, también se determinaron con ayuda de un estuche comercial de Lakeside Diagnostics. La prueba es enzimática colorimétrica y mide la formación de glicerol. Los resultados fueron expresados en mg/dL.

#### **5.10.6 Perfil de lipoproteínas**

Para caracterizar la composición y distribución de las lipoproteínas que contienen apo-B, y así valorar el transporte de lípidos, 3 mL de suero se fraccionaron por medio de un gradiente de densidad por ultracentrifugación usando un rotor Beckman SW-40 Ti a 40,000 rpm por 40 h a 15 °C. La densidad del suero se incrementó a 1.063 g/mL por la adición de KBr sólido y seco. Sobre una capa de 0.5 mL de una solución de 1.21 g/mL se colocó en el

fondo del tubo seguido en orden por 2 mL de la muestra de plasma con la densidad ajustada, 1 mL de una solución de 1.0464 g/mL, 1 mL de una solución de 1.0336 g/mL, 2 mL de la solución de 1.0271 g/mL, 2 mL de la solución de 1.0197 g/mL, 2 mL de la solución de 1.0117 g/mL, y 2 mL de una solución de 1.006 g/mL. El gradiente se eluyó de la parte superior, usando una bomba peristáltica operando a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. El colesterol y los triglicéridos se midieron en cada fracción de 0.5 mL como se describió previamente.

#### **5.11 Análisis Histológico y Morfométrico**

Fragmentos del riñón se fijaron por inmersión en formalina amortiguada (pH 7.4) y se incluyeron en parafina. Secciones de 3 $\mu$  de tejido renal se tiñeron con 3 técnicas histológicas diferentes: hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Shiff y la tinción tricrómica de Masson. La esclerosis glomerular se definió como el colapso de los capilares glomerulares con una matriz mesangial aumentada y una adhesión fibrótica capilar a la cápsula de Bowman. Se examinaron cien glomérulos de cada riñón de rata para demostrar la esclerosis glomerular. La incidencia de glomérulos escleróticos, se estimó dividiendo el número de glomérulos escleróticos entre el número total de glomérulos examinados. En el mismo glomérulo esclerótico se

determinó el porcentaje de esclerosis que afectaba el área total de las asas capilares y del mesangio por análisis de imagen automatizada (Qwin Leica, Milton Keynes, UK).

#### **5.11.1 Técnicas Histológicas**

En las tres técnicas de tinción utilizadas el manejo de los tejidos antes de iniciar el procedimiento fue el mismo: una muestra de riñón se incluyó en parafina, para llevar a cabo cortes de 3 $\mu$  que fueron colocados en laminillas. Con el fin de desparafinar e hidratar las muestras, se pasaron por dos baños de xilol de 2 min. cada uno. A continuación se dieron dos baños de 1 min. en alcohol al 100% y otros dos del mismo tiempo en alcohol al 95%.

Al finalizar la tinción, independientemente de cuál se tratara, se procedió a los lavados finales de las laminillas. Se lavaron dos veces con alcohol al 95% por 1 min. y dos veces más del mismo tiempo con alcohol al 100%. Finalmente se hicieron tres lavados de 2 min. cada uno con xilol. Se montaron las laminillas en Permout o bálsamo y se observan al microscopio.

##### **a.) Tinción de Hematoxilina y Eosina**

Esta técnica histológica nos da información acerca de la morfología celular, haciendo una distinción entre el núcleo y el citoplasma celular (73).

Las muestras se tratan con solución de Lugol o alcohol yodado al 1% por espacio de 10 a 15 min. y luego se lavan 4 veces con agua corriente. Las

laminillas se pasan por tiosulfato de sodio al 5% por 5 min. y de nuevo se lavan 4 veces con agua corriente. Se ponen en contacto con la hematoxilina de Harris por 15 min. y se lavan 4 veces con agua corriente. Para evitar tinciones inespecíficas se pasan las laminillas por alcohol ácido de 3 a 10 veces. En este punto, y con ayuda del microscopio los núcleos se verán opacos y el resto de la célula sin color o brillante. De nuevo se enjuagan las muestras con agua corriente y se sumergen en carbonato de litio saturado o agua amoniacal hasta que las muestras comiencen a tomar un tono azul brillante. Lavar con agua corriente de 10 a 20 min. Transcurrido este tiempo teñir con eosina de 15 segundos a 2 min. y continuar con los lavados finales.

Se apreciarán núcleos de color azul y el citoplasma de color rosa.

#### b.) Tinción tricrómica de Masson

La tinción de Masson evidencia la colágena tisular, por lo que es de gran utilidad para evaluar fibrosis, característica que presentaban los riñones de las ratas con SNCE (74, 75).

Una vez finalizados los lavados preliminares con los diferentes alcoholes, se lavan las laminillas con agua destilada y se fija el tejido con la solución de Bouin por 1 h a 56 °C o toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo enfriar y lavar al chorro del agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca. Dar un lavado con agua destilada y luego poner en contacto con la solución de hematoxilina férrica de Weigert por 10 min.

Lavar con agua corriente por 10 min. y luego con agua destilada. Posteriormente se ponen en contacto con fucsina ácida grana de Biebrich por 15 min. y se enjuagan con agua destilada. Para la contraindicación se utilizan azul de anilina o verde brillante. Si se usa azul de anilina, se ponen en contacto las laminillas con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico por un lapso de 10 a 15 min.; en caso de que se utilice verde brillante se ponen en contacto con ácido fosfotúngstico acuoso al 1% por 15 min. Se descartan cualquiera de las dos soluciones y se enjuagan las laminillas con agua destilada. Transferir las laminillas en un baño de agua acética al 1% de 3 a 5 min. y descartar la solución. Continuar con los lavados finales.

Al microscopio se observarán los núcleos de color negro; citoplasma, queratina, fibras musculares e intracelulares de color rojo, y finalmente la colágena y mucosas de color azul.

**c.) Reacción del ácido periódico de Schiff (PAS)**

La reacción de PAS tiene por objeto tefir células granulosas y depósitos de glucoproteínas, que posteriormente se traduce en daño a nivel de membranas (76).

Las laminillas se ponen en contacto con la solución de ácido peryódico (oxidante) por espacio de 5 min. Enjuagar con agua destilada.

Posteriormente poner las laminillas en contacto con el reactivo de Coleman Feulgen o con la leuco-fucsina de Schiff por 15 min. Lavar al chorro

de agua por 10 min. hasta obtener un color rosa. Tefir con hematoxilina de Harris por 6 min. Lavar las muestras con agua corriente y dar de 3 a 10 sumergidas en alcohol ácido para la diferenciación. Lavar con agua corriente e introducir las laminillas en un baño de agua amoniacal para evidenciar el color azul. Posteriormente lavar al chorro del agua corriente por 10 min.

A continuación se realizan los lavados finales.

Glicógeno, mucina, ácido hialurónico, reticulocitos, trombos de fibrina, material coloidal, arteriosclerosis hialina, depósitos hialinos en glomérulos, células granulares de arteriolas renales, membranas basales y elementos de infiltración dan reacción positiva, mostrando un color que va del rosa al morado rojizo.

Por otro lado encontraremos los núcleos celulares de color azul y el resto de las células de color verde pálido

### **5.12 Northern Blot**

Esta técnica nos permite cuantificar mRNA, lo que nos da información sobre la expresión génica, en este caso, de las enzimas y receptor de interés.

### **5.12.1 Preparación de Sondas**

#### **a.) Diseño de oligonucleótidos para las enzimas del metabolismo de lípidos y Receptor de LDL**

Se realizó una revisión bibliográfica de las diferentes enzimas del metabolismo de lípidos clonados en rata y se eligieron el receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL) y 3 enzimas limitantes en la síntesis de ácidos grasos y de colesterol: ME, HMGCoA-R y FAS. Con el número de acceso proporcionado por la bibliografía, se obtuvieron las secuencias de DNA de éstos, y con el programa Oligo 5.0 se diseñaron los iniciadores específicos (primers) con alta estringencia tomando en cuenta las siguientes condiciones:

- El porcentaje de GC (guanina-citocina); debe ser  $\leq$  al 60% para evitar la formación de horquillas o dímeros.
- El iniciador debe estar formado por un número de 18 a 28 oligonucleótidos.
- La temperatura de alineamiento (TA) debe ser de alrededor de 55 °C.
- Las diferencias de las temperaturas de fusión entre las secuencias sentido y antisentido deben ser pequeñas (alrededor de 1°C).

A continuación se muestran tablas con las principales características de los oligonucleótidos utilizados (Tablas 4, 5, 6 y 7):

<b>Enzima Málica (ME)</b>	
<b>Autores</b>	Magnuson, M. A., Morioka, H., Tecce, M. F. & Nikodem, V. M.
<b>Origen</b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Número de acceso al Gene Bank</b>	NM012600
<b>Secuencia sentido</b>	CCC GCA TCT CAA CAA GG
<b>Secuencia antisentido</b>	CTT CTT CAG GCC ACG AAT AAC
<b>Temperatura óptima de alineamiento</b>	53.6 °C
<b>Tamaño del Producto de PCR</b>	1625 pb
<b>Tamaño del RNAm</b>	1761 pb

<b>3-Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA-R)</b>	
<b>Autores</b>	Khan, S. A., Kabat, S. & Stambrook, P.
<b>Origen</b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Número de acceso al Gene Bank</b>	X55286
<b>Secuencia sentido</b>	ACA AGA AAC CTG CTG CCA TAA
<b>Secuencia antisentido</b>	GGT GAG CCC CAC ACT GAT
<b>Temperatura óptima de alineamiento</b>	56 °C
<b>Tamaño del Producto de PCR</b>	945 pb
<b>Tamaño del RNAm</b>	1159 pb

<b>Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad (r-LDL)</b>	
<b>Autores</b>	Lee, L. Y., Nohler, W. A., Schafer, B. L., Freudenberg, et. al.
<b>Origen</b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Número de acceso al Gene Bank</b>	X13722
<b>Secuencia sentido</b>	CAA TGG GGG TGG TCG GAA AA
<b>Secuencia antisentido</b>	TGC AAT GGG GAG GAA GAT GGA
<b>Temperatura óptima de alineamiento</b>	60.4 °C
<b>Tamaño del Producto de PCR</b>	679 pb
<b>Tamaño del RNAm</b>	3037 pb

<b>Sintasa de Ácidos Grasos (FAS)</b>	
<b>Autores</b>	Beck, K. F., Schreglmann, R., Stathopoulos, I., Klein, H., Hoch, J. & Schweizer, M.
<b>Origen</b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Número de acceso al Gene Bank</b>	X62888
<b>Secuencia sentido</b>	GCT TTG CTG CCG TGT CCT TCT
<b>Secuencia antisentido</b>	GTG TCT GCT GGG GTC CTC GTT
<b>Temperatura óptima de alineamiento</b>	60.8 °C
<b>Tamaño del Producto de PCR</b>	793 pb
<b>Tamaño del RNAm</b>	9143 pb

## b.) RT-PCR

En la reacción de la transcriptasa reversa (RT) se sintetiza una cadena de DNA complementario (cDNA) a partir de una cadena simple de RNA. Se utiliza Oligo DT, que es una secuencia de 12-18 nucleótidos de Timina que se une por complementariedad a la cola poli A del RNAm, formándose una horquilla que es reconocida por la enzima transcriptasa reversa (superscript II) que transcribe el mRNA a cDNA. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplifica un fragmento de DNA utilizando iniciadores específicos y la enzima Taq DNA polimerasa que es una enzima estable al calor, capaz de sintetizar DNA a partir de un templado de cDNA. La técnica de PCR está formada por 3 pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión: en el primero se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 95 °C, es decir, se separan las dos hebras por calor: en el alineamiento se baja la temperatura a 55 °C para que exista un reconocimiento y apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas sencillas de DNA, que se han separado: por último, la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores específicos a 72 °C, este ciclo se repite muchas veces hasta que el DNA queda amplificado y es posible visualizarlo a través de una electroforesis.

### 1. Reacción de la Transcriptasa Reversa (Kit de Superscript II)

En un microtubo de 600 µL se colocan los reactivos (previa agitación) en el orden en que se presentan. Se utilizan puntas con filtro y se trabaja en la

campana de flujo laminar para evitar contaminaciones. El botón de RNA se resuspende en agua-DEPC el mismo día de su uso para la RT-PCR. Antes de colocar el RNA en el tubo de reacción se calienta por 5 minutos a 65 °C con el fin de alinear la hebra de RNA.

RNA (0.66 µg/µL )	3 µL
Oligo dT	1 µL
Agua DEPC	8 µL

El tubo se centrifuga brevemente y se incuba en un termociclador Perkin Elmer (mod. 9600) a 70°C por 10 min. Transcurrido el tiempo se pasa el tubo a hielo y se agrega al mismo:

Buffer de PCR (10X)	2 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µL
dNTP's (10mM)	1 µL
DTT (0.1M)	2 µL

Centrifugar brevemente e incubar a 42 °C por 5 min. Posteriormente se agrega 1 µL de la enzima transcriptasa reversa (Superscript II. GIBCO BRL, cat. 18064-014) y nuevamente se incuba a 42 °C por 50 min. y a 70°C por 15 min. Se pasa a hielo, se centrifuga brevemente y se agrega 1 µL de RNAsa H, (GIBCO BRL, cat. 18021-071). Se incuba a 37 °C por 20 min. y se lleva a hielo o se almacena a -20 °C.

## 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se agregan en un tubo los siguientes reactivos:

Buffer de PCR (10X)	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5 $\mu$ L
Mezcla dNTP's (10 mM)	1 $\mu$ L
Upper primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Lower primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Taq DNA polimerasa (GIBCO BRL., Cat. 18038-042)	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O desionizada, estéril y filtrada	15.5 $\mu$ L
cDNA (producto de RT)	2.0 $\mu$ L

Posteriormente se centrifuga brevemente y se coloca en el termociclador con las siguientes condiciones:

1 Ciclo 95 °C, 5 min.

T. A. , 1 min.

72 °C, 1 min. 30 seg.

33 Ciclos 95 °C, 1 min.

T. A. 1 min.

72 °C, 1 min. 30 seg.

**1 Ciclo      95 °C,    1 min.**  
**T. A.        1 min.**  
**72 °C,     7 min.**

**Nota:** T. A. se refiere a la temperatura de alineamiento y dependerá de la sonda y por lo tanto de los oligonucleótidos que se utilicen.

**c.) Electroforesis del producto de RT-PCR**

- **Preparación del gel de agarosa al 1.0 %**

Se pesan 0.55 g de agarosa (Agarosa MP, Boehringer Mannheim GmbH libre de DNAsas y RNAsas) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se agregan 55 mL de buffer TAE (1X) y se disuelve completamente en el horno de microondas a un nivel de calentamiento de 4 durante 3 min. Se deja enfriar un poco y se agregan 5 µL de bromuro de etidio 2 mg/mL. Se agita suavemente y se vacía la mezcla a la cámara de electroforesis de 12 x 14 cm. con un peine de 6 pozos y se deja solidificar.

- **Preparación de la muestra**

**A un microtubo estéril se le agregan:**

**4 µL de buffer TAE (1X)**

**2 µL de buffer de carga**

**Todo el producto de PCR**

- **Preparación del marcador de peso molecular**

**4  $\mu$ L de buffer TAE (1X)**

**2  $\mu$ L de buffer de carga**

**2  $\mu$ L de marcador de peso molecular XIV, 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L, de 100 a 2642 pb (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, cat. 1721933), o bien una escalera de DNA de 100 a 1500 pb de Boehringer Mannheim.**

Los tubos se agitan en vortex y se centrifugan brevemente. Se remueve el peine del gel de agarosa y se le agrega suficiente buffer TAE (1X) hasta cubrir el gel y los pozos. Se colocan las muestras en los pozos y se corre el gel a 9.5 V (95 Volts, 95 mAmp) hasta que el azul de bromofenol migre 2/3 del gel, aproximadamente por 45 minutos.

**d.) Electroelución de los productos de RT-PCR**

Se enjuagan las membranas de diálisis en agua desionizada y se mantienen a temperatura ambiente por 10 min. en buffer TAE (1X). Transcurrido este tiempo, se le coloca una pinza por uno de los extremos.

Una vez que el gel terminó su corrimiento, se coloca en el transiluminador para cortar las bandas que corresponden al número de pares de bases que se esperan. Eliminar la mayor cantidad de gel posible; se introducen los fragmentos de gel que contienen las bandas a la membrana y

se agrega la mínima cantidad de buffer TAE (1X) necesaria para evitar que con el corrimiento el gel se seque. Se cierra con una pinza el otro extremo de la membrana y se coloca nuevamente en la cámara de electroforesis. Se corre a 9.5 V (95 Volts, 95 mAmp) por 45 min. y posteriormente se invierten los polos para correrse también a 95 Volts por un minuto con el objeto de despegar el producto de la membrana.

Posteriormente con ayuda de una pipeta se extrae el buffer TAE (1X) de la membrana que contiene la sonda electroeluida.

#### e.) Cuantificación de sondas

Para estimar la cantidad de DNA se utiliza la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio que se encuentra intercalado en las moléculas del DNA en el ultravioleta. La cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa total del DNA y esta cantidad se puede estimar, comparando la fluorescencia de la muestra con un estándar de masa (Escalera de baja masa, GIBCO BRL, cat. 10068-013). La cantidad de DNA detectable va desde 1 hasta 5 ng.

Se hace un gel de agarosa al 2% (libre de DNAsas y RNAsas) y se preparan las siguientes muestras:

**Marcador de masa: 4  $\mu$ L del marcador**

**2  $\mu$ L de buffer de cargado**

**4  $\mu$ L de buffer TAE (1X)**

**Productode PCR: 4  $\mu$ L de la sonda electroeluida**

**2  $\mu$ L de buffer de cargado**

**4  $\mu$ L de buffer TAE (1X)**

**Se corre el gel a 9.5 V (95 Volts, 95 mAmp) hasta que el azul de bromofenol migre 2/3 del gel, aproximadamente por 45 minutos.**

#### **5.12.2 Extracción de RNA por TRIZOL**

**Este método se utiliza para extraer RNA total de cualquier tejido y en nuestro caso se utilizó para la extracción de RNA total a partir de hígado. La técnica se basa en la de Chomczynski y Sacchi (77) de un sólo paso, en la que el aislamiento de RNA se lleva a cabo con una mezcla de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo; el tiocianato de guanidina es un potente desnaturante de proteínas y la diferencia con el TRIZOL es que este reactivo es una solución comercial en la que el fenol y el isotiocianato de guanidina se encuentran en una sola fase.**

**Se lava el politrón, en este caso, marca Kinematica (Mod. PT-2000) con agua desionizada, agua-DEPC y con solución desnaturante antes de comenzar y entre cada una de las muestras. En un tubo corex de 15 mL, se añaden 2 mL de TRIZOL por cada 200 mg de tejido y se homogeniza a velocidad 2. La muestra es incubada por 5 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añaden al homogenado 400 $\mu$ L de cloroformo al 100%, se mezcla vigorosamente en vortex por 1 min. Se centrifuga a 12,100xg**

(10, 000 rpm) por 10 min. a 4°C en una centrifuga Beckman (mod. J2-MC) utilizando un rotor JA-20.

La fase inferior es la fase fenol-cloroformo, y la superior es la fase acuosa que contiene el RNA. Se transfiere a un tubo corex nuevo, para añadirle 1 mL de isopropanol frío al 100%, se mezcla en vortex y se incuba por 20 min. a -20 °C. Se centrifuga por 15 min. a 12,100 xg (10, 000 rpm) a 4 °C. El sobrenadante se desecha por inversión del tubo y el botón de RNA se lava con 800 µL de etanol frío al 75% en agua-DEPC. Se resuspende el botón por pipeteo constante y se transfiere el contenido a un microtubo nuevo. Finalmente se centrifuga a 12,100 xg (10, 000 rpm) por 15 min. a 4 °C en una microcentrifuga Eppendorf (mod. 5402). El sobrenadante es desechado por inversión y el botón se seca utilizando un pañuelo desechable. Resuspender el botón en aprox. 500µL de formamida con ayuda del vortex. Una vez que el botón de RNA se encuentra perfectamente bien disuelto, se calienta el tubo a 65 °C por 5min.

### 5.12.3 Cuantificación de RNA

El RNA se cuantifica midiendo su densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro (Beckman mod. DU 640).

En un microtubo se colocan 996µL de buffer TE pH 7.5 y 4µL de la muestra de RNA. Se mezclan ligeramente en vortex y se leen a 260 nm en celdas de cuarzo.

Para corroborar la pureza del RNA se toma la lectura a 260 y a 280 nm para obtener la relación 260/280 que debe ser de 1.9 – 2.2. Si la densidad óptica del RNA no diera un valor dentro de este intervalo, se puede decir que el RNA se encuentra contaminado con proteínas.

Posteriormente se hace un barrido de la muestra de 230 a 290 nm.

Para calcular la concentración del RNA:

1 D. O. ——— 40 µg de RNA

D. O. muestra — X µg de RNA

(X µg de RNA) ( Factor de dilución = X' µg de RNA / mL).

Finalmente se ajusta el RNA a una cantidad de 15 µg para el corrimiento de la electroforesis

D. O. = Densidad Óptica

#### 5.12.4 Electroforesis de RNA

- Preparación del gel de agarosa al 1%

Se coloca el peine de 12 pozos en la cámara de electroforesis, previamente enjuagada con agua-DEPC y se equilibra. Se pesa 1 g de agarosa (GIBCO BRL, libre de DNAsas y RNAsas) y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se añaden 72 mL de agua-DEPC y se calienta 3 minutos a nivel 5 en horno de microondas. Transcurrido este tiempo se añaden 10 mL de buffer de corrimiento (10X) y 18 mL de formaldehído al 40%. Se mezcla el contenido del matraz y se vacía el gel en la base del molde

de la cámara de electroforesis, evitándo que se formen burbujas. Se deja solidificar y se agrega un poco de buffer de corrimiento (1X) frío sobre la superficie del gel para evitar que se seque. Se cubre con papel de alimentos y se deja enfriar en el refrigerador.

- Preparación de la muestra

Mezclar el RNA en vortex y se agrega la cantidad de 15  $\mu\text{g}$  en el fondo de un tubo eppendorf libre de DNAsas y RNAsas nuevo. Se agregan también 1.7  $\mu\text{L}$  de buffer de corrimiento (10 X), 2.3  $\mu\text{L}$  de formaldehído, la cantidad necesaria de formamida, de tal manera que el volumen final con el RNA sea de 11  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  de buffer de cargado y 2  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Se mezcla el contenido del tubo en vortex y se centrifuga brevemente en la microcentrífuga para asegurarnos que todo se encuentre en el fondo del tubo. Se incuba a 65°C por 5 min.

- Cargado y corrimiento del gel

Se remueve el peine de la base del molde con cuidado y se coloca el molde con la zona de los pozos del lado del cátodo de la cámara. Se añade suficiente buffer de corrimiento (1X), previamente frío, para cubrir el gel. Colocar el contenido del microtubo en el gel con una pipeta de 10  $\mu\text{L}$ , con cuidado de no hacer burbujas. Correr el gel a 10 V/cm (100 volts) hasta que el

colorante de azul de bromofenol migre a 2/3 del gel, que es en aproximadamente por 2.5 hrs.

#### 5.12.5 Fotografía del gel

Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento se coloca el gel sobre un refractario con agua desionizada y se toma la fotografía del mismo.

#### 5.12.6 Transferencia de RNA del gel a la membrana

Se coloca el gel en agua desionizada por 15 minutos y después se hace un cambio por agua desionizada nueva, en la que el gel se quedará por otros 30 minutos. Mientras transcurre este tiempo, se coloca un vidrio de 20 x 20 cm. sobre un platón rectangular de vidrio de 30 x 20 cm. y se agregan aproximadamente 400 mL de solución SSC 20X en la base. Una vez equilibrado el vidrio sobre el platón rectangular se moja un pedazo de papel 3 MM Whatman de 15 x 30 cm. con la solución SSC 20X y se eliminan las burbujas rotando una pipeta Pasteur sobre la superficie. Se coloca sobre la superficie del vidrio que está sobre el platón dejando los extremos en contacto con la solución, formando un puente. Se colocan tres cuadros de papel 3 MM Whatman de 13 x 15 cm. sobre el puente y se mojan con SSC 20X, también se eliminan las burbujas. Se coloca el gel sobre los cuadros de papel 3 MM y una vez más se eliminan las burbujas. Se cortan 4 tiras de papel de plástico para alimentos y se ponen sobre los bordes del gel. Se coloca la membrana

de transferencia de ácido nucleico Hybond-N+ (Amersham, UK) de 12 x 14 cm. sobre el gel y se cubre con SSC 20X. Eliminar las burbujas rodando una pipeta Pasteur sobre la superficie. Se colocan cinco rectángulos de papel 3 MM Whatman de 12 x 14 cm. sobre la superficie de la membrana de nylon y también se mojan con la solución 20X evitando la formación de burbujas. Se colocan toallas de papel del mismo tamaño de la membrana (12 x 14 cm.) y se apilan sobre el papel 3 MM Whatman hasta completar una altura de 5 - 7 cm. Finalmente se cubre todo el platón con papel de envoltura de alimentos y sobre éste a su vez se coloca un peso de aproximadamente 1 Kg. Se deja sin moverse por espacio de aproximadamente 24 horas.

Transcurrido el tiempo, quitar las toallas y los filtros de papel y recuperar la membrana de nylon y el gel aplanado. Marcar la orientación de las muestras en la membrana. Se lava la membrana en SSC 2X, por 10 minutos y se pone a secar en la campana sobre papel 3 MM de 30 -35 min. Se fija el RNA a la membrana con UV a 700 lambdas en un crosslinker (Amersham, UK) y se cubre con papel de plástico para ser guardada en refrigeración hasta su marcaje.

#### 5.12.7 Hibridación del mRNA con la sonda

Previo al comienzo se encienden el homo de hibridación a 65 °C y un baño con agua a 37°C. También se pondrá a calentar agua hasta la ebullición.

- **Prehibridización**

Se colocan 15 mL de buffer de prehibridación Rapid Hyb (Amersham Pharmacia Biotech, cat. 1636) en un tubo de hibridación que ya tiene la membrana en su interior y se eliminan todas las burbujas con ayuda de una pipeta. Se deja la membrana prehibridando a 65°C en el horno de hibridación por una hora a velocidad 5.

- **Marcaje de la sonda con <sup>32</sup>P**

Se calienta a ebullición el tubo de la sonda (diluida en buffer TE hasta obtener una concentración de 2.5 a 25 ng) por 5 minutos para desnaturalizar el DNA y posteriormente se coloca el tubo en hielo por otros 5 minutos para mantener abiertas las hebras. Se centrifuga el tubo (spin) con la sonda desnaturalizada por 4 seg. y se agrega toda la sonda al tubo de reacción de Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, cat. 1633) sin mezclar. Posteriormente se adicionan 4 µL de <sup>32</sup>P dCTP (Amersham Pharmacia Biotech. 3000 Ci/mmol, cat. AA0005), y se mezcla con pipeta sin formar burbujas hasta que el color del tubo de reacción sea violeta y uniforme; se incuba a 37 °C por una hora. Transcurrido el tiempo se agregan 5 µL de EDTA 0.2 M y se calienta a ebullición por 5 minutos. A continuación se coloca en hielo por otros 5 min. Se saca el tubo de hibridación del horno. Se pipetea aprox. 500 µL de buffer colocado en el tubo de hibridación y se agrega al tubo que contiene la sonda. Se retiran otros 5 mL de buffer de prehibridación del tubo que contiene a la

membrana y se pipetea todo el contenido del tubo de reacción y se deposita en el fondo del tubo de hibridación, se humedece la membrana y se incuba en el horno de hibridación a 65 °C por 2.5 hrs. a velocidad 5.

Una vez que ha transcurrido ese tiempo, se saca la membrana del tubo de hibridación y se coloca en un recipiente de vidrio con 120 mL de solución 2XSSC/1X SDS. Se lava la membrana a temperatura ambiente durante 20 min. Mientras tanto, se coloca en una probeta 120 mL de solución 0.1XSSC/0.1XSDS e incubarla a 65°C en el horno de hibridación. Sacar la membrana del recipiente y colocarla en otro, precalentado a 65°C, que contiene la solución 0.1XSSC/0.1XSDS. Incubar el recipiente a 65 °C con agitación por 15 min. Repetir una vez más el último paso de lavado.

#### **5.12.8 Autoradiografía Electrónica (Instant Imager)**

Envolver la membrana en papel plástico evitando la formación de burbujas entre la membrana y el papel, con ayuda de una pipeta Pasteur y leer en el Sistema de Autorradiografía Electrónica: Instant Imager (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Una vez que se tienen las señales, se determinan las cuentas por minuto emitidas por la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  hibridada con el mRNA específico de interés.

#### **5.12.9 Autoradiografía en Cassette.**

Se coloca la membrana en un cassette de autorradiografía con una placa intensificadora de rayos X y se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Transcurridas aprox. 24 hrs. se revela la radiografía.

### **5.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se presentan como las medias  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Los datos fueron evaluadas con una ANOVA de 2 vías, teniendo como variables independientes al tiempo y el tratamiento dietario. Triglicéridos, colesterol, contenido de cada fracción de lipoproteínas al final del estudio, y porcentaje de esclerosis renal, fueron evaluadas con una ANOVA de una sólo vía.

Las diferencias significativas entre grupos y tiempo se determinaron con una prueba de diferencias mínimas significativas de Fischer, usando el programa Statview para Macintosh (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Se consideraron diferencias significativas con una  $p < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

**Consumo de alimento.** Ratas controles alimentadas con proteína de soya o caseína consumieron cantidades similares de dieta durante los 64 días de estudio. La inducción del SNCE con ANP no cambió el patrón del consumo de alimento observado en las ratas controles, con excepción de los días 28 y 35, en los que las ratas nefróticas mostraron una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en el consumo de alimento.

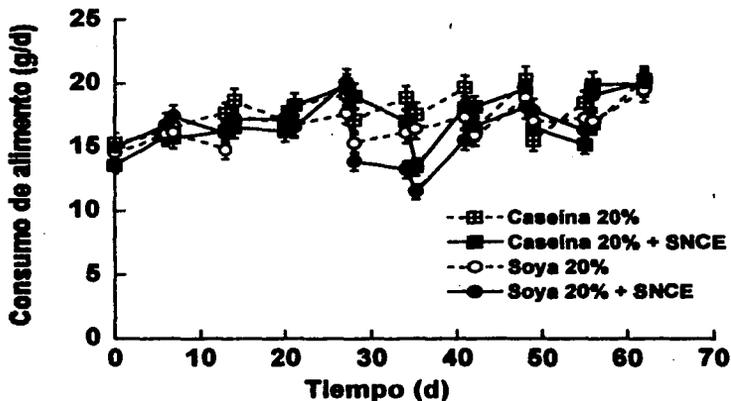


Fig. 6. Consumo de alimento en ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. El registro del consumo de alimento se realizó los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las ratas tuvieron libre acceso a la dieta durante el periodo experimental.

**Ganancia de peso.** La ganancia de peso no siguió el mismo patrón que el consumo de alimento. El grupo control alimentado con caseína, tuvo una mayor tasa de crecimiento, aproximadamente de 4.4 g/d, mientras que el alimentado con proteína de soya de 3.6 g/d. La tasa de crecimiento fue significativamente diferente entre los grupos de caseína y soya a partir del día 21 y hasta el final del experimento. Durante los 30 primeros días del estudio, las ratas nefróticas mostraron tasas de crecimiento similares a las de su grupo control (4.5 g/d para caseína y 3.6 g/d para soya); sin embargo, después del día 40, las ratas con SNCE alimentadas con proteína de soya tuvieron una ganancia de peso menor que las nefróticas alimentadas con caseína ( $p < 0.05$ ).

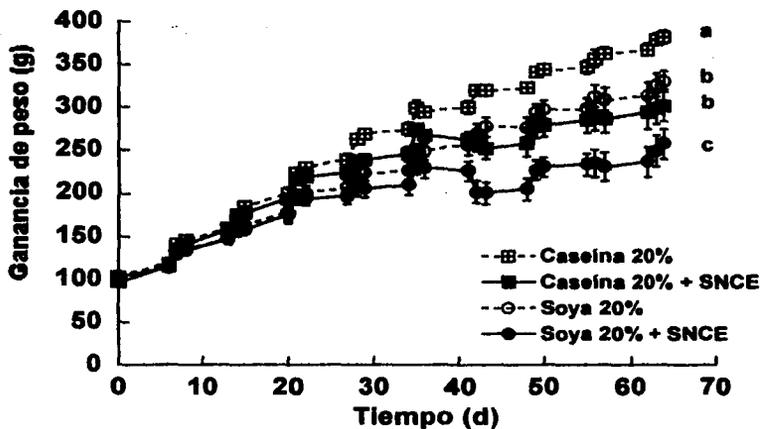


Fig. 7. Ganancia de peso de ratas alimentadas con 20 % de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. El registro del peso se llevó a cabo en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n=10$  en cada punto. Las letras indican las velocidades de ganancia de peso que fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c$ , ANOVA de dos vías).

**Proteinuria.** La excreción de proteínas urinarias no cambió significativamente entre los grupos controles tanto de caseína como de soya, durante el estudio; las concentraciones se mantuvieron por debajo de 22 mg/24 h. Como se muestra en la gráfica, a partir del día 10 de estudio, las ratas con SNCE alimentadas con caseína o soya muestran una proteína urinaria significativamente mayor que los grupos controles. Sin embargo, la proteinuria siempre fue significativamente mayor en las ratas nefróticas alimentadas con caseína comparado con la que fueron alimentadas con soya. Al final del estudio la proteína urinaria fue 21 veces mayor en ratas con SNCE alimentadas con caseína con respecto a su grupo control, mientras que las de SNCE alimentadas con soya tuvieron una proteinuria 12 veces mayor a la que presentaba su grupo control. Además, las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya redujeron su excreción urinaria en un 53% comparado con las alimentadas con caseína.

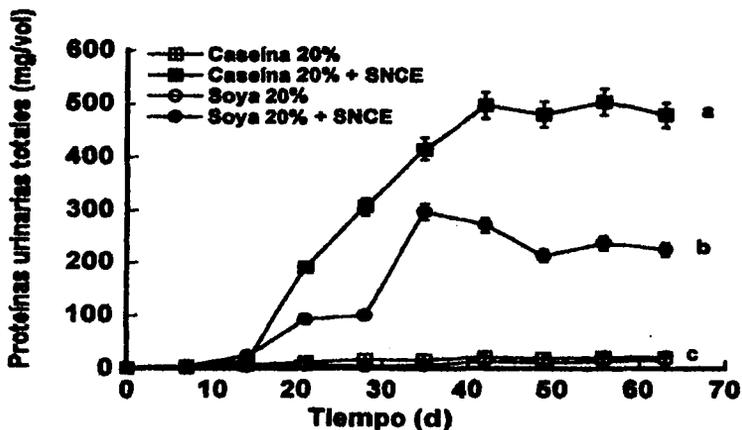
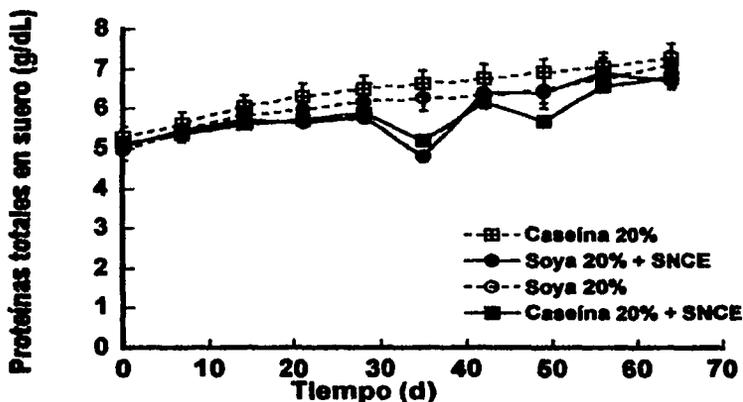


Fig. 8. Proteínas totales en orina en ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican valores de excreción urinaria significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c$ , ANOVA de dos vías).

**Proteínas Séricas.** Las ratas controles de caseína mostraron la mayor concentración de proteínas séricas, seguidas de las controles de soya. El análisis de ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en las proteínas totales séricas entre el tiempo, grupos e interacción tiempo-grupos. Las ratas con SNCE tanto de soya como de caseína, mostraron una disminución significativa en las proteínas totales en suero con respecto a sus controles.



**Fig. 9.** Proteínas totales en suero en ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM, n = 10 en cada punto.

**Albumina Sérica.** Al igual que en el caso de las proteínas séricas, las ratas controles alimentadas con caseína mostraron una concentración mayor de albúmina sérica (aproximadamente un 10%), comparado con el grupo control de soya ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, al final del protocolo, no se observa diferencia entre los grupos controles. Las ratas con SNCE alimentadas con caseína tuvieron una concentración de albúmina sérica 33% menor que su grupo control, mientras que las nefróticas alimentadas con soya, sólo una disminución del 20% con respecto a su control. No hubo una diferencia significativa en la concentración de albúmina sérica entre los grupos nefróticos durante el estudio.

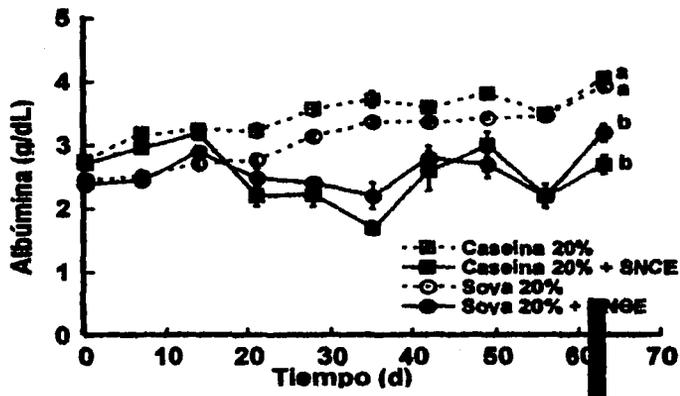


Fig. 10. Concentraciones de albúmina en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican valores de albúmina sérica significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b$ , ANOVA de dos vías).

**Depuración de Creatinina.** El aumento de la pérdida de proteínas en orina se acompañó de una reducción en la depuración renal de creatinina. En el día 35 de estudio, la depuración de creatinina mostró una reducción significativa en los grupos nefróticos en comparación a sus respectivos controles y lo mismo se observa al final del estudio. Sin embargo, la reducción en la depuración de creatinina en el grupo nefrótico alimentado con soya fue significativamente menor, comparado al observado en el grupo con SNCE alimentado con caseína (24% vs 67%,  $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que las ratas nefróticas alimentadas con caseína muestran una mayor disminución en la función renal que las alimentadas con proteína de soya.

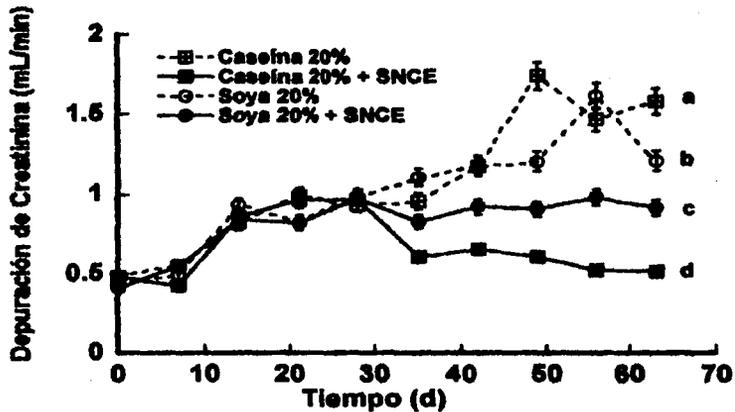
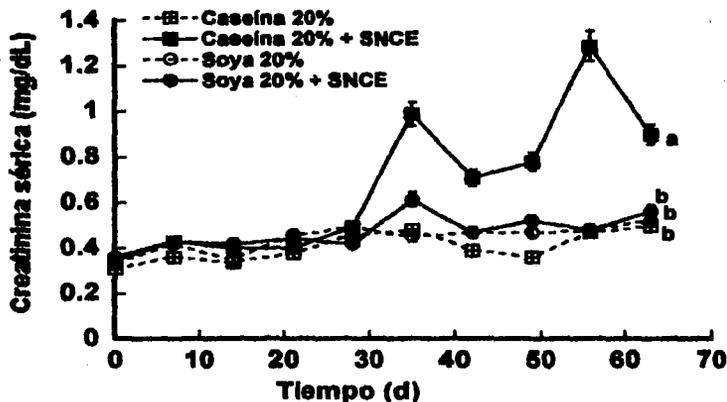


Fig. 11. Depuración de creatinina en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$ . Diferentes letras indican diferentes valores de excreción urinaria significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c > d$ , ANOVA de dos vías).

**Creatinina Sérica y Nitrógeno de Urea en Sangre (BUN).** Las concentraciones de ninguno de estos dos parámetros fueron significativamente diferentes entre los grupos controles de caseína y soya ( $0.41 \pm 0.02$  vs  $0.45 \pm 0.2$  mg/dL respectivamente). Durante los primeros 28 días de estudio, no hubo diferencias de la creatinina sérica y el BUN entre los grupos controles y los nefróticos. Sin embargo, a partir del día 35 y hasta el final del estudio, las ratas con SNCE alimentadas con caseína mantuvieron altas concentraciones de creatinina sérica y BUN, con respecto a su grupo control. Fue también en el día 35, en que las ratas con SNCE alimentadas con soya aumentaron significativamente las concentraciones de estos dos parámetros ( $p < 0.05$ ), pero después de este día regresaron a valores similares a los observados en el grupo control alimentado con soya.



**Fig. 12.** Concentraciones de creatinina en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican los valores de creatinina sérica significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b$ , ANOVA de dos vías).

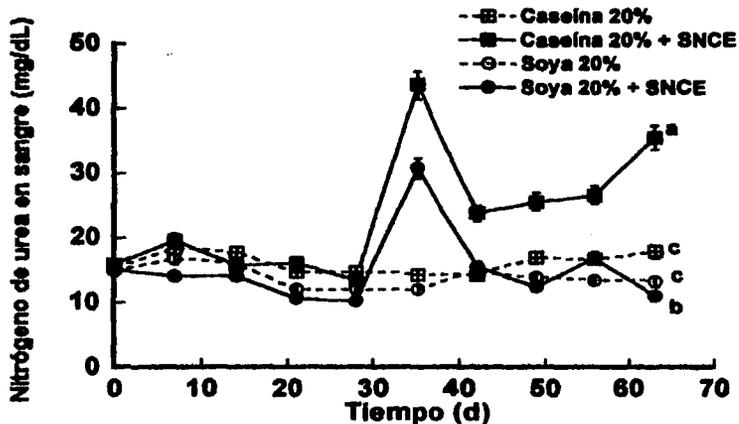


Fig. 13. Concentraciones de nitrógeno ureico en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican valores de nitrógeno ureico en suero significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c > d$ , ANOVA de dos vías).

**Triglicéridos y Colesterol Séricos.** En los grupos controles tanto de caseína como de soya los triglicéridos ( $99.5 \pm 4.1$  vs  $74 \pm 5.7$  mg/dL) y el colesterol ( $65.1 \pm 1.8$  vs  $72.1 \pm 2.3$  mg/dL) no muestran diferencias significativas. Es a partir del día 2 de estudio, que los grupos de ratas con SNCE muestran mayores concentraciones de triglicéridos y colesterol ( $p < 0.05$ ) en comparación a sus grupos control. Sin embargo, a partir del día 21, y hasta el día 63 del estudio, las ratas con SN alimentadas con proteína de soya, muestran un menor incremento tanto en triglicéridos como en colesterol con respecto a las nefróticas alimentadas con caseína. En el día 63 de estudio, la proteína de soya, a diferencia de la caseína, resultó disminuir en un 56% los niveles de triglicéridos y en un 59% los de colesterol en las ratas nefróticas. Al final del protocolo, los triglicéridos se encontraban elevados en un 230% en las ratas con SNCE alimentadas con caseína con respecto a su grupo control, mientras que en el caso de los animales con SNCE y la dieta de soya, este aumento fue tan sólo del 70% con respecto a su grupo control. El patrón en las concentraciones séricas de colesterol fue similar: los animales con SNCE alimentados con caseína tuvieron un incremento del 460%, mientras que los que consumieron soya, del 140% con respecto a sus grupos controles.

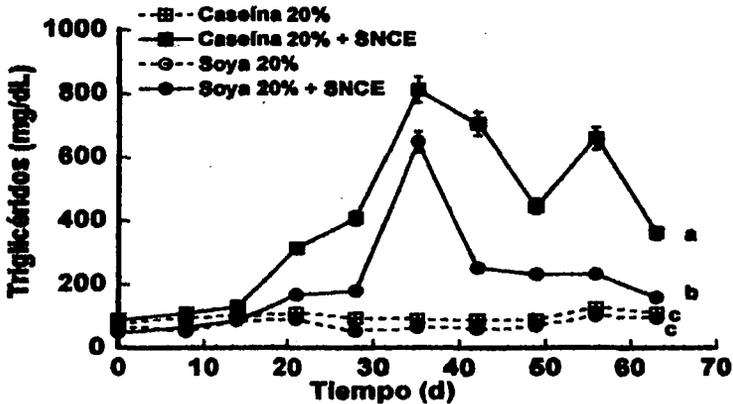


Fig. 14. Concentraciones de triglicéridos en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican valores de triglicéridos séricos significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c$ , ANOVA de dos vías).

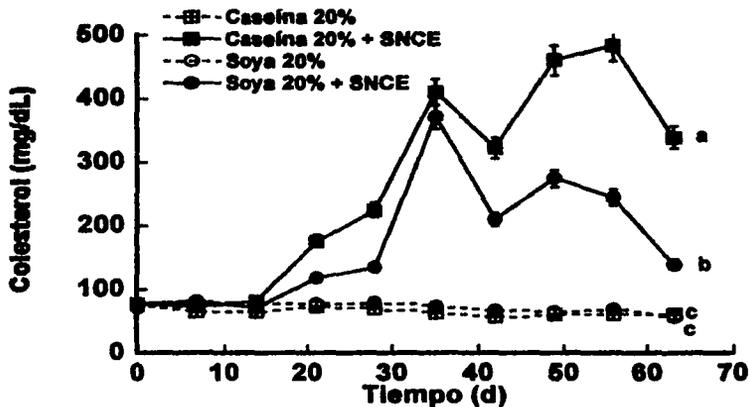


Fig. 15. Concentraciones de colesterol total en suero de ratas alimentadas con 20% de caseína y 20% de proteína de soya con SNCE. Las determinaciones se realizaron los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 62 del estudio. Los valores son promedios  $\pm$  SEM,  $n = 10$  en cada punto. Las letras indican valores de colesterol significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $a > b > c$ , ANOVA de dos vías).

**Perfil de Lipoproteínas.** No hay diferencias significativas en el perfil de lipoproteínas de triglicéridos entre los grupos controles. Las ratas con SNCE alimentadas con caseína mostraron las mayores concentraciones de triglicéridos en las fracciones de VLDL, LDL y HDL ( $p < 0.05$ ); los triglicéridos fueron encontrados principalmente en la fracción de VLDL y fueron significativamente elevados con respecto a las ratas con SNCE alimentadas con proteína de soya ( $p < 0.05$ ). El grupo nefrótico alimentado con caseína tuvo una concentración de VLDL-TG 4.4 veces más elevada que su homólogo con proteína de soya. Las fracciones de LDL-TG y HDL-TG mostraron un aumento del 83% y 102% en el contenido de triglicéridos en las ratas con SNCE alimentadas con caseína con respecto al grupo nefrótico de soya.

Al igual que en el caso anterior, no se observan diferencias significativas en el contenido de colesterol en las subclases principales de lipoproteínas entre los grupos controles con ambas dietas. De nuevo, el grupo de caseína con SNCE mostró una concentración significativamente mayor de colesterol en las fracciones VLD, LDL y HDL comparado con el grupo de soya ( $p < 0.05$ ). El colesterol fue principalmente encontrado en la fracción de LDL. Las ratas con SNCE alimentadas con de caseína mostraron una concentración de LDL-C 2.9 veces mayor que las del grupo con SNCE alimentado con soya. Las fracciones de VLDL-C y HDL-C mostraron un aumento de 279% y 57% respectivamente, en los animales nefróticos alimentados con caseína con respecto a los animales alimentados con soya.

	VLDL-TG	IDL-TG	LDL-TG	HDL-TG
Tratamiento	mg/dL			
Caseína	46.8 ± 6.6 <sup>b</sup>	18.2 ± 1.3	2.9 ± 1.0 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>c</sup>
Caseína + SNCE	368.5 ± 83.6 <sup>a</sup>	19.9 ± 1.1	28.6 ± 6.9 <sup>a</sup>	8.1 ± 2.0 <sup>a</sup>
Soya	36.1 ± 3.1 <sup>b</sup>	16.8 ± 1.1	2.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>b,c</sup>
Soya + SNCE	83.4 ± 15.8 <sup>b</sup>	18.8 ± 1.4	15.6 ± 1.7 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.2 <sup>b</sup>

**Tabla 8. Perfil de lipoproteínas que contienen triglicéridos. Sueros de ratas nefróticas (SNCE) alimentadas con caseína o proteína de soya al final del experimento (día 64).**

	VLDL-Col	IDL-Col	LDL-Col	HDL-Col
Tratamiento	mg/dL			
Caseína	5.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	5.6 ± 1.1	24.0 ± 2.3 <sup>b</sup>	51.0 ± 0.9 <sup>c</sup>
Caseína + SNCE	53.1 ± 13.6 <sup>a</sup>	8.7 ± 1.3	295.2 ± 84.4 <sup>a</sup>	142.3 ± 24.5 <sup>a</sup>
Soya	4.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.3	35.2 ± 4.4 <sup>b</sup>	46.7 ± 0.7 <sup>c</sup>
Soya + SNCE	14.0 ± 2.4 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.3	101.1 ± 11.7 <sup>b</sup>	90.4 ± 5.2 <sup>b</sup>

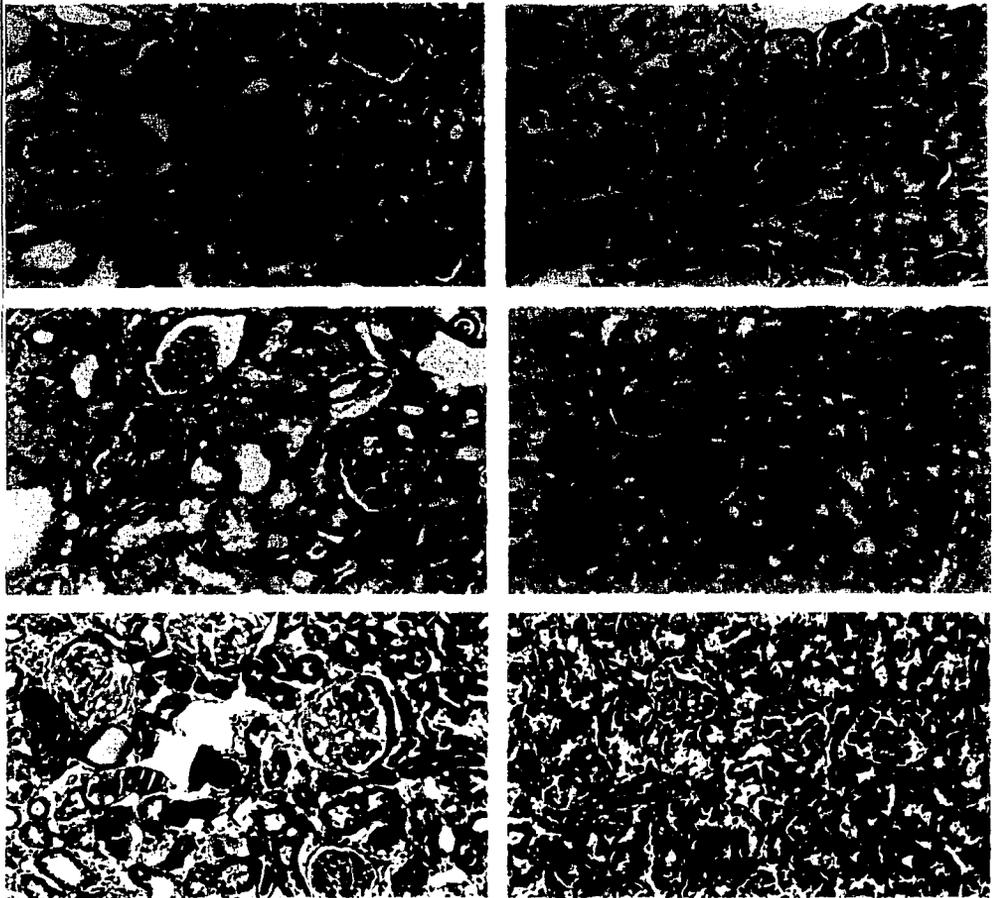
**Tabla 9. Perfil de lipoproteínas que contienen colesterol. Sueros de ratas con SNCE alimentadas con caseína o proteína de soya al final del experimento (día 64).**

**Análisis Histológico.** Las ratas con SNCE alimentadas con caseína desarrollaron proliferación segmental mesangial, con expansión de la matriz, obliteración del lumen capilar y fibrosis con adhesión entre el túbulo glomerular y la cápsula de Bowman. El intersticio muestra zonas de inflamación celular mononuclear con fibrosis, y muchos túbulos corticales muestran atrofia epitelial y cilindros hialinos en el lumen. La incidencia de glomérulos con lesiones escleróticas en ratas con SNCE alimentadas con caseína fue de  $76.6 \pm 7.6\%$ , y el porcentaje medio del área fibrótica en estos glomérulos fue de  $37.3 \pm 9\%$ . En contraste, ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya, mostraron una incidencia de glomérulos esclerosados significativamente menor ( $17.8 \pm 5.9\%$ ,  $p < 0.05$ ), así como una menor área fibrótica afectando la matriz mesangial y los huecos capilares glomerulares ( $7.8 \pm 9\%$ ,  $p < 0.05$ ), con fibrosis intersticial y daño tubular mínimos.

En la tinción de hematoxilina y eosina, se observa que las ratas alimentadas con caseína mostraban una severa glomérulo esclerosis focal y segmentaria (GEFS), típica del SNCE. En estas mismas ratas, se observaron túbulos renales con depósitos de proteína, revelando una mayor excreción de proteína a través de la orina. En cuanto a las ratas con SNCE alimentadas con proteína de soya, los glomérulos se encontraron con un menor daño y las células mesangiales mostraron una apariencia casi normal. Con la dieta de caseína el espacio de filtración glomerular es mucho menor.

Las tinciones de PAS y Masson mostraron un mayor grado de fibrosis en el tejido renal de las ratas alimentadas con caseína. El 75% de los glomérulos renales de las ratas alimentadas con caseína mostraron lesión

esclerótica en comparación con los riñones de los animales alimentados con proteína de soya que mostraron sólo el 48% de glomérulos dañados, lo que afectó al 17% de la matriz mesangial y asas capilares ( $p < 0.05$ ). Además de la esclerosis glomerular, los animales con SNCE alimentados con caseína mostraron áreas de inflamación crónica intersticial, atrofia tubular extensa con numerosos cilindros hialinos y fibrosis intersticial con hiperplasia de la capa media de numerosas arterias y arteriolas. Estos cambios histológicos fueron mínimos en los animales con SNCE que consumieron proteína de soya.

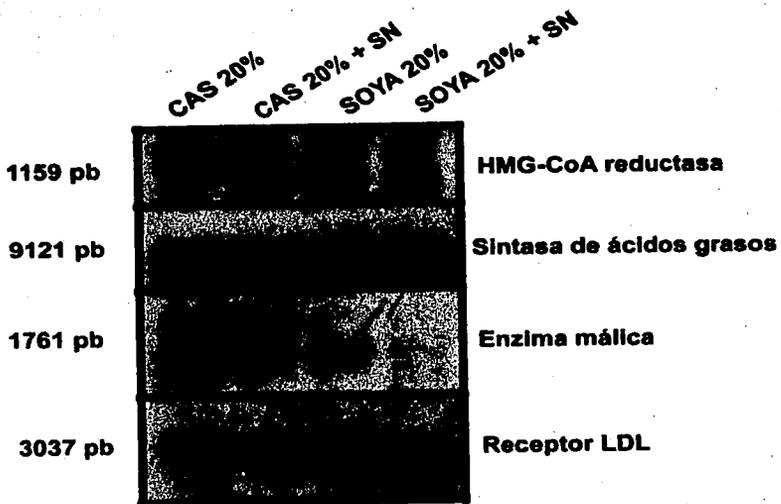


**Fig. 16. Análisis histológico de riñones de ratas con SNCE. Las imágenes del lado izquierdo corresponden a las ratas alimentadas con caseína al 20% y las del derecho a las de soya al 20%. A y B: Tinción de hematoxilina y eosina. C y D: Tinción de Masson. E y F: Tinción de PAS.**

**Expresión Génica de FAS, ME, HMGCoA-R y r-LDL.** La figura muestra el análisis de northern blot utilizado para evaluar los efectos durante el SN de caseína y soya sobre genes hepáticos involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y colesterol. Hablando de los grupos controles, y exclusivamente del tipo de proteína de la dieta, la ingestión de soya disminuyó la expresión génica de FAS en un 44% y de ME en un 47%, e incrementó la expresión de HMGCoA-R y del r-LDL en un 142% y 68% respectivamente, en comparación al grupo que consumió caseína.

En cuanto a las ratas con SNCE que consumieron una dieta de caseína, la disminución en la expresión de la FAS fue de 51% y de ME de 39%, comparado con su grupo control. El mismo comportamiento se presenta en las ratas con SNCE alimentadas con soya, y la disminución en la concentración del mRNA de FAS y de ME fue de 23 y 15% respectivamente, comparadas con su grupo control.

Ratas con SNCE alimentadas con caseína incrementaron las concentraciones de mRNA sólo de la HMGCoA-R en un 63% con respecto a las ratas controles alimentadas con la misma dieta; mientras que las ratas con SNCE alimentadas con soya mostraron una reducción tanto de la HMGCoA-R, como del r-LDL, en un 28 y 50%, respectivamente en comparación a su grupo control.



**Fig. 17 Northern blot de hígado. Los carriles muestran el grupo al que pertenecen cada una de las muestra.**

## **VII. DISCUSIÓN**

En la última década, diversas investigaciones han destacado los beneficios que brinda la soya para la salud. Un ejemplo de esto, es el efecto hipocolesterolémico que tiene sobre los altos niveles de colesterol, importante parámetro de riesgo coronario, cardiopatías y aterosclerosis. También se le asocia con la prevención de cáncer de mama y de próstata, se utiliza como tratamiento para mujeres en periodos pre-postmenopáusicos, trastornos renales, fibrosis quística, enfermedades inflamatorias y algunas enfermedades renales.

El síndrome nefrótico se asocia frecuentemente a enfermedades crónico degenerativas como la diabetes mellitus. La consecuencia del daño renal en el SN es la pérdida de diferentes proteínas plasmáticas, debido a una incapacidad del riñón de retener proteínas con cierto peso molecular. Como resultado, hay un aumento en la síntesis de proteínas en el hígado, que se exportan al plasma para contrarrestar la reducción de la presión oncótica (78). Al paso del tiempo, se incrementa el número de glomérulos dañados en el riñón, acentuándose el problema. Por tal motivo, la prevención de un deterioro posterior del riñón puede beneficiar a individuos con esta enfermedad renal.

En este estudio, se muestra evidencia de que el consumo de proteína de soya reduce el daño renal en ratas con síndrome nefrótico crónico experimental (SNCE) inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP), en comparación a ratas con el mismo padecimiento que consumieron una dieta a base de caseína. Las ratas con SNCE que consumieron una dieta de soya, mostraron una reducción en la excreción de proteínas totales, al igual que una mejoría en la depuración de creatinina, creatinina sérica, y BUN.

Se pueden proponer varios mecanismos potenciales para explicar el efecto benéfico de la soya. En primer lugar, el hígado incrementa la síntesis de proteínas plasmáticas para compensar la pérdida que se tiene de ellas en la orina durante el SNCE (79). Debido a la movilización de estas proteínas del hígado al plasma, se incrementa la concentración de VLDL. La señal que recibe el hígado de aumentar la síntesis de lipoproteínas probablemente involucra la detección de la disminución de la presión oncótica plasmática. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la tasa de síntesis de lipoproteínas por parte del hígado se encuentra elevada en pacientes analbuminémicos (2) observándose a su vez, una disminución en las vías catabólicas de las VLDL, IDL y LDL (70). Estas anomalías se relacionan con una baja actividad y cantidad de lipoprotein lipasa, actividad elevada de lipasa hepática y disminución en actividad y número de receptores de LDL. De hecho, ratas con SNCE alimentadas con caseína, mostraron concentraciones significativamente

elevadas de VLDL-TG y LDL-C con respecto a su grupo control (Tablas 8 y 9). Sin embargo, las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya mostraron niveles menores de VLDL-TG y LDL-C con respecto a las nefróticas que consumieron caseína. Los animales con SNCE que consumieron caseína tuvieron un incremento de VLDL-TG de 6.9 veces y de LDL-C de 11.3 veces con respecto a sus controles, mientras que las nefróticas con soya solamente 1.3 veces más de VLDL-TG y 1.9 veces más de LDL-C, con respecto a su control. Como consecuencia, las ratas que consumieron proteína de soya, que tenían SNCE, mostraron una reducción significativa de colesterol y triglicéridos séricos totales, comparadas con las nefróticas alimentadas con caseína.

Los pacientes nefróticos con proteinuria persistente, también presentan anomalías en los lípidos, lo que promueve aterosclerosis. De ahí que la reducción de colesterol y triglicéridos pueden retardar la progresión del daño glomerular y túbulo-intersticial durante el SNCE, como se observó en el estudio.

El consumo de la proteína de soya previene los eventos iniciales del daño glomerular debido a una reducción de los lípidos séricos (80). La alteración de la permeabilidad en el SNCE se acompaña de una acentuada filtración de lipoproteínas séricas. Las lipoproteínas y proteínas plasmáticas filtradas se acumulan en las células mesangiales y las estimulan a proliferar y

producir un exceso de material membranoso basamental; en consecuencia se presenta esclerosis glomerular. A largo plazo, la constante elevación de los flujos y la presión glomerular, favorecen la hiperfiltración y dañan las propiedades permeables y selectivas de los glomérulos. La pérdida resultante de glomérulos funcionales, ejerce un estímulo de retroalimentación positiva para la hiperfiltración compensatoria de los menos afectados, contribuyendo así a su destrucción. En este estudio, se observó un menor desarrollo de esclerosis glomerular en las ratas con SNCE alimentadas con una dieta a base de proteína de soya, indicando la importancia en la reducción de los lípidos séricos.

La corrección de los parámetros bioquímicos en ratas nefróticas que comieron soya, también se vió reflejada en estudios histológicos. En el caso de las ratas, la administración de ANP produce una enfermedad renal muy similar a la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) en humanos (81). Este padecimiento consiste en la esclerosis de algunos glomérulos y de éstos, sólo una porción se encuentra fibrosada (82). Se ha propuesto que estas lesiones fibróticas glomerulares pueden estar moduladas por una captura de lipoproteínas por parte del endotelio glomerular, células mesangiales y macrófagos infiltrados intraglomerularmente (83). Estas células fagocitan y oxidan a las LDL que contienen colesterol. Las lipoproteínas oxidadas alteran

la función endotelial y producen inflamación, favoreciendo la producción de citocinas fibrogénicas que resultan tóxicas para el riñón (84).

A parte de las propiedades hipocolesterolémicas, la soya puede reducir el daño renal por medio de sus isoflavonas. El aislado de proteína de soya provee aproximadamente 2 mg/g de proteína. Las principales isoflavonas presentes en la soya son genisteína y daidzeína (85) y contribuyen a la reducción del daño glomerular durante el SNCE. Las isoflavonas funcionan como antioxidantes (29) protegiendo a las partículas de LDL, a pesar de que su capacidad antioxidante es limitada (30). Recientemente, se ha demostrado que las isoflavonas pueden reaccionar con especies de oxígeno reactivas producidas por neutrófilos como parte de la respuesta inflamatoria(86); estas especies son principalmente peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, que reaccionan con el cloro y el óxido nítrico, llevando a la formación de ácido hipocloroso y peroxinitritos (87). Ambos compuestos reaccionan con los residuos de tirosina de las proteínas, produciendo proteínas cloradas y nitradas con funciones anormales. Como las isoflavonas poseen un anillo fenólico, igual al residuo de tirosina de las proteínas, pueden reaccionar en forma competitiva con el ácido hipocloroso y el peroxinitrito, reduciendo la cloración y la nitración de las proteínas. Este efecto ocurre en el riñón, previniendo el daño glomerular. Es así, como la soya disminuye el daño renal durante el SNCE, reduciendo las concentraciones circulantes de colesterol, y

previniendo la producción de proteínas anormales, como consecuencia de la respuesta inflamatoria.

La expresión génica de las enzimas involucradas en el metabolismo de colesterol se encuentra modulada por el colesterol intracelular, más que por el extracelular (88). Independientemente del aumento de las fracciones VLDL-TG en ratas con SNCE, en las ratas alimentadas con soya, hubo una disminución en la concentración de los mRNA de FAS y ME, mientras que esto no ocurrió en los animales control que consumieron la dieta de caseína. Estos datos implican que la concentración elevada de TG presentes en las partículas de VLDL son principalmente, el resultado de una alteración en la lipoprotein lipasa, lo que afecta la depuración de estas lipoproteínas, más que aumentar la síntesis de TG por parte del hígado. Estudios recientes muestran que la síntesis de LDL se encuentra aumentada durante el SNCE, sin embargo, su depuración está disminuida.

Normalmente del 60 al 80% de las moléculas de LDL, como aproximadamente el 50% de las de VLDL, son depuradas vía hepática a través del receptor de LDL (r-LDL) (88). Se observa que las ratas con SNCE independientemente de la dieta que consumieran, no mostraron diferencias en la concentración de mRNA del r-LDL hepático, mientras que las controles que consumieron una dieta de proteína de soya, mostraron un aumento

significativo en la expresión de este gen, a diferencia de lo observado en las ratas controles alimentadas con una dieta de caseína. Sin embargo, las ratas con SNCE alimentadas con caseína, mostraron un incremento significativo en el mRNA de HMGCoA-R, comparado con las ratas nefróticas alimentadas con soya. El aumento en la HMGCoA-R hepática puede indicar un aumento en la tasa de biosíntesis de colesterol en las ratas con SNCE alimentadas con caseína, como otros estudios han observado. El consumo de una dieta de proteína de soya, reduce la expresión de la HMGCoA-R, con una posible implicación en la baja tasa de síntesis de colesterol por parte del hígado.

Desde un punto de vista nutricional, la proteína de soya, puede tener muchas ventajas sobre las proteínas animales. Con tan sólo 25 g/día de proteína de soya se pueden reducir los niveles de colesterol en sujetos hipercolesterolémicos (20), y representa una forma no farmacológica, segura, viable y práctica de alcanzar una disminución en los niveles de colesterol.

Se ha sugerido que un consumo elevado de proteína puede tener efectos perjudiciales sobre el riñón, particularmente si hay una enfermedad renal preexistente. Sin embargo, los resultados sugieren que una dieta con un adecuado contenido de proteína de origen vegetal, reduce la proteinuria, el daño renal y la respuesta inflamatoria; normaliza el perfil de lipoproteínas, disminuye las concentraciones de colesterol y triglicéridos séricos, con

respecto a los individuos que reciben una dieta a base de proteína animal, además de mantener las tasas de crecimiento similar. Un estudio en humanos con SN, que consumieron una dieta con bajo contenido de proteína de soya en su dieta, mostró una disminución en las concentraciones de colesterol y LDL; sin embargo, estos individuos muestran también una disminución en peso corporal, debido a una baja concentración de proteína de soya en la dieta que se les administró (6). La proteína de soya puede tener un papel importante en la prevención y tratamiento de enfermedades renales (89). Es así como una cantidad de proteína de soya adecuada y cercana al requerimiento proteico, más que las dietas restringidas en cantidad de proteína, puede ser benéfico en tratamientos de colapso renal crónico a largo plazo, evitando el deterioro del estado nutricional de individuos con enfermedades renales.

## **VIII. CONCLUSIONES**

Los resultados de la investigación indican claramente el efecto benéfico de la soya, ya que una dieta al 20% de esta proteína redujo significativamente el daño renal en ratas con síndrome nefrótico crónico experimental (SNCE).

La reducción de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma y la disminución en la expresión génica de la sintasa de ácidos grasos y de la enzima málica en animales con SNCE alimentados con soya, nos permite afirmar que la soya actúa directamente sobre la biosíntesis de lípidos.

Este estudio demuestra que el consumo de una proteína vegetal como la soya, podría servir de terapia a muchos pacientes con enfermedades renales y de bajos recursos, reduciendo la progresión del daño renal.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Orth, S.R. and E. Ritz, *The nephrotic syndrome*. The New England Journal of Medicine, 1998. **338**(17): p. 1202-1211.
2. Wheeler, D.C. and D.B. Bernard, *Lipid abnormalities in the nephrotic syndrome: causes, consequences, and treatment*. Am J Kidney Dis, 1994. **23**(3): p. 331-346.
3. Radhakrishnan, J., et al., *The nephrotic syndrome, lipids, and risk factors for cardiovascular disease*. Am J Kid Dis, 1993. **22**(1): p. 135-142.
4. Kritchevsky, D., *Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history*. J Nutr, 1995. **125**: p. 589S-593S.
5. Ascencio, C., et al., *Reduced kidney branched chain aminotransferase expression in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome*. Life Sci., 1997. **61**(24): p. 2407-2415.
6. Grundy, S.M., *Second report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adults treatment panel II)*. Circulation, 1994. **89**: p. 1329-1445.
7. D'Amico, G., et al., *Effect of vegetarian soy diet on hyperlipidaemia in nephrotic syndrome*. Lancet, 1992. **339**: p. 1131-1134.
8. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med, 1995. **333**(276-282).

9. Messina, M., *Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease*. J Nutr, 1995. **125**: p. 567S-569S.
10. Tovar-Palacio, C., et al., *Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils*. J Nutr, 1998. **128**: p. 839-842.
11. Anderson, J.W., B.M. Smith, and C.S. Washnock, *Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(3): p. 464S-474S.
12. Ascencio, C., *Efecto de dos concentraciones de proteína dietaria sobre la expresión génica y la actividad enzimática de la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada, en el síndrome nefrótico experimental*. 1999, Universidad Iberoamericana.
13. Maddox, D.A., et al., *Protective effects of a soy diet in preventing obesity-linked renal disease*. Kidney Int, 2002. **61**: p. 96-104.
14. Anthony, M.S., *Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond*. J Nutr, 2000. **130**: p. 662S-663S.
15. Crouse, J.R., et al., *A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins*. Arch Intern Med, 1999. **159**: p. 2070-2076.
16. Soya, A.A.d.I., *Efecto de la soya en la salud*. 1999, Asociación Americana de la Soya: México. p. 13.
17. Potter, S.M., *Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy*. J Nutr, 1995. **125**: p. 606S-611S.

18. Merz-Demlow, B., et al., *Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**: p. 1462-9.
19. Ogborn, M.R., et al., *Soy protein modification of rat polycystic kidney disease*. *AJP-Renal Physiology*, 1998. **274**(3): p. F541-F549.
20. Bakhit, R.M., et al., *Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations*. *J Nutr*, 1994. **124**: p. 213-222.
21. Messina, M.J., *Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects*. *Am J Clin Nutr*, 1999. **70**: p. 439S-450S.
22. Boersma, B.J., et al., *Soy isoflavonoids and cancer - metabolism at the target site*. *Mut Res*, 2001. **480-481**: p. 121-127.
23. Shafir, E., et al., *Hepatic metabolic pattern in experimental nephrotic syndrome: glycolysis, gluconeogenesis, and amino acid metabolism*. *Am J Physiol*, 1974. **226**(1): p. 162-167.
24. Anderson, J.W., et al., *Effects of soy protein on renal function and proteinuria in patients with type 2 diabetes*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68** (suppl): p. 1347S-53S.
25. Anthony, M.S., T.B. Clarkson, and J.K. Williams, *Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68** (suppl): p. 1390S-3S.
26. Kontessis, P., et al., *Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins*. *Kidney Int*, 1990. **38**: p. 136-144.

27. Wright, S.M. and A.M. Salter, *Effects of soy protein on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamsters*. *Comp Biochem Physiol*, 1998. **119B**(2): p. 247-254.
28. Kanazawa, T., et al., *Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases*. *J Nutr*, 1995. **125**: p. 369S-646S.
29. Jenkins, D.J.A., et al., *The effect on serum lipids and oxidized low-density lipoprotein of supplementing self-selected low-fat diets with soluble-fiber, soy, and vegetable protein foods*. *Metabolism*, 2000. **49**(1): p. 67-72.
30. Barnes, S., et al., *Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action*. *Biofactors*, 2000. **12**(1/4): p. 209-214.
31. Nailausen, K. and H. Meinertz, *Lipoprotein(a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein(a) concentrations as compared with soy protein*. *Am J Clin Nutr*, 1999. **69**: p. 419-25.
32. Fujisawa, K., K. Ygasaki, and R. Funabiki, *Reduction of hyperlipidemia and proteinuria without growth retardation in nephrotic rats by a methionine-supplemented, low-soy-protein diet*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **61**: p. 603-6.
33. Glasslock, R.I.J. and B.M. Brnner, *Glomerulopatías importantes*, in *Principios de medicina interna*, T.R. Harrison, Editor. 1986: México.
34. Diamond, J.R. and M.J. Karnovski, *A putative role of hypercholesterolemia in progressive glomerular injury*. *Ann Rev Med*, 1992. **43**: p. 83-90.

35. Liang, K. and N.D. Vaziri, *Down-regulation of hepatic lipase expression in experimental nephrotic syndrome*. *Kidney International*, 1997. **51**: p. 1933-1937.
36. Glasscock, R., et al., *Pathogenesis of renal disease*, in *The kidney*, W.B. Saunders, Editor. 1991, Brenner, B. Rector, F.: Philadelphia. p. 1212-1231.
37. Amato, D., J. Pedraza-Chaverri, and J. Herrera-Acosta, *Fisiopatología del síndrome nefrótico*, in *Tratado de Nefrología*, Norma, Editor. 1993: Madrid.
38. Bohrer, M.P., et al., *Mechanism of puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules*. *J Clin Invest*, 1977. **60**: p. 162.
39. Alfrey, A. and W. Hammond, *Renal iron handling in the nephrotic syndrome*. *Kid Int*, 1990. **37**: p. 1409-1413.
40. Pedraza-Chaverri, J., et al., *Patophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats*. *Rev Inv Clin*, 1990. **42**: p. 29-38.
41. Cruz, C., et al., *Abnormalities of coagulation in experimental nephrotic syndrome*. *Nephron*, 1994. **68**: p. 489-496.
42. Kees-Folts, D., J.L. Sadow, and G.F. Schreiner, *Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid*. *Kidney International*, 1994. **45**: p. 1697-1709.

43. Katz, J., A.L. Sellers, and G. Bonorris, *Effect of nephrectomy on plasma albumin catabolism in experimental nephrosis*. J Lab Clin Med, 1964. **63**: p. 680.
44. Nicholls, D.M., et al., *The regulation of protein synthesis in nephrotic rat kidney ribosome preparations*. Can J Biochem, 1970. **48**: p. 308-315.
45. Brown, E.A., et al., *Sodium retention in nephrotic syndrome is due to an intrarenal defect: evidence from steroid-induced remission*. Nephron, 1985. **39**: p. 290.
46. Ichikawa, I., et al., *Role of intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome*. J Clin Invest, 1983. **71**: p. 91.
47. Noto, D., et al., *Lipoprotein(a) levels in relation to album concentration in childhood nephrotic syndrome*. Kidney International, 1999. **55**: p. 2433-2439.
48. Vaziri, N.D. and K.H. Liang, *Hepatic HMG-CoA reductase gene expression during the course of puromycin-induced nephrosis*. Kidney International, 1995. **48**: p. 1979-1985.
49. Liang, K. and N.D. Vaziri, *Down-regulation of hepatic high-density lipoprotein receptor, SR-B1, in nephrotic syndrome*. Kidney International, 1999. **56**: p. 621-626.
50. Sain-van der Velden, M., et al., *Increased VLDL in nephrotic patients results from a decreased catabolism while increased LDL results from increased synthesis*. Kidney International, 1998. **53**: p. 994-1001.

51. Wanner, C., et al., *Cholesterol metabolism in glomerular cells: effect of lipoproteins from nephrotic patients*. Miner Electrolyte Metab, 1996. **22**: p. 39-46.
52. Lim, V.S., et al., *Leucine turnover in patients with nephrotic syndrome: evidence suggesting body protein conservation*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**: p. 1067-1073.
53. Moorhead, J.F., *Lipids and progressive kidney disease*. Kidney International, 1991. **39**(Suppl 31): p. S-35-S- 40.
54. Guarnieri, G.F., et al., *Nutritional state in patients on long-term low-protein diet or with nephrotic syndrome*. Kidney International, 1989. **36**: p. S-195-S-200.
55. Ortiz-López, M.G., *Estudio de la función hormonal reproductiva de la rata con síndrome nefrótico crónico*, in Facultad de Química. 1996, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D. F.
56. Dickie, N., et al., *The effect of puromycin aminonucleoside on the incorporation of labeled precursors into rat-kidney RNA*. Biochem Biophys Acta, 1966. **129**: p. 288-239.
57. Diamant, S. and E. Shafir, *Lipogenesis in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome*. Biochimica et Biophysica Acta, 1974. **360**: p. 241-251.
58. Nicholls, D.M., *Biosynthesis of renal protein in aminonucleoside nephrosis*. Can J Biochem, 1968. **46**: p. 527-535.
59. Gheradi, e., L. Vecchia, and S. Calandra, *Experimental nephrotic syndrome in the rat induced by puromycin aminonucleoside*. Exp Mol Pathol, 1980. **32**: p. 128-135.

60. Harris, K.P.G., et al., *Essential fatty acid deficiency ameliorates acute renal dysfunction in the rat after the administration of the aminonucleoside of puromycin*. J Clin Invest, 1990. **86**: p. 115-1123.
61. D'Amico, G. and M.G. Gentile, *Influence of diet on lipid abnormalities in human renal disease*. Am J Kidney Dis, 1993. **22**(1): p. 151-157.
62. Sul, H.S., et al., *Cloning of cDNA sequences for murin malic enzyme and the identification of aberrantly large malic enzyme mRNA in MOD-1 null mice*. J Biol Chem, 1984. **259**(1): p. 555-559.
63. Benyon, S., *Metabolismo de los lípidos, in Lo esencial en metabolismo y nutrición*. 1998, Harcourt Brace: Barcelona, España. p. 51-76.
64. Kushwaha, R.S. and H.C. McGill, *Mechanisms controlling lipemic responses to dietary lipids*. World Rev Nutr Diet Basel Karger, 1997. **80**: p. 82-125.
65. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986: p. 34-46.
66. Hampton, R., D. Dimster-Denk, and J. Rine, *The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation*. TIBS, 1996. **21**: p. 140-144.
67. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**: p. 425-430.
68. Gornikawa, S. and Y. Takamitu, *Lipid metabolism in primary cultured hepatocytes from daunomycin-nephrotic rats*. miner Electrolyte Metab, 1998. **24**: p. 330-336.
69. Illingworth, D.R., *Lipoprotein metabolism*. Am J Kid Dis, 1993. **22**(1): p. 90-97.

70. Joven, J., et al., *Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome*. N Engl J Med, 1990. **323**: p. 579-584.
71. Dwyer, J., *Vegetarian diets for treating nephrotic syndrome*. Nutrition Reviews, 1993. **51**: p. 44-56.
72. Gibson, R.S., *Laboratory Assessment*, in *Principles of nutritional assessment*, O.U. Press, Editor. 1990: Oxford.
73. Mallory, F.B., *Pathological Technique*. 1942, Philadelphia: W. B. Saunders Company.
74. Lillie, R.D., *Masson's Trichrome Stain*. 1948: Philadelphia, Blakinston Co.
75. Masson, P.J., *Trichrome Stain*. J. tech. Methods, 1929. **12**: p. 75-90.
76. MacManus, J.F.A., *Periodic Acid-Schiff Reaction (AFIP Modification)*. Stain Technology, 1949. **23**: p. 99.
77. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**: p. 156-159.
78. Moorhead, J.F., et al., *Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease*. Lancet, 1982: p. 1309-1312.
79. Lewandowsky, A.E., et al., *Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver*. Am J Physiol, 1988. **254**: p. c634-c642.
80. Duane, W.C., *Effects of soybean protein and very low dietary cholesterol on serum lipids, biliary lipids, and fecal sterols in humans*. Metabolism, 1999. **48**(4): p. 489-494.

81. Glasser, R.J., J.A. Velosa, and a.F. Michael, *Experimental model of focal sclerosis. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis*. Lab Invest, 1977. **36**: p. 516-519.
82. Diamond, J. and M. Karnovsky, *Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis*. Kidney Int, 1988. **33**: p. 917-924.
83. Keane, W.F., *Lipids and the kidney*. Kidney Int, 1994. **46**: p. 910-920.
84. Border, W.A. and N.A. Noble, *Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor- $\beta$* . Am J Kid Dis, 1993. **22**(1): p. 105-113.
85. Kim, H., et al., *Actions of the soy phytoestrogen genistein in models of human chronic disease: potential involvement of transforming growth factor  $\beta$* . Biochem Soc Trans, 2001. **29**(2): p. 216-222.
86. Boersma, B.J., et al., *Chlorination and Nitration of soy isoflavones*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(2): p. 265-275.
87. Binsack, R., et al., *Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid*. Alcohol Clin Exp Res, 2001. **25**(3): p. 434-443.
88. Vaziri, N.D. and K.H. Liang, *Down-regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis*. Kidney International, 1996. **50**: p. 887-893.
89. Brenner, B.M., T.W. Meyer, and T.H. Hostetter, *Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease*. N Engl J Med, 1982. **307**(11): p. 652-659.

## Anexo I. Reactivos para Tinción de Hematoxilina y Eosina

- Hematoxilina de Harris

Cristales de hematoxilina	5.0 g
Alcohol al 95%	50 mL
Alumbre de amonio o potasio	100.0 g
Óxido de mercurio	2.5 g
Agua destilada c. b. p.	1000 mL
Ácido acético glacial	30 mL

Disolver los cristales de hematoxilina en el alcohol al 95%. Por otro lado se hace lo mismo con el alumbre en aproximadamente 400 mL de agua (calentar para facilitar la disolución). Mezclar las dos soluciones y calentar la nueva solución hasta alcanzar la ebullición. Retirar del fuego y agregar el óxido de mercurio hasta disolver. Calentar de nuevo la solución por aproximadamente 1 minuto o hasta que tome un color morado oscuro. Retirar del fuego y se vacía en un vaso con agua fría. Una vez que se encuentre a temperatura ambiente, se agrega ácido acético glacial y se afora a 1 L.

- Alcohol ácido

Alcohol al 70%	990 mL
Ácido clorhídrico concentrado	10 mL

- Agua amoniacal

Agua amoniacal dura	2.0 – 3.0 mL
Agua corriente c. b. p.	1000 mL

- Carbonato de litio saturado

Carbonato de litio	1.0 g
Agua destinada c. b. p.	100 mL

- Solución de eosina alcohólica.

Eosina Y, soluble en agua	2.0 g
Agua destilada	160 mL
Alcohol al 95%	640 mL

Disolver la eosina Y en el agua destilada y posteriormente agregar el alcohol al 95%. Si se desea un mayor tinte o matiz, agregar una gota de ácido acético por cada 100 mL de solución.

- Solución de Lugol. (Modificación de Weigert)

Yoduro de potasio	2.0 g
Cristales de yodo	1.0 g
Agua destilada c. b. p.	100 mL

- Solución de tiosulfato de sodio

Tiosulfato de sodio	5.0 g
Agua destilada c. b. p.	100 mL

## Anexo II. Reactivos para Tinción Tricrómica de Masson

- Solución de Bouin

Solución acuosa de ácido pícrico saturado	75 mL
Formaldehído, 37-40%	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

- Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A:

Hematoxilina	1.0 g
Alcohol al 95%	100 mL

Solución B:

Cloruro férrico acuoso al 29%	4 mL
Ácido clorhídrico concentrado	1 mL
Agua destilada	95 mL

Para tener la solución de trabajo se utilizan la solución A y la B en partes iguales.

- Solución de fucsina ácida con grana de Biebrich

Grana de Biebrich acuoso al 1%	90 mL
Fucsina ácida acuosa al 1%	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

- Solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico

Ácido fosfomolibdico	5.0 g
Ácido fosfotúngstico	5.0 g
Agua destilada c. b. p.	200 mL

- Solución de azul de anilina.

Azul de anilina	2.5 g
Ácido acético	2 mL
Agua destilada	100 mL

- Solución de verde brillante

Verde brillante	5.0 g
Agua destilada	250 mL
Ácido acético glacial	---

Calentar el agua y disolver el verde brillante. Dejar enfriar, filtrar y agregar de 1 gota del ácido acético glacial.

- Solución de agua acética

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada c. b. p.	100 mL

### **Anexo III. Reactivos para Tinción del Acido Peryódico de Schiff (PAS)**

- Reactivo de Coleman Feulgen

Fucsina básica	1.0 g
Metabisulfito de potasio	2.0 g
Ácido clorhídrico	10 mL
Carbón activado	0.5 g
Agua destilada	200 mL

Disolver la fucsina básica en el agua destilada caliente hasta la ebullición. Dejar enfriar y agregar el metabisulfito de potasio y el ácido clorhídrico. Dejar blanquear por 24 h y agregar el carbón activado. Agitar por 1 min. y filtrar con papel. Repetir la filtración hasta que la solución sea incolora. Almacenar en refrigeración.

- Solución de Leuco-Fucsina de Schiff.

Fucsina básica	1.0 g
Ácido clorhídrico	20 mL
Bisulfito de sodio anhidro o Metabisulfito de sodio	1.0 g
Agua destilada	200 mL

Disolver la fucsina básica en el agua destilada caliente hasta que llegue a ebullición. Dejar enfriar hasta los 50°C y filtrar. Agregar el ácido clorhídrico y cuando se encuentre a temperatura ambiente agregar el bisulfito de sodio o el metabisulfito de sodio. Guardar durante 48 h protegido de la luz hasta que la solución se vuelva de un color paja. Almacenar en refrigeración.

Antes de utilizar esta solución se debe hacer una prueba para evaluar su eficacia. Se vacían unas cuantas gotas de ella en 10 mL de formaldehído al 37-40% y todo a su vez en un vidrio de reloj. Si la solución se vuelve morada rojiza rápidamente, esto se traduce en que nuestra solución se encuentra en buen estado, pero si la reacción se retarda y el color resultante es un morado profundamente azul, la solución no funcionará adecuadamente.

- Solución de ácido peryódico al 0.5 %

Cristales de ácido peryódico	0.5 g
Agua destilada	100 mL

- Solución de ácido clorhídrico normal

Ácido clorhídrico, conc. sp. gr. 1.19	83.5 g
Agua destilada	916.5 mL

- Contratinción con verde brillante al 0.2%

Cristales de verde brillante	0.2 g
Agua destilada	200 mL
Ácido acético glacial	0.2 mL

- Hematoxilina de Harris

Cristales de Hematoxilina	5.0 g
Alcohol al 95%	50 mL
Alumbre de amonio o potasio	100.0 g
Óxido de mercurio	2.5 g
Agua destilada c. b. p.	1000 mL
Ácido acético glacial	30 mL

Disolver los cristales de hematoxilina en el alcohol al 95% y hacer lo mismo con el alumbre en aproximadamente 400 mL de agua (calentar para facilitar la disolución). Mezclar las dos soluciones y calentar la nueva solución hasta alcanzar la ebullición. Retirar del fuego y agregar el óxido de mercurio hasta disolver. Calentar de nuevo la solución por aproximadamente 1 minuto o hasta que tome un color morado oscuro. Retirar del fuego y vaciar en un vaso con agua fría. Una vez que se encuentre a temperatura ambiente, se agrega ácido acético glacial y se afora a 1 L.

#### **Anexo IV. Reactivos para Transcripción Reversa**

- **Buffer de la transcriptasa reversa 5X**  
(5X First Strand Buffer de GIBCO BRL)
  - Tris-HCl 250 mM pH 8.3
  - Cloruro de potasio 375 mM
  - Cloruro de magnesio 15 mM
  
- **Mezcla de dNTP's**  
(2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato de GIBCO BRL)  
La mezcla contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP
  
- **Oligo dT**  
(Oligo dT 12-18 primer, GIBCO BRL)  
Se utiliza como un oligonucleótido para la síntesis de la primera cadena de DNA complementario con la transcriptasa reversa. Su función es hibridizar a la cola poli A del RNA mensajero y se almacena en agua-DEPC.
  
- **DTT 0.1 M de GIBCO BRL**
  
- **Enzima transcriptasa reversa**  
(Reverse Transcriptase, Moloney Murine Leukemia Virus-M-MLV, GIBCO BRL).  
Es una DNA polimerasa que sintetiza una cadena de DNA complementaria a partir de una cadena simple de RNA.
  
- **Inhibidor de Ribonucleasas.**  
(RNase Inhibitor, cloned GIBCO BRL)  
Es un potente inhibidor no competitivo de ribonucleasas, que se utiliza en la transcripción reversa del RNA mensajero y es obtenido de una cepa recombinante de *E. Coli*.

## **Anexo V. Reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa**

- **Buffer de PCR 10X con 15 mM de cloruro de magnesio**  
(10X PCR Buffer GIBCO BRL)
  - Tris-HCl 200 mM, pH 8.4
  - Cloruro de potasio 500 mM
  - Cloruro de magnesio 50 mM

- **Mezcla de dNTP's. (Ver anexo de Reactivos para RT).**

- **Oligonucleótido sentido 20  $\mu$ M.**

- **Oligonucleótido antisentido 20  $\mu$ M.**

- **Enzima Taq DNA polimerasa**  
(Taq DNA polymerase, GIBCO)

Esta enzima aislada de *Thermus aquaticus* YT1, es un polipéptido simple con un peso molecular de 94 kDa, estable al calor, capaz de sintetizar DNA a temperaturas elevadas a partir de un template simple de cDNA en presencia de oligonucleótidos iniciadores.

## **Anexo VI. Reactivos para electroforesis de DNA**

- Buffer TAE 50X

Tris base	60.5 g
Ácido acético glacial	14.27 mL
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	9.3 g
Agua desionizada c. b. p.	1000 mL

- Buffer TAE 1X

Buffer TAE 50X	10 mL
Agua desionizada c. b. p.	500 mL

- Bromuro de etidio 2 mg/mL. Ver anexo de reactivos para electroforesis de RNA.
- Buffer de carga. Ver anexo de reactivos para electroforesis de RNA.
- Marcador de peso molecular. Se utilizó una escalera de DNA de 100 pb en 100 pb hasta llegar a 2000 pb de BOEHRINGER MANNHEIM.

## Anexo VII. Reactivos para extracción de RNA por TRIZOL<sub>MR</sub>

- Agua-DEPC al 0.1%

Dietil pirocarbonato	3 mL
Agua desionizada	3000 mL

Agitar por 4 horas y esterilizar en autoclave por 15 min. a 121°C y 15 lbs/plg<sup>2</sup>

- Solución desnaturalizante:

Tiocianato de guanidina	47.35 g
Citrato de sodio dihidratado 0.75 M pH 7.0	3.33 mL
Sarcosil al 10%	5.0 mL
Agua-DEPC c. b. p.	100 mL

- Trizol LS Reagent Ultrapure. GIBCO BRL.
- Cloroformo al 100%.
- Isopropanol al 100%.
- Etanol al 75% en agua-DEPC

Etanol absoluto	75 mL
Agua-DEPC	25 mL

- Formamida

## Anexo VIII. Reactivos para la cuantificación espectrofotométrica del RNA

- EDTA 0.4 M pH 8.0: Ajustar el pH con NaOH

EDTA	7.44 g
Agua desionizada c. b. p.	50 mL

- Amortiguador TE pH 7.5 (Tris-EDTA): Ajustar pH con NaOH antes de aforar.

Tris-HCl 10 mM pH 7.5	1.576 g
EDTA 0.4 M pH 8.0	2.5 mL
Agua desionizada	1000 mL

- Formamida

## Anexo IX. Reactivos para electroforesis de RNA

- Buffer de corrimiento 10X: Disolver el Mops en 900 mL de agua. Ajustar a pH de 7.0 y posteriormente agregar el resto de los reactivos.

Mops 0.4 M pH 7.0 (3-[N-Morfolino ácido propano sulfónico])	87.32 g
Acetato de sodio 100 mM	13.6 g
EDTA 0.4 M pH 8.0	2.5 mL
Agua desionizada c. b. p.	1000 mL

- Buffer de corrimiento 1X

Buffer de corrimiento 10 X	100 mL
Agua desionizada c. b. p.	1000 mL

- Formaldehído al 36.7% (manejar con cuidado)
- Buffer de carga: Disolver el EDTA, azul de bromofenol y el xylene cyanol en los 10 mL de glicerol al 50%. Filtrar con filtro millex y guardar a 4 ° C.

Glicerol al 50%	10 mL
EDTA 1mM pH 8.0	200 µL
Bromofenol blue 0.25 %	250 mg
Cianol xileno 0.25 %	250 mg

- Bromuro de Etidio 2 mg/mL.

Bromuro de etidio	100 mL
Agua desionizada c. b. p.	50 mL

- Formamida (manejar con cuidado)

**Anexo X. Reactivos para transferencia de RNA del gel de agarosa a membrana de Nylon N<sup>+</sup>**

- Solución SSC 20 X

Citrato de sodio dihidratado	176.8 g
Cloruro de sodio granular	350.6 g
Agua desionizada c. b. p.	2 L

- Agua desionizada.

## **Anexo XI. Reactivos para hibridación del mRNA con la sonda marcada**

- Buffer de prehibridización. Rapid Hyb. Amersham Pharmacia Biotech, cat. No. 1636)
- Reacciones para marcaje Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, cat. No. 1633). Buffer en solución libre de endonucleasas, con dATP, dGTP y dTTP y la enzima Klenow.
- Buffer TE

Tris HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

- $^{32}\text{P}$  dCTP (Amersham Pharmacia Biotech. 3000 Ci/mmol, cat. AA0005)
- EDTA 0.2M
- Solución 2X SSC/0.1 SDS
- Solución 0.01X SSC/0.1 SDS