

00551
14



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

REGULACION DEL METABOLISMO DEL
COLESTEROL POR LAS SREBP'S:
EFECTO DE LA SOYA

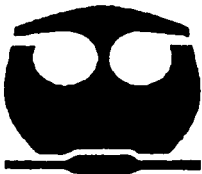
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

NATALIA MANZANO LEON

ASESOR: DR. ARMANDO TOVAR PALACIOS



MÉXICO, D.F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi mamá por su eterno apoyo.

A mis abuelos por todo su cariño.

A todo el resto de la familia, porque sé que siempre están a mi lado.

A mis amigos Artemio, Isabel, Rafa, Tere, Brenda y Sylvia.

A mis compañeras de la maestría Cati y Eli.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Nutriología Molecular:
Adriana, Caro A., Caro F., Claudia, Euclides, Fernanda, Gabi, Gris, Leti,
Sra. Silvia y Víctor.

A Leti García por todo su apoyo.

A Daniel, con quien he iniciado la aventura mas maravillosa de mi vida.
Gracias por tu apoyo, tu amor y tu comprensión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 COLESTEROL.....	1
1.2 PROTEÍNAS QUE SE UNEN A ELEMENTOS REGULATORIOS DE ESTEROLES (SREBP's).....	4
1.3 FAMILIAS DE LAS SREBP's.....	7
1.4 LAS SREBP's COMO FACTORES TRANSCRIPCIONALES.....	10
1.5 EVENTOS PROTEOLÍTICOS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS SREBP's.....	12
1.6 PROTEÍNA ACTIVANTE DEL ROMPIMIENTO DE LAS SREBP's.....	15
1.7 EFECTO HIPOCOLESTEROLÉMICO DE LA SOYA.....	19
1.8 SÍNDROME NEFRÓTICO	
2. OBJETIVO	
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
3. METODOLOGÍA	
3.1 INDUCCIÓN DEL SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL.....	28
3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES.....	28
3.3 DIETAS.....	29
3.4 DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA Y DE LÍPIDOS EN SUERO Y EN HÍGADO.....	30
3.5 NORTHERN BLOT.....	31
3.6 OBTENCIÓN DE NÚCLEOS CELULARES.....	32
3.7 INMUNOBLOT.....	33
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
4. RESULTADOS	
4.1 SÍNDROME NEFRÓTICO CRÓNICO.....	34
- INGESTA DE ALIMENTO Y GANANCIA DE PESO.....	34
- PROTEÍNAS TOTALES URINARIAS.....	36

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- LÍPIDOS SÉRICOS.....	38
- LÍPIDOS EN HÍGADO.....	40
- ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS Y COLESTEROL.....	42
- ANÁLISIS POR INMUNOBLOT DE SREBP-1 Y SREBP-2 EN EXTRACTOS NUCLEARES.....	45
4.2 SÍNDROME NEFRÓTICO AGUDO.....	48
- INGESTA DE ALIMENTO Y GANACIA DE PESO.....	48
- PROTEÍNAS TOTALES URINARIAS.....	50
- LÍPIDOS SÉRICOS.....	51
- LÍPIDOS EN HÍGADO.....	53
- ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS Y COLESTEROL.....	55
- ANÁLISIS POR INMUNOBLOT DE SREBP-1 Y SREBP-2 EN EXTRACTOS NUCLEARES.....	58
5. DISCUSIÓN.....	61
6. CONCLUSIONES.....	74
7. BIBLIOGRAFÍA.....	76

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenosina-5'-monofosfato ciclico
Aminoácidos	C - Cisteína , D - Ácido aspártico, E - Ácido glutámico, G - Glicina, H - Histidina, I - Isoleucina, K - Lisina, L - Leucina, R - Arginina, S - Serina, V - Valina, W - Triptofano
ANP	Aminonucleosido de Puromicina
ARN	Ácido Ribonucleico
bHLH-zip	basic-helix-loop-helix-leucine-zipper
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteina de alta densidad)
HMG-CoA reductasa	3-Hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa
HMG-CoA sintasa	3-Hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A sintasa
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (Lipoproteina de densidad intermedia)
IgG	Inmunoglobulina G
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteina de baja densidad)
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein (Proteina microsomal de transferencia de triglicéridos)
NADPH	Fosfato de Nicotinamida-Adenin-Dinucleótido
pb	pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Receptor de activadores de la proliferación de peroxisomas)
RE	Reticulo Endoplásmico
RT-PCR	Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction (Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa)
S1P	Site 1-Protease (Proteasa de sitio 1)
S2P	Site 2-Protease (Proteasa de sitio 2)
SRE-1	Sterol Regulatory Element 1 (Elemento regulatorio de esteroides 1)
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein (Proteinas que se unen a elementos regulatorios de esteroides)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteina de muy baja densidad)

RESUMEN

La biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos es regulada por las proteínas SREBP's (Sterol Regulatory Element Binding Protein) que son factores transcripcionales para algunas de las enzimas de estas rutas bioquímicas. Las SREBP's se encuentran en el retículo endoplásmico y cuando los niveles de estos lípidos son bajos su extremo NH₂-terminal es liberado por un proceso proteolítico y viaja hasta el núcleo. Existen dos familias de SREBP's: las SREBP-1, relacionadas con los ácidos grasos y la SREBP-2 con el colesterol. Por otra parte, se sabe que dietas basadas en proteína de origen animal elevan los niveles de colesterol y triglicéridos (TG) en plasma; así mismo, patologías como el Síndrome Nefrótico (SN) tienen los mismos efectos. Se ha encontrado también, que el consumo de proteína de soya disminuye la concentración de estos lípidos, aunque su mecanismo de acción no es del todo conocido. El **objetivo** de este trabajo fue conocer si las SREBP's están implicadas en el aumento plasmático del colesterol y de los ácidos grasos en animales con Síndrome Nefrótico experimental, además de evaluar el posible efecto que una alimentación basada en proteína de soya pudiera tener sobre estas proteínas.

Se utilizaron ratas Wistar macho que fueron divididas en 4 grupos experimentales: 1) G. control alimentado con caseína al 20%, 2) G. con SN alimentado con caseína al 20%, 3) G. control alimentado con soya al 20% y 4) G. con SN alimentado con soya al 20%. Se trabajó con Síndrome Nefrótico Crónico (SNC) (n=64) y Agudo (SNA) (n=20), ambos inducidos con aminonucleósido de puromicina. Los animales del SNC fueron estudiados por 64 días y los del SNA por 7 días. Se determinó la proteinuria y los niveles plasmáticos de colesterol y TG cada semana a los animales del SNC y al final del experimento para los del SNA. Las ratas fueron ejecutadas y se utilizó el hígado para la determinación de lípidos; se realizaron análisis de Northern Blots para receptor LDL, HMG-CoA reductasa y sintasa, enzima málica, sintasa de ácidos grasos y de SREBP-1, y Inmunoblot para SREBP-1 y 2.

Los animales con SN presentaron altos niveles de proteinuria, y de colesterol y TG séricos, sin embargo, en los animales que consumieron soya este aumento fue mucho menos dramático que en los animales con caseína. Con respecto a los niveles de colesterol en hígado, no se observaron diferencias

significativas en el SNC, aunque en el SNA se encontraron niveles mas altos en los grupos que recibieron dieta de soya. Asimismo, no hubo diferencia en cuanto a los TG hepáticos en el SNC, pero se observaron bajos niveles en los grupos con SNA con respecto a sus controles, así como una mayor concentración en el grupo control alimentado con soya que en el que recibió caseína. Los niveles de ARNm de la SREBP-1 y de las enzimas que este factor transcripcional regula que son la enzima málica y la sintasa de ácidos grasos son más bajos en los grupos que recibieron dieta con soya, comparándolos con los que se alimentaron con caseína, tanto en los grupos experimentales como en los controles del SNC y del SNA. Con respecto a las enzimas de la biosíntesis y captura del colesterol, HMG-CoA reductasa y sintasa y receptor LDL, se observa que los animales con dieta de soya tienen niveles más altos, en comparación con las ratas con caseína, tanto en el SNC como en el SNA. Los análisis de inmunoblot indican una menor cantidad de SREBP-1 en los animales con dieta de soya, con respecto a los que consumieron caseína y el caso contrario para la SREBP-2, que se observa en mucho mayor cantidad en los grupos con dieta de soya.

Se concluye con los resultados obtenidos que la dieta basada en proteína de soya fue benéfica para disminuir los niveles plasmáticos de colesterol y ácidos grasos de los animales con SNC y SNA. Aunque no se observan cambios en los lípidos plasmáticos de los grupos control, los resultados de los análisis de Northern blot y de inmunoblots, indican que la caseína y la soya regulan de manera diferente la captura y biosíntesis del colesterol así como la producción de ácidos grasos, lo cual se observa también en los grupos con SN. Esto es, la caseína provoca que se sintetice una mayor cantidad de ácidos grasos con respecto a la soya; sin embargo, la soya promueve la biosíntesis de colesterol debido a que desciende los niveles plasmáticos de éste lípido a cantidades que hacen necesaria su biosíntesis endógena.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 COLESTEROL

Los diversos nutrimentos contenidos en la alimentación de un individuo no son sólo importantes por su aporte energético o de materias primas para la síntesis de otras macromoléculas o como parte estructural del propio organismo; los nutrimentos en muchas ocasiones constituyen importantes reguladores de la expresión de gran diversidad de genes, pudiendo actuar a nivel de la transcripción o sobre el procesamiento, estabilidad y traducción del ARNm (Torres *et al.*, 1996). Entre los nutrimentos que pueden influir sobre la expresión génica encontramos a la glucosa, los ácidos grasos, el colesterol, los aminoácidos, los minerales y las vitaminas. Estos pueden actuar ya sea sobre proteínas nucleares y elementos en *cis* que regulan a su vez la transcripción, los procesos de “splicing” y la edición del ARN nuclear, así como sobre proteínas citosólicas que influyen en la estabilidad del ARNm y en su traducción (Girard, 1998).

El colesterol es un lípido de gran importancia tanto para la morfología como para la fisiología de la célula, así como para el correcto desarrollo de los organismos, pues es uno de los constituyentes principales de las membranas celulares y un importante precursor de las hormonas esteroideas, de los esteroides fecales y de los ácidos biliares (Brown y Goldstein, 1986). Los organismos superiores tienen dos vías de adquisición del colesterol, ya sea mediante la dieta, o bien, si la dieta no lo contiene, tienen la capacidad de sintetizarlo a partir de acetil-CoA (Gasic, 1994).

Cuando el colesterol se obtiene a través de la alimentación, este compuesto se absorbe en el intestino delgado por difusión pasiva o por medio de transporte a través de proteínas específicas. El colesterol es entonces transportado por el sistema linfático en forma de quilomicrones y posteriormente vía sanguínea hasta el hígado



PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

como quilomicrones remanentes. En el hígado el colesterol se almacena, o si se requiere es exportado como complejos lipoprotéicos que se denominan lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por las siglas en inglés de “very low density lipoprotein”), las cuales tienen un contenido elevado de triglicéridos y colesterol. Al circular en el organismo las VLDL pierden triglicéridos y se hacen ricas en colesterol transformándose en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Gasic, 1994). Las células animales adquieren el colesterol mediante un proceso de endocitosis mediada a través de un receptor específico para estas lipoproteínas, por lo que cuando una célula necesita colesterol para la síntesis de membranas, produce proteínas receptoras de LDL y las inserta en su membrana plasmática; de esta manera las LDL son capturadas e incorporadas a la célula mediante la formación de vesículas endocíticas. Una vez en el interior celular los ésteres de colesterol se hidrolizan liberando al colesterol, que queda entonces disponible para la célula (Brown y Goldstein, 1986) (Figura 1). Cabe aclarar que la mayor parte del colesterol de los tejidos de los organismos superiores se encuentra en forma esterificada en su grupo 3-hidroxilo con ácidos grasos de cadena larga.

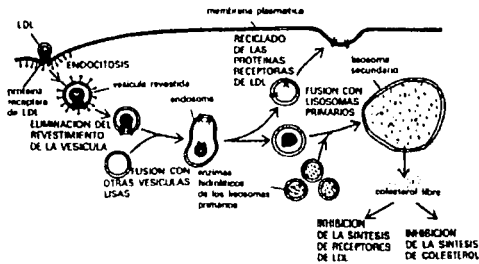


Figura 1. Captura y metabolismo intracelular de las LDL.
Modificada de Alberts *et al.* (1990)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La entrada del colesterol dietario al hígado incrementa los niveles de ésteres de colesterol en este órgano y suprime parcialmente la síntesis de este compuesto a partir de Acetil-CoA. Por otra parte, existen pequeñas pérdidas de este lípido por la descamación normal de la piel y de los endotelios de los organismos, así como por la síntesis de hormonas esteroideas y por la excreción de colesterol biliar y ácidos biliares, por lo que es necesario mantener un estado de homeostasis entre la cantidad de colesterol excretado y la cantidad sintetizada y/o adquirida a través de la dieta (Spady *et al.*, 1993). El exceso de colesterol es peligroso pues puede formar cristales que dañen a la célula y provoquen su muerte al ser un compuesto completamente insoluble en agua (Small y Shipley, 1974). Su potencial patogenicidad se ve aumentada por el hecho de que el colesterol tiene una fuerte tendencia a intercambiarse de manera pasiva entre las lipoproteínas sanguíneas y las membranas celulares; así que para realizar un transporte seguro de este compuesto dentro de un organismo su concentración debe ser baja. Los organismos multicelulares resuelven este problema esterificando al colesterol y empacándolo dentro de los centros hidrofóbicos de las lipoproteínas plasmáticas. Los centros de estas macromoléculas están rodeados por una monocapa de fosfolípidos y de colesterol no esterificado y están estabilizadas por una proteína. La pequeña cantidad de colesterol no esterificado de la superficie de estas partículas se mantiene en un equilibrio dinámico con el colesterol de las membranas celulares (Brown y Goldstein, 1986).

Como una forma de protección complementaria en el caso de que este compuesto se acumule, la célula detiene su síntesis y la de proteínas receptoras de LDL; de ésta forma se produce y absorbe menos colesterol (Brown y Goldstein, 1986). Las dietas ricas en colesterol intervienen también en el sistema de retroalimentación de este lípido y reducen su captura en el hígado suprimiendo la producción de receptores LDL, aunque esto provoca que el colesterol se acumule en la sangre y forme placas ateroscleróticas en las paredes de los vasos sanguíneos,

provocando graves trastornos patológicos (Spady *et al.*, 1993; Brown y Goldstein, 1997).

La regulación por producto final del metabolismo del colesterol se da a través de la represión de la transcripción de genes implicados en su biosíntesis y en la de los receptores LDL. Sin embargo, para actuar como represor por producto final, el colesterol tiene un impedimento, pues es un lípido insoluble que está presente casi exclusivamente en las membranas celulares (Goldstein y Brown, 1990).

1.2 PROTEÍNAS QUE SE UNEN A ELEMENTOS REGULATORIOS DE ESTEROLES (SREBP's)

La forma en como la célula censa los niveles de colesterol es a través de una familia de proteínas denominadas SREBP's (Siglas en inglés de "Sterol Regulatory Element Binding Proteins"). Estas proteínas regulan a varios genes involucrados en la biosíntesis y captura del colesterol (Brown y Goldstein, 1997) y reciben su nombre por unirse a una secuencia de 10 pb (5'- ATCACCCAC - 3') (Yokoyama *et al.*, 1993) denominada SRE-1 ("Sterol Regulatory Element-1") ubicada originalmente en la región 5' no traducida del gen del receptor de LDL y de la 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa (HMG-CoA sintasa) (Goldstein y Brown, 1990).

Posteriormente se observó que uno de los puntos de mayor importancia en la biosíntesis del colesterol y en su regulación mediada a través de las SREBP's, es el que se da a nivel de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) (Shimano *et al.*, 1996 y 1997b; Shimomura *et al.*, 1997b; Horton *et al.*, 1998b; Kawabe *et al.*, 1999), la cual convierte a la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato (Figura 2), compuesto de seis carbonos, precursor

de suma importancia para el colesterol (Brown y Goldstein, 1997), pues es convertido en isopentenil pirofosfato, que a su vez es polimerizado y modificado para dar origen al compuesto de 27 carbonos que es el colesterol. Las drogas más potentes usadas para reducir los niveles de colesterol son de hecho, inhibidores de esta enzima, por lo que utilizan el sistema de retroalimentación para bloquear la síntesis de este lípido, induciendo una reducción del contenido de colesterol en el hígado y que se produzca un mayor número de receptores para LDL. (Brown y Goldstein, 1986 y 1997). El mevalonato es también un importante precursor de varios isoprenoides requeridos para la síntesis de otros esteroides, transportadores de electrones, glicoproteínas y proteínas farnesiladas (Goldstein y Brown, 1990).

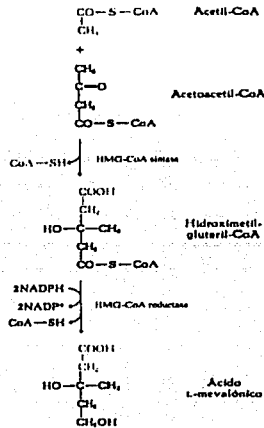


Figura 2. Primeras reacciones enzimáticas de la biosíntesis del colesterol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las SREBP's que regulan la transcripción de la HMG CoA reductasa, también regulan la transcripción de genes que codifican para otras enzimas de la síntesis del colesterol, tales como la **HMG CoA sintasa** (Goldstein y Brown, 1990; Guan *et al.*, 1995; Shimano *et al.*, 1996 y 1997b; Shimomura *et al.*, 1997a y b; Horton *et al.*, 1998b y Pai *et al.*, 1998), la **farnesil difosfato sintasa** (Goldstein y Brown, 1990; Guan *et al.*, 1995; Ericsson *et al.*, 1996; Shimano *et al.*, 1997b; Horton *et al.*, 1998b; Pai *et al.*, 1998) y la **escualeno sintasa** (Goldstein y Brown, 1990; Guan *et al.*, 1995; Shimano *et al.*, 1996 y 1997a y b; Horton *et al.*, 1998b; Kawabe *et al.*, 1999), así como al **receptor de LDL** (Yokoyama *et al.*, 1993; Shimano *et al.*, 1996 y 1997b; Shimomura *et al.*, 1997a y b; Horton *et al.*, 1998b; Pai *et al.*, 1998; Horton *et al.*, 1999; Kawabe *et al.*, 1999).

Asimismo, se ha encontrado que las SREBP's modulan la transcripción de genes que codifican para las enzimas de la síntesis y captura de ácidos grasos, como por ejemplo, la **acetil CoA carboxilasa** (Shimano *et al.*, 1996; Shimano *et al.*, 1997a; Horton *et al.*, 1998b; Shimomura *et al.*, 1998), la **sintasa de ácidos grasos** (Shimano *et al.*, 1996 y 1997a y b; Boizard *et al.*, 1998; Horton, *et al.*, 1998; Shimomura *et al.*, 1998; Kawabe *et al.*, 1999; Moldes *et al.*, 1999; Magaña *et al.*, 2000), la **estearoil CoA desaturasa-I** (Shimano *et al.*, 1996; Horton *et al.*, 1998b; Pai *et al.*, 1998; Shimomura *et al.*, 1998) y la **lipoproteín lipasa** (Tontonoz *et al.*, 1993; Kim y Spiegelman, 1996; López *et al.*, 1996; Magaña y Osborne, 1996; Shimano *et al.*, 1996), así como los genes de los **receptores de HDL** (High density lipoprotein) (López y McLean, 1999), del receptor de activadores de la proliferación de peroxisomas (**PPAR- γ 1 y 3**) (por las siglas en inglés de Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) implicado en la diferenciación de adipocitos (Fajas *et al.*, 1999), la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (**MTP**) (por las siglas en inglés de Microsomal Transference Protein) (Horton *et al.*, 1998b; Sato *et al.*, 1999), la **ATP-citrato liasa**, enzima que produce Acetil CoA, la **glucosa-6-fosfato**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

deshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la enzima málica, que producen NADPH (Shimomura *et al.*, 1998). Como se ha visto hasta el momento, las SREBP's coordinan la síntesis de los dos principales constituyentes de las membranas celulares: los ácidos grasos y el colesterol.

1.3 FAMILIAS DE LAS SREBP's

Las SREBP's fueron purificadas en 1993 a partir de extractos nucleares de células HeLa (Briggs *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993) y su mecanismo de acción ha sido estudiado en cultivos celulares desde 1994 (Wang *et al.*, 1994). Se han identificado desde entonces tres familias de SREBP's (SREBP-1a , SREBP-1c y SREBP-2) (Hua *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993), que tienen una estructura similar que consta de tres partes: a) un extremo NH₂ terminal de 480 aminoácidos aproximadamente, que constituye el factor transcripcional; b) una región hidrofóbica de unos 80 aminoácidos que contiene dos segmentos transmembranales hidrofóbicos de 22 aminoácidos cada uno, separados por un asa de 31 aminoácidos y c) un dominio regulatorio COOH terminal de una longitud aproximada de 590 aminoácidos. Las SREBP's tienen un peso molecular de 125 kD (Hua *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993; Wang, *et al.*, 1994) y están localizadas en el retículo endoplásmico con los extremos NH₂ y COOH terminales orientados hacia el citoplasma y el pequeño fragmento intermedio orientado hacia el lumen de este organelo (Hua *et al.*, 1995a; Duncan *et al.*, 1997) (Figura 3).

SREBP = Sterol regulatory element binding protein

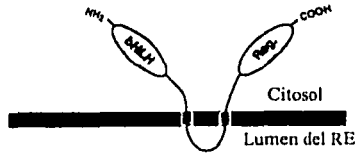


Figura 3. Esquema de la SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein).
Modificado de Brown y Goldstein, 1997.

En humanos, hamsters y ratones, dos de estas proteínas: la SREBP-1a y la SREBP-1c, se codifican a partir de un solo gen localizado en el cromosoma 17p11.2 en el humano (Hua *et al.*, 1995b), aunque con sitios de iniciación diferentes (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995b; Shimomura *et al.*, 1997b); se ha reportado que en humano y ratón se utilizan sitios promotores alternos que producen transcritos cuyos cinco primeros exones son diferentes (Hua *et al.*, 1995b). En el caso de la rata, se ha encontrado que el factor transcripcional descrito como ADD1 (por las siglas en inglés de Adipocyte Differentiation and Determination factor-1) por Tontonoz *et al.* (1993) es equivalente a la SREBP-1c (Shimomura *et al.*, 1997b). Los ARNm de la SREBP-1a y de la SREBP-1c pueden sufrir "splicing" alternativo y dar origen a proteínas diferentes, aunque no se ha detectado una relevancia fisiológica a este hecho (Yokoyama *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995b); sin embargo, se ha visto tanto en ratones como en humanos que las tasas de transcripción de la SREBP-1c y de la SREBP-1a varían de acuerdo al órgano de que se trate; por ejemplo, en hígado existe una predominancia del transcrito 1c con respecto al 1a de 9:1, valores similares han sido detectados en glándula adrenal y tejido adiposo; por

el contrario el bazo tiene un rango de síntesis 1c:1a de 1:10 (Shimomura *et al.*, 1997b). El tercer miembro de esta familia, la SREBP-2, es codificada por un gen diferente en el humano, localizado en el cromosoma 22q13 (Hua *et al.*, 1995b) y su abundancia entre los diferentes órganos es más uniforme.

Fisiológicamente, se cree que de manera general, aunque no exclusiva (Shimano *et al.*, 1996), las formas SREBP-1 están involucradas en la activación de los genes de las enzimas que regulan la síntesis de ácidos grasos mientras que la forma SREBP-2 está relacionada más bien con los genes de las enzimas de la vía de síntesis del colesterol (Horton *et al.*, 1998b; Pai *et al.*, 1998; Kawabe *et al.*, 1999). Se sabe sin embargo que la síntesis de ácidos grasos no depende exclusivamente de la acción de las SREBP's, sino que más bien estas proteínas actúan como reguladores auxiliares en determinadas circunstancias fisiológicas (Sheng *et al.*, 1995), elevando los niveles basales de transcripción de enzimas como la sintasa de ácidos grasos y la acetil CoA carboxilasa (Brown y Goldstein, 1997). En cuanto a las diferentes formas de la SREBP-1, se ha encontrado que la SREBP-1a es regulada por esteroides y es más eficiente para la activación de la transcripción que la SREBP-1c, la cual no está regulada por esteroides (Hua *et al.*, 1996a). Se sabe que éstas isoformas están reguladas de acuerdo al órgano y los factores metabólicos del organismo (Shimomura *et al.*, 1997a), es decir, cuando las células requieren un bajo nivel de transcripción utilizan preferentemente la isoforma 1c (Shimano *et al.*, 1997a).

Estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan una forma truncada de la SREBP-1a que no es regulada por esteroides, se observa una mayor cantidad del ARNm de los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, lo que produce un crecimiento masivo del hígado con una gran concentración de ácidos grasos (Shimano *et al.*, 1996). Los animales transgénicos que sobreexpresan formas truncadas de SREBP-1c, presentan un ligero crecimiento del hígado y un leve

incremento en los niveles de ARNm implicados en la síntesis de ácidos grasos sin cambios en los genes implicados en la biosíntesis de colesterol (Shimano *et al.*, 1997a). Por otra parte, los ratones transgénicos que sobreexpresan SREBP-2 no presentan un aumento del tamaño del hígado, pero aumentan los niveles de ácidos grasos y sobre todo de colesterol en este órgano, así como los niveles de ARNm de los genes relacionados con su biosíntesis (Horton *et al.*, 1998). En el caso de animales transgénicos que no poseen las isoformas la y 1c de la SREBP-1, se observa que la SREBP-2 es capaz de compensar ésta pérdida y mantener la síntesis de ácidos grasos que normalmente lleva a cabo la SREBP-1c. Sin embargo, los niveles de colesterol en hígado aumentan, ya que la SREBP-2 es mucho más potente que la SREBP-1 en la estimulación de la biosíntesis de este compuesto (Shimano *et al.*, 1997b). Es importante mencionar que no se han podido crear ratones transgénicos que no posean SREBP-2, debido a que es una mutación letal y causa la muerte de los embriones *in utero*.

1.4 LAS SREBP's COMO FACTORES TRANSCRIPCIONALES

El dominio NH₂- terminal de las SREBP's, como ya se mencionó, es un factor transcripcional con un peso molecular de 65 kD (Hua *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993; Wang, *et al.*, 1994) que pertenece a la familia de los factores transcripcionales "basic-helix-loop-helix-leucine zipper" (bHLH-Zip). Este segmento empieza con un dominio ácido muy parecido a los segmentos ácidos de muchos factores transcripcionales y es importante para la acción de las SREBP's. La eliminación de este fragmento permite que la proteína se una al ADN, sin embargo no activa la transcripción (Sato *et al.*, 1994). Cabe mencionar que el fragmento ácido de la SREBP-1c es mucho más corto que en el caso de la SREBP-1a y de la SREBP-2, por lo que es menos eficiente para activar la transcripción de un gen. En

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el caso de la SREBP-1a, este segmento es de 42 aminoácidos, 12 de los cuales son ácidos y para la SREBP-2 es de 48, de los cuales 14 son ácidos. La SREBP-1c contiene un fragmento ácido de sólo 24 aminoácidos, incluyendo 6 ácidos. Después de este fragmento, le sigue una secuencia rica en prolina, serina, glicina y glutamina, diferente para las SREBPs-1 y SREBP-2, la cual es seguida del fragmento bHLH-Zip. Este último segmento está involucrado en procesos de dimerización, entrada al núcleo celular y unión al ADN del extremo NH₂-terminal de las SREBP's (Brown y Goldstein, 1999).

Los fragmentos bHLH-Zip de la SREBP-1a y de la SREBP-2 humanas, tienen un 71 % de homología, aunque éste porcentaje es solo del 47 % si se toma en cuenta la estructura completa de estas proteínas (Hua *et al.*, 1993). La SREBP-1a y la SREBP-2 difieren de otras proteínas de la familia de las bHLH-Zip en dos aspectos: primeramente, son de mayor tamaño, pues tienen 1147 y 1141 aminoácidos respectivamente, comparados con los 160-536 aminoácidos que poseen otros miembros de esta familia; además no reconocen las secuencias palindrómicas de hexanucleótidos que son el sitio blanco de otras proteínas que contienen el segmento bHLH-Zip, es decir, en lugar de reconocer cajas E, cuyas secuencias son CACGTG y CAGCTG, reconocen la secuencia SRE-1 (5'-ATCACCCCAC-3'), que contiene repeticiones del fragmento CAC (Hua *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993); esto se debe a que en la región básica de la secuencia bHLH-Zip no presentan el residuo arginina que está altamente conservado en otras proteínas de la misma familia, sino que en su lugar se encuentra una tirosina (Brown y Goldstein, 1999). Cabe aclarar que estas secuencias de ADN son características de los "enhancers" (aumentadores) de los genes que codifican para la HMG-CoA sintasa y para el receptor LDL, pero los promotores de otros genes regulados por las SREBP's poseen secuencias diferentes que también son reconocidas por estas proteínas (Magaña y Osborne, 1996). Las SREBP's difieren de otros miembros de la familia bHLH-Zip por su

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

secuencia transmembranal y por la larga secuencia de 590 aminoácidos que constituye la parte regulatoria de la proteína (Brown y Goldstein, 1997).

1.5 EVENTOS PROTEOLÍTICOS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS SREBP's

La forma en que el dominio NH₂ terminal es liberado del retículo endoplásmico para posteriormente entrar al núcleo celular es a través de dos pasos proteolíticos, uno de ellos regulado por esteroides (Wang *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 1996b; Sakai *et al.*, 1996) (Figura 4). La proteasa del sitio 1 (S1P) realiza un corte en el sitio 1 de la SREBP que está localizado aproximadamente a la mitad del fragmento protéico que se encuentra en el lumen del retículo y lo hace entre una leucina y una serina de la secuencia RSVLS (Duncan *et al.*, 1997), este corte necesita forzosamente la presencia de un aminoácido positivamente cargado, ya sea arginina o lisina en la posición 4, y prefiere una leucina en la posición 1 (Hua *et al.*, 1996b; Duncan *et al.*, 1997). Este corte provoca que la SREBP sea dividida en dos mitades, sin embargo el extremo NH₂ terminal permanece unido a la membrana por lo que es necesario un segundo corte en el sitio 2 que se encuentra en el primer dominio transmembranal de la proteína (Sakai *et al.*, 1996) y ocurre entre la leucina y la cisteína de la secuencia DRSRILLC (Hua *et al.*, 1996b); se ha encontrado que la segunda arginina de este segmento representa el punto de unión entre el dominio hidrofílico NH₂-terminal y el segmento hidrofóbico transmembranal de las SREBP's, por lo que cuando el extremo NH₂-terminal deja la membrana para entrar al núcleo lleva consigo tres residuos hidrofóbicos (ILL) pertenecientes al extremo COOH terminal de estas proteínas (Duncan *et al.*, 1998). Este segundo proceso de proteólisis es realizado por la denominada proteasa del sitio 2 (S2P) y es necesaria

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la presencia de un motivo asparagina-prolina dentro del segmento transmembranal de la SREBP para que este corte se lleve a cabo (Ye *et al.*, 2000). El corte en el sitio 1 está regulado por esteroides, es decir, si hay un exceso de estos compuestos el corte no se realiza; si bien el corte en el sitio 2 no es dependiente de esteroides, este no puede realizarse si no se ha llevado a cabo el primero (Wang *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1996).

Ambas proteasas implicadas en este fenómeno son enzimas con funciones muy poco comunes si se comparan con el resto de las proteasas, pues la proteasa de sitio 1 realiza su función dentro del lumen del retículo endoplásmico y reconoce un tetrapéptido como sustrato y la proteasa del sitio 2 realiza un corte en un fragmento contenido en un segmento intramembranal de la SREBP, ambos procesos son extremadamente raros (Sakai *et al.*, 1996).

La SIP es una serín-proteasa identificada en 1998 (Rawson *et al.*, 1998) que se encuentra unida a la membrana del RE y cuyos sitios activos están orientados hacia el lumen de este organelo (Sakai *et al.*, 1998). Consta de 1052 aminoácidos; su extremo NH₂-terminal de 22 aminoácidos es completamente hidrofóbico y es una secuencia líder clásica. A este segmento le sigue un dominio de aproximadamente 290 aminoácidos que distingue a la SIP de otras proteasas; después tiene una secuencia de 520 residuos que no tiene semejanza alguna con otras proteínas, además tiene una secuencia de 25 aminoácidos que es una secuencia transmembranal clásica y finalmente un extremo COOH terminal de 30 residuos que se extiende hacia el citosol (Sakai *et al.*, 1998). Existe la hipótesis de que la SIP no es activa en el RE, sino que realiza su actividad en organelos post-RE tales como el aparato de Golgi. Se ha detectado una forma precursora designada SIP-A que solo se vuelve activa después de un proceso autocatalítico en el cual libera su extremo NH₂-terminal al realizar un corte en la secuencia RSLK y convertirse en SIP-B y posteriormente en SIP-C (Cheng *et al.*, 1999). El precursor inactivo de la SIP, es

sensible a la endoglicosidasa H, lo cual sugiere que se encuentra localizada en el RE; sin embargo, su forma activa (S1P-C) es resistente a la acción de la endoglicosidasa H por lo que se cree se encuentre en el aparato de Golgi (Espenshade *et al.*, 1999).

La S2P, es una proteína de 519 aminoácidos que contiene el sitio consenso HEIGH característico de las metaloproteasas para la unión de dos átomos de zinc (Rawson *et al.*, 1997). Esta proteasa difiere de otros miembros de esta familia protéica en que es altamente hidrofóbica, lo cual hace pensar que en su mayor parte se encuentra embebida en la membrana; sin embargo, los extremos NH₂ y COOH terminales de la S2P están orientados hacia el citosol y además posee otros tres sitios hidrofílicos que son susceptibles de glicosilación, por lo que es posible que estén orientados hacia el lumen del RE (Zelenski *et al.*, 1999). Su localización es entonces apta para el rompimiento de proteínas de segmentos transmembranales (Rawson *et al.*, 1997), de hecho se cree que su sitio activo está localizado en una posición ideal con respecto a su sitio blanco que es una unión leucina-cisteína en la primer hélice transmembranal de la SREBP (Zelenski *et al.*, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

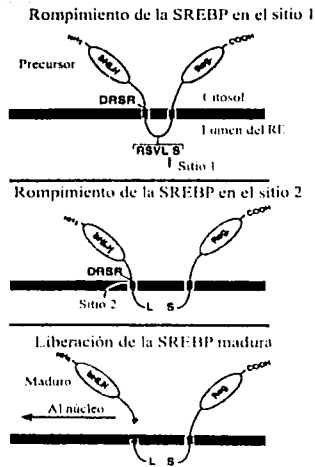


Figura 4. Procesos proteolíticos que sufren las SREBP's.
Modificado de Brown y Goldstein, 1997

1.6 PROTEÍNA ACTIVANTE DEL ROMPIMIENTO DE LAS SREBP's (SCAP)

La forma en que las SREBP's están reguladas es a través de la proteína SCAP (SREBP cleavage activating protein), la cual estimula el rompimiento de las SREBP's aún en presencia de esteroides (Hua *et al.*, 1996b). La SCAP es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico de 1276 aminoácidos, que está constituida de dos dominios: 1) un extremo NH₂-terminal de aproximadamente 730 aminoácidos que contiene 8 dominios transmembranales y 2) un extremo COOH terminal hidrofílico de 546 aminoácidos aproximadamente, que

está orientado hacia el citosol y el cual posee cinco secuencias de 40 residuos cada una, conocidas como WD (repeticiones de triptofano y aspartato) (Nohturfft *et al.*, 1998). Estas secuencias WD son comunes en muchas proteínas implicadas en interacciones proteína-proteína, por ejemplo la subunidad α de las proteínas G (Neer *et al.*, 1994) (Figura 5). Se piensa que la proteína SCAP puede unirse al extremo COOH terminal de las SREBP's a través de sus secuencias WD y de alguna manera promover la unión al complejo SREBP-SCAP de la proteasa del sitio 1 (Brown y Goldstein, 1997). Existe evidencia genética que ha llevado a pensar a algunos autores en la hipótesis de que los esteroides regulan el rompimiento de las SREBP's interactuando directa o indirectamente con el extremo NH₂-terminal de la proteína SCAP; este dominio contiene un segmento de aproximadamente 170 aminoácidos que ha sido llamado "dominio sensible a esteroides" y que incluye a cinco de las ocho hélices transmembranales de la SCAP (hélices 2-6) (Hua *et al.*, 1996b; Nohturfft *et al.*, 1996), de hecho se han detectado secuencias similares en otras tres proteínas que se cree interactúan con esteroides. Por ejemplo, es interesante mencionar que el extremo NH₂-terminal de la SCAP es muy parecido al dominio de la HMG-CoA reductasa que se encuentra unido a la membrana y que incluye también 8 dominios transmembranales; este dominio sirve como un sensor de esteroides, permitiendo que esta enzima sea degradada rápidamente cuando el contenido de esteroides en el RE aumenta (Kumagai *et al.*, 1995). Recientemente, algunos autores han sugerido que la función de la SCAP es la de transportar a la SREBP a compartimentos post-RE, por ejemplo el aparato de Golgi medial, donde se encuentra la forma activa de la SIP y que los esteroides regulan la capacidad de la SCAP para escoltar a la SREBP en este transporte (Nohturfft *et al.*, 1999). Asimismo, existen evidencias de una interacción entre el dominio sensible a esteroides de la SCAP y una proteína no identificada con el fin de que la SCAP permanezca en el RE (Yang *et al.*, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

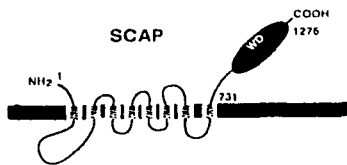


Figura 5. Esquema de la proteína SCAP (SREBP-cleavage activating protein)
Modificado de Brown y Goldstein, 1999.

Cuando la concentración de esteroides aumenta a niveles no convenientes para la célula, ésta detiene la liberación proteolítica de los extremos NH_2 -terminales las SREBP's y los fragmentos que puedan encontrarse dentro del núcleo son degradados rápidamente (Wang *et al.*, 1994). Como resultado de estos eventos, la transcripción de todos los genes blancos de las SREBP's decae. La síntesis de colesterol se detiene completamente, pues es completamente dependiente de las SREBP's, sin embargo, en el caso de las enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos, se mantiene un nivel de transcripción basal (Horton *et al.*, 1998b; Pai *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha encontrado una asociación del metabolismo de lípidos y carbohidratos con la insulina y las SREBP's. La insulina estimula la transcripción de la SREBP-1c, lo que a su vez incrementa la producción de la forma madura de ésta proteína y esto junto con metabolitos de la glucosa (posiblemente glucosa-6-fosfato) estimulan la transcripción de genes de la lipogénesis y del metabolismo de carbohidratos (Horton *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 1998; Foretz *et al.*, 1999; Shimomura *et al.*, 1999b). En estudios realizados en ratones ob/ob y en ratas fa/fa Zucker, los cuales muestran obesidad y resistencia a la insulina, se han encontrado concentraciones elevadas de SREBP-1c, pero normales de SREBP-1a y SREBP-2 (Shimomura *et al.*, 1999a). Asimismo, se ha demostrado que la SREBP-1 también

se modula por medio de los ácidos grasos poliinsaturados (Clarke, 2001; Hannah *et al.*, 2001).

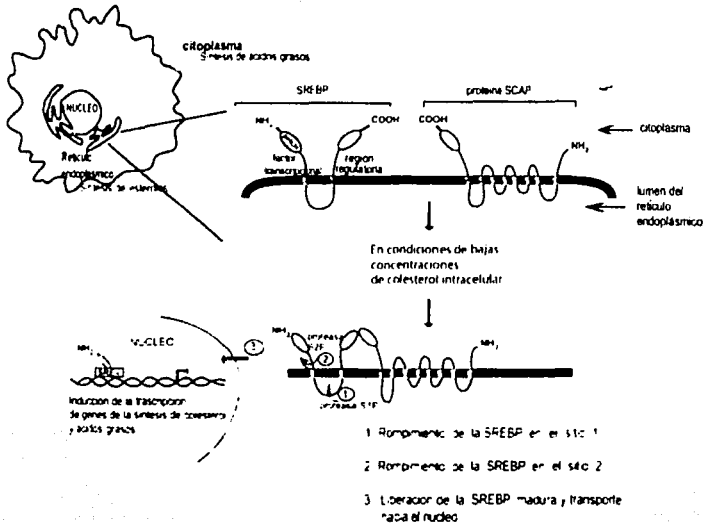


Figura 6. Esquema del proceso de proteólisis y liberación de la SREBP madura desde el RE hasta el núcleo.

1.7 EFECTO HIPOCOLESTEROLÉMICO DE LA SOYA

Como se ha mencionado antes, las dietas ricas en colesterol, tan comunes en el Mundo Occidental provocan graves daños en la salud del individuo. Asimismo, se ha encontrado que la administración de dietas basadas en proteína de origen animal tales como la caseína (que es la proteína de la leche), aumentan los niveles de colesterol en sangre de animales experimentales, sobre todo en lo que se refiere a partículas IDL (Lipoproteínas de densidad intermedia) provocando problemas de aterosclerosis en estos animales; este hecho se presenta a pesar de que las dietas sean bajas en grasa y libres de colesterol; no obstante, si la dieta recibida es una dieta normal y balanceada los animales no desarrollan estos síntomas. Las posibles causas de éste fenómeno son el hecho de que los animales que consumen este tipo de dietas excretan menos esteroides neutros y producen menos ácidos biliares; de hecho, se ha observado que la biosíntesis de colesterol en el hígado de estos organismos se encuentra disminuida pero su concentración en sangre es muy alta (Huff y Carroll, 1980).

Por otra parte, se reconoce el hecho de que una alimentación basada en proteínas vegetales en preferencia a las proteínas de origen animal, disminuye en gran medida los niveles de colesterol de los individuos (Erdman y Fordyce, 1989; Carroll, 1991; Anderson *et al.*, 1995). La proteína de soya es la proteína vegetal más utilizada para estos fines (Anderson *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998; Duane 1999); se ha informado que el consumo de soya en animales experimentales reduce los niveles de colesterol total (Potter, 1996; Nagaoka *et al.*, 1997), de LDL, de VLDL y de apo B (Tovar-Palacio *et al.*, 1998) así como de HDL e IDL (Greaves *et al.*, 1999).

No se conocen bien los mecanismos por los cuales la proteína dietaria modifica los niveles de colesterol o cuales son los componentes de las proteínas que causan esto. Algunos autores creen que la relación lisina/arginina es importante en

la capacidad aterogénica de una proteína y la arginina es de manera general un aminoácido frecuente en la proteína vegetal; asimismo, se ha informado que los aminoácidos libres presentes en plasma sanguíneo pueden influir en la secreción de hormonas como el glucagon y la insulina, así como en la actividad de la HMG-CoA reductasa (Carroll, 1991).

La soya se consume en los países orientales desde hace 5,000 años en variados estilos gastronómicos por ser una fuente rica en proteína pues contiene 36 % de proteína, prácticamente el doble de muchas otras legumbres; posee cantidades adecuadas de aminoácidos esenciales, en especial de lisina, que en ocasiones es baja en la proteína vegetal (Erdman y Fordyce, 1989), además los granos maduros tienen un 20 % de lípidos, 85 % de los cuales corresponden a ácidos grasos insaturados (Smil, 2000).

Los mecanismos por los cuales la soya posee un efecto hipocolesterolémico no están aún bien dilucidados, pudiendo ser su contenido de isoflavonas, aminoácidos, péptidos, saponinas, ácido fítico, fibra o inhibidores de la tripsina (Potter, 1995), o bien, un aumento en los niveles de tiroxina (Potter *et al.*, 1996) o una disminución en la relación insulina/glucagon (McCarty, 1999).

El interés principal se ha centrado en el efecto de las isoflavonas, tales como la genisteína y la daidzeína pues tienen una estructura similar a los estrógenos, hormonas que poseen propiedades hipocolesterolémicas (Anthony *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1997; Crouse *et al.*, 1999). No obstante, existen estudios que demuestran que las isoflavonas no tienen un efecto hipocolesterolémico como tal, sino que más bien regulan el metabolismo de los lípidos alterando la expresión de genes relacionados con su procesamiento (Tovar-Palacio *et al.*, 1998). Se ha sugerido también que las isoflavonas pueden bajar los niveles de colesterol incrementando la actividad del receptor LDL (Kirk *et al.*, 1998). Asimismo, se ha informado que las isoflavonas pueden inhibir la agregación plaquetaria *in vitro*

mediante la inhibición de la tirosina cinasa, enzima implicada en la realización de este fenómeno (Gaudette y Holub, 1990). Se ha sugerido también que estos compuestos pueden unirse directamente al receptor de estrógenos y se sabe además que la genistéina posee propiedades antioxidantes (Anthony *et al.*, 1998).

Otro posible mecanismo de regulación de los niveles de colesterol proporcionado por la soya, es la alta tasa de excreción de ácidos biliares a través de las heces que se presenta en animales alimentados con esta proteína (Huff y Carroll, 1980; Nagata *et al.*, 1982; Nagaoka *et al.*, 1999). Se cree que la soya reduce la absorción intestinal de colesterol debido a que es una proteína menos digerible que otras como la caseína y a que los péptidos hidrofóbicos que quedan después de su digestión se unen a los ácidos biliares que son así excretados, disminuyendo los niveles de colesterol en plasma (Madani *et al.*, 1998); esto último ha sido comprobado en estudios *in vitro* con células CaCo-2 (Nagaoka *et al.*, 1997) de epitelio intestinal. Por el contrario, la caseína, al tener un alto grado de fosforilación inhibe la unión de los complejos de ácidos biliares con los fosfatos de calcio insolubles y entonces se aumenta la absorción de ácidos biliares y de colesterol en el intestino (Carroll, 1991). Se sabe sin embargo que como una forma de compensación por la pérdida de esteroides fecales, la proteína de soya puede estimular la actividad de la HMG-CoA reductasa, enzima limitante en la síntesis de colesterol y de la 7 α -hidroxilasa, la enzima clave en la conversión de colesterol a ácidos biliares (Madani *et al.*, 1998).

Otra característica de este vegetal que la hace potencialmente benéfica es su contenido de aminoácidos, específicamente su bajo contenido de metionina, compuesto relacionado con niveles altos de colesterol por algunos autores (Morita *et al.*, 1997). Asimismo, la proteína de soya contiene niveles altos de arginina y se sabe que un aumento en la concentración dietaria de este aminoácido causa un descenso en los niveles de colesterol sérico (Anderson *et al.*, 1995). Se han realizado estudios

que evalúan el efecto hipocolesterolémico de la administración de una mezcla de los aminoácidos libres que contiene la soya y estos son similares, aunque no tan notorios, como cuando se utiliza la proteína completa (Erdman y Fordyce, 1989).

Por otra parte, algunos autores han observado un incremento en los niveles plasmáticos de glucagon en pacientes que reciben dieta de soya, sobre todo si está suplementada con arginina; esta observación es paralela a ligeros descensos en los niveles de insulina (Carroll, 1991), los cuales se encuentran elevados en animales experimentales que reciben dietas con caseína (Sugano *et al.*, 1982). El glucagon estimula (y la insulina inhibe) varios mecanismos dependientes de AMP-c que causan una "down-regulation" (suprarregulación) de varias enzimas lipogénicas y de la síntesis de colesterol y que también provocan una "up-regulation" (sobrerregulación) de receptores LDL hepáticos (McCarty, 1999), de hecho se ha encontrado que la ingesta de soya incrementa los niveles de ARNm del receptor LDL en mujeres hipercolesteronémicas, sugiriendo este hecho un aumento en la tasa de captura del colesterol (Baum *et al.*, 1998).

En cuanto a la hormona tiroxina, no se sabe como podría ejercer sus efectos hipocolesterolémicos, pero cuando sus niveles son altos, como en el caso del hipertiroidismo, el colesterol total y el LDL-colesterol están disminuidos (Forsythe, 1986).

No obstante, diferentes grupos de investigación en torno a las propiedades de la soya obtienen datos diferentes e incluso hay estudios que demuestran que la soya tiene efectos hipercolesteronémicos en humanos, sobre todo en los que poseen niveles de colesterol normales (Kurowska *et al.*, 1998); sin embargo cabe aclarar que en animales esta proteína tiene siempre efectos hipocolesterolémicos y que los resultados también dependen del tratamiento que haya recibido este vegetal para su consumo.

1.8 SÍNDROME NEFRÓTICO

Existen patologías en las que también se observa un aumento en las concentraciones de colesterol en sangre, por ejemplo el Síndrome Nefrótico. La sintomatología de este padecimiento se caracteriza por la coexistencia de proteinuria, hipoproteinemia, hiperlipidemia e hipercoagulabilidad (Harris e Ismail, 1994). El Síndrome Nefrótico es una enfermedad de etiología desconocida, pero relacionada con trastornos del sistema inmune (Nadasdy *et al.*, 1994), que surge como consecuencia de una menor capacidad de la barrera glomerular para excluir de la orina proteínas de tamaño intermedio (40 a 200 kD), perdiéndose así proteínas tales como albúmina, inmunoglobulinas, proteínas moduladoras de la cascada de coagulación sanguínea, proteínas transportadoras, hormonas como la eritropoyetina, hormonas esteroideas y tiroideas, además de iones de hierro, cobre y zinc y metabolitos de la vitamina D. Independientemente de las causas de este padecimiento, el término "Síndrome Nefrótico" es clínicamente útil y está asociado con un cuadro de secuelas clínicas importantes, como retención de sodio y el consecuente edema, hiperlipoproteinemia y complicaciones tromboembólicas e infecciosas por pérdida de grandes cantidades de IgG (Orth y Ritz, 1998). Este padecimiento está relacionado con diversas enfermedades como la nefropatía diabética, la glomerulopatía de cambios mínimos, la glomerulosclerosis focal segmental, la glomerulonefritis membranosa, el lupus, la hepatitis B y C, el SIDA, etc. (Eddy y Schnaper, 1998).

En lo referente al metabolismo de lípidos, el Síndrome Nefrótico se caracteriza por la elevación de la concentración plasmática del colesterol total, aunque también se registran valores altos de triglicéridos; asimismo, las IDL, las LDL y las VLDL aumentan (Kaisen, 1994; Wheeler y Bernard, 1994; Orth y Ritz, 1998) y están además enriquecidas de ésteres de colesterol (Wheeler y Bernard, 1994; Orth y Ritz, 1998). En algunos casos hay también hiperquilomicronemia

(Newmark *et al.*, 1975). Los valores de HDL por lo general son normales (Orth y Ritz, 1998). Se ha reportado que existen niveles elevados de apo B, C y E (apoproteínas características de los quilomicrones y de las IDL, VLDL y LDL) así como valores normales de las apoproteínas AI y AII (encontradas en las HDL) (Wheeler y Bernard, 1994). La elevación de las apo B y E no se observa sin embargo a nivel de ARNm, pues son genes constitutivos, sino que el aumento de estas proteínas se da a nivel postranscripcional (Sun *et al.*, 1992).

No se conoce la causa precisa que facilita la síntesis hepática de lipoproteínas, pero se ha relacionado con la hipoalbuminemia, ya que la infusión de albúmina en individuos con síndrome nefrótico puede normalizar el perfil de lípidos y lipoproteínas plasmáticos; de esta manera, se piensa que el aumento en las concentraciones de colesterol en plasma es una manera de compensar la presión oncótica. Si se administran otras sustancias oncóticamente activas, como el dextrán, se obtienen los mismos resultados (Wheeler and Bernard, 1994) y en cultivos de hepatocitos se puede regular la secreción de albúmina y de VLDL, triglicéridos y apo B de acuerdo a la presión oncótica del medio de cultivo (Davis *et al.*, 1980). Sin embargo, algunos autores piensan que la baja en la presión oncótica que se observa en el Síndrome Nefrótico, no es suficiente para explicar esta elevación de colesterol pues las condiciones de hiperlipoproteinemia no se reproducen completamente en ratas analbuminémicas (Davies *et al.*, 1990).

Las dislipidemias nefróticas se llevan a cabo por dos mecanismos: uno es la sobreproducción y el otro el escaso catabolismo de las lipoproteínas que contienen apo-B (Vega *et al.*, 1995). Se ha encontrado que en hígados de ratas nefróticas existe una mayor cantidad de ARNm de enzimas lipogénicas (Vaziri y Liang, 1995) y estudios *in vitro* han demostrado que este órgano, proveniente de animales experimentales con esta patología, tiene una tasa mayor de incorporación de aminoácidos y precursores de lípidos, además de que la secreción de lipoproteínas

está también aumentada (Brenner y Sharif, 1980); esto se ha observado también en estudios *in vivo* en ratas nefróticas, cuyos hígados han estado además enriquecidos de colesterol (Goldberg *et al.*, 1982). En pacientes nefróticos, sin embargo, no se ha encontrado una mayor tasa de síntesis de colesterol (Dullaart *et al.*, 1996) y la síntesis y utilización de apo-B varía de acuerdo a la presencia o ausencia de hipertrigliceridemia (Vega *et al.*, 1995). No se conoce con certeza si existen problemas a nivel del receptor LDL, pues los estudios al respecto son contradictorios (Wheeler y Bernard, 1994).

No obstante, el perfil de lípidos plasmáticos en el Síndrome Nefrótico es considerado como aterogénico, y esto aunado a que la mayor parte de los pacientes presentan otras complicaciones como hipertensión e hipercoagulabilidad, hacen que exista un alto riesgo de complicaciones vasculares periféricas, cardiovasculares y cerebrovasculares en los individuos que lo padecen, además de que la hiperlipidemia contribuye a aumentar el daño renal (Wheeler y Bernard, 1994).

Anteriormente se recomendaba para el tratamiento de pacientes con Síndrome Nefrótico el consumo de dietas ricas en proteína para compensar la pérdida de estas macromoléculas a través de la orina; sin embargo en los últimos años se ha fomentado el uso de dietas con bajo contenido protéico, pues se ha encontrado que altas concentraciones de proteína dietaria aumentan la tasa de filtración de los riñones y se acelera entonces la pérdida de proteínas, así como su catabolismo (Olmer *et al.*, 1989; Al-Bander y Kaysen, 1991; D'Amico *et al.*, 1991; Walser *et al.*, 1996).

El tipo de proteína utilizada en estas dietas ha sido normalmente de origen animal, pero en la última década se ha sugerido el consumo de proteína vegetal como una alternativa para los pacientes con trastornos renales (Kontessis *et al.*, 1990; Don *et al.*, 1991; D'Amico *et al.*, 1992; Dwyer *et al.*, 1993). Se ha observado que el consumo de esta proteína en pacientes con Síndrome Nefrótico disminuye los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

niveles de colesterol, HDL, LDL, fosfolípidos, apo A y B (D'Amico *et al.*, 1992) y triglicéridos, así como un descenso en la proteinuria (Gentile *et al.*, 1993). Este tipo de alimentación disminuye el flujo sanguíneo renal, por lo que existe un menor deterioro de la filtración que se lleva a cabo en los glomérulos. Los efectos de la soya son semejantes a los que se observan en pacientes tratados con lovastatina (Fujisawa *et al.*, 1995).

El Síndrome Nefrótico puede ser inducido experimentalmente mediante la administración del aminonucleósido de puromicina (ANP), el cual es un fuerte agente nefrotóxico que produce alteraciones en las células epiteliales glomerulares, constituyendo así un modelo práctico para estudios referentes a la elevación de los niveles de colesterol.

En base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo el conocer si las proteínas SREBP's están implicadas en el aumento plasmático del colesterol y ácidos grasos en el Síndrome Nefrótico y evaluar el posible efecto que una dieta basada en proteína de soya pueda tener sobre estas proteínas.

Estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio muestran que la alimentación de ratas con proteína de soya permite un desarrollo y un crecimiento similar al de ratas alimentadas con caseína, lo cual demuestra que el consumo de proteína vegetal a concentraciones adecuadas llena los requerimientos nutricionales de estos animales, con la ventaja de que la dieta basada en proteína de soya reduce significativamente los niveles de colesterol plasmático (Torres *et al.*, 2000).

2. OBJETIVO

Conocer si las proteínas SREBP's están implicadas en la reducción de los niveles de colesterol y ácidos grasos séricos por la proteína de soya en el Síndrome Nefrótico Experimental

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el efecto de la ingesta de proteína de soya sobre los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos en ratas con Síndrome Nefrótico Experimental.
- b) Evaluar la expresión de algunos de los genes regulados por las SREBP's en ratas con Síndrome Nefrótico Experimental con dieta de soya.
- c) Determinar los niveles de expresión de las proteínas SREBP's en ratas alimentadas con proteína de soya con Síndrome Nefrótico Experimental.



3. METODOLOGÍA

3.1 INDUCCION DEL SÍNDROME NEFRÓTICO EXPERIMENTAL

La inducción del síndrome nefrótico crónico se llevó a cabo por la administración subcutánea del aminonucleósido de puromicina (ANP) (SIGMA) en los días 0, 14, 28 y 42 en dosis de 50, 40, 40 y 25 mg/kg de peso respectivamente. Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 100 y 120 gramos de peso al inicio del experimento, que duró 64 días. En el caso del modelo del síndrome nefrótico agudo, la inducción de este padecimiento se logró con una sola dosis del ANP de 125 mg/kg al inicio del experimento que duró 7 días. Al igual que en el SNC se trabajó con ratas Wistar macho con un peso inicial de entre 160 y 200 gramos. Los grupos control recibieron inyecciones subcutáneas de solución salina al 0,9 % en los mismos tiempos que sus respectivos grupos nefróticos.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales de 12 individuos cada uno en el SNC y de 5 en el SNA:

- 1.- Grupo Control + caseína: Ratas normales alimentadas con una dieta con 20 % de caseína tratadas con inyecciones subcutáneas de solución salina.
- 2.- Grupo Síndrome Nefrótico + caseína: Ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP alimentadas con una dieta con 20 % de caseína.

3.- Grupo Control + soya: Ratas normales alimentadas con dieta con 20 % de soya tratadas con inyecciones subcutáneas de solución salina.

4.- Grupo Síndrome Nefrótico + soya: Ratas con síndrome nefrótico inducido con ANP alimentadas con una dieta con 20 % de soya.

Los animales estuvieron en condiciones de bioterio bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 por 12 horas en jaulas individuales con libre acceso al agua y al alimento. En el SNC la medición del peso de los animales se realizó tres veces por semana, el consumo de alimento dos veces por semana y a los 7, 21, 35 y 63 días se hicieron determinaciones de colesterol y triglicéridos en suero y de proteínas urinarias. En el SNA se registró diariamente el consumo de alimento y el peso de los animales y la proteína urinaria, así como la determinación de colesterol y triglicéridos en suero se realizaron solo al final del ensayo.

3.3 DIETAS

Las dietas fueron consumidas en seco y su contenido de nutrimentos se muestra a continuación:

Dieta con 20% de caseína		
Ingrediente	g/kg	%
Caseína	200	20
Mezcla de Vitaminas	10	1
Mezcla de Minerales	50	5
Dextrosa	345	34.5
Almidón	345	34.5
Aceite de Maíz	50	5

RESIS CON
DE ORIGEN

Dieta con 20 % de soya

Ingrediente	g/kg	%
Soya	200	20
Mezcla de Vitaminas	10	1
Mezcla de Minerales	50	5
Dextrosa	345	34.5
Almidón	345	34.5
Aceite de Maíz	50	5

3.4 DETERMINACION DE PROTEINURIA Y DE LÍPIDOS EN SUERO Y EN HIGADO

Las proteínas urinarias fueron determinadas por el método de Lowry. El colesterol y los triglicéridos séricos se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos (Lakeside). Los animales se sacrificaron al final del experimento por decapitación y el hígado se perfundió con solución salina al 0.9 % con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de sangre del tejido. Se analizó el contenido de colesterol y de triglicéridos en este órgano, realizando una extracción orgánica con una solución de cloroformo : metanol 2 : 1 (Método de Folch) y con la ayuda de técnicas enzimáticas de uso comercial (Bayer).

3.5 NORTHERN BLOT

Se realizaron ensayos de Northern Blot para conocer la presencia de ARNm de la HMG-CoA reductasa, de la HMG-CoA sintasa, del receptor LDL, de la enzima málica y de la sintasa de ácidos grasos, así como de la SREBP-1, aproximadamente 4 ensayos en cada caso. Con este fin se realizó la extracción de ARN total de hígado por el método del Trizol (SIGMA) y se sometieron 15 µg de ARN a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN fue transferido a una membrana de nylon (Hybon N+ de Amersham Pharmacia Biotech).

Las sondas de ADNc necesarias se prepararon por medio de la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y de PCR, a partir de primers obtenidos por medio del programa computacional Oligo 5.0 y basándose en las secuencias reportadas en el GenBank para los genes estudiados.

Los primers para la HMG-CoA reductasa (*Rattus norvegicus*) son:

sentido→ACAAGAAACCTGCTGCCATAA

antisentido→GGTGACCCCCACACTGAT,

para la HMG-CoA sintasa (*Rattus sp.*):

sentido→GAACTTCTCTCCCCCTGGTGA

antisentido→CAGCGGCTCCCCTTTCTT,

para el receptor LDL (*R. norvegicus*):

sentido→CAATGGGGGTGGTCGGAAAA

antisentido→TGCAATGGGGAGGAAGATGGA,

para la enzima málica (*R. norvegicus*):

sentido→CCCGCATCTCAACAAGG

antisentido→CTTCTTCAGGCCACGAATAAC,

para la sintasa de ácidos grasos (*R. norvegicus*):
sentido→GCTTTGCTGCCGTGCCTTCT
antisentido→GTGTCTGCTGGGGTCCCTCGTT,
para SREBP-1 (*Cricetulus griseus*):
sentido→TCCCAGAGTAGCCCCCTGTCC
antisentido→CCAGTCCCCATCCACGAA.

Las sondas fueron marcadas radiactivamente con ^{32}P (Fosforo 32) con ayuda del Kit Redy-Prime (Amersham Pharmacia Biotech). La cantidad de cpm (cuentas por minuto) y la digitalización de las bandas se realizó mediante el uso del Instant Imager (Packard).

3.6 OBTENCIÓN DE NÚCLEOS CELULARES

Se realizó el aislamiento de núcleos por centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa (Gorski *et al.*, 1986). Se homogenizaron 4 gramos de hígado en buffer de lisis (Sacarosa 0.3 M, ditiotrietol 5 mM, MgCl_2 5 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 5 y tritón 100X al 0.05%), se filtró en 4 capas de gasa y se centrifugó a 2500 r.p.m. en un rotor JA-20 de Beckman por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en buffer con sacarosa 2.3 M, MgCl_2 2 mM y Tris/HCl 10 mM, pH 7.5, se depositó en un tubo Quick Seal con el mismo buffer y se centrifugó a 33,500 r.p.m. en un rotor 70Ti de Beckman por 45 minutos a 4°C. El botón fue resuspendido en 500 μl de buffer de almacenamiento (Glicerol 50%, MgCl_2 2 mM, EDTA 0.1 mM y HEPES 50 mM, pH 7.5). Se utilizó en todos los pasos una mezcla inhibidora de proteasas (EDTA 12.6 mM, EGTA 12.6 mM, Benzamidina 63.3 mM, DTT 63.3 mM, Pepstatina A 0.1 mM y Leupeptina 1 mg/ml).

3.7 INMUNOBLOT

Se determinó la concentración de proteína del extracto nuclear por el método de Lowry y 20 µg se sometieron a una electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida al 8 %, en presencia de SDS al 1% y DTT 0.2 M. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech). Para la identificación de las proteínas SREBP-1 y SREBP-2 las membranas fueron bloqueadas durante 2 horas-toda la noche con leche descremada al 3-5 %; se usaron los anticuerpos anti-SREBP-1 y anti-SREBP-2 por 1.5 horas-toda la noche y se reveló la reacción a través de la oxidación de luminol con el Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) que utiliza un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano.

Los anticuerpos para las proteínas SREBP-1 y 2 que se utilizaron fueron sobrenadantes del cultivo de hibridomas de ATCC (American Type Culture Collection) anti-SREBP-1 (CRL-2121) e hibridoma anti-SREBP-2 (CRL-2128).

3.8 ANALISIS ESTADISTICO

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos, mientras que las diferencias específicas entre los grupos se evaluaron con la prueba de Fisher. El nivel de significancia se consideró una $p < 0.05$. Se utilizó el programa Stat View v. 4.05 para el cálculo estadístico.

4. RESULTADOS

4.1 SINDROME NEFROTICO CRONICO

INGESTA DE ALIMENTO Y GANANCIA DE PESO

Las ratas controles alimentadas con dieta de proteína de soya o caseína consumieron cantidades similares de alimento durante los 64 días del estudio (Figura 7). La inducción del Síndrome Nefrótico con el aminonucleósido de puromicina no cambió el patrón de ingesta de alimento observado en las ratas controles, excepto en los días 28 a 35, donde las ratas nefróticas mostraron una reducción significativa en la ingesta de alimento ($p < 0.05$). La ganancia de peso no mostró el mismo patrón que la ingesta de alimento (Figura 8). Las ratas controles alimentadas con caseína crecieron a una tasa de aproximadamente 4.4 gr/día, mientras que las alimentadas con proteína de soya crecieron a una tasa de 3.6 gr/día. La tasa de crecimiento fue significativamente diferente entre los grupos alimentados con caseína y proteína de soya a partir del día 21 de estudio, y esto se mantuvo hasta el final del periodo experimental. Las ratas nefróticas durante los primeros 30 días de estudio mostraron tasas de crecimiento similares a las de los grupos controles de caseína o proteína de soya (4.5 y 3.6 gr/día, respectivamente). Sin embargo, después del día 40, las ratas nefróticas mostraron una significativa reducción en su tasa de crecimiento ($p < 0.05$). Al final del estudio, las ratas nefróticas alimentadas con dieta de proteína de soya tuvieron una menor ganancia de peso que las ratas nefróticas alimentadas con dieta de caseína ($p < 0.05$).

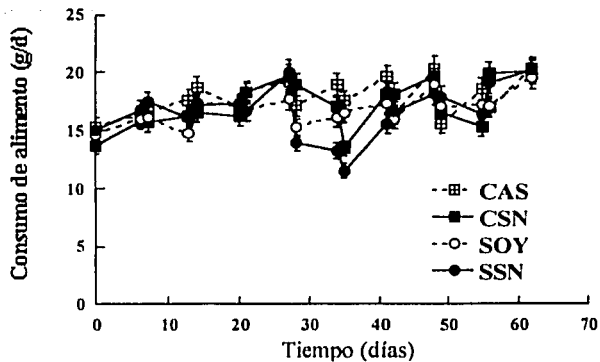


Figura 7. Consumo de alimento de los animales experimentales del Síndrome Nefrótico Crónico en gramos/día (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

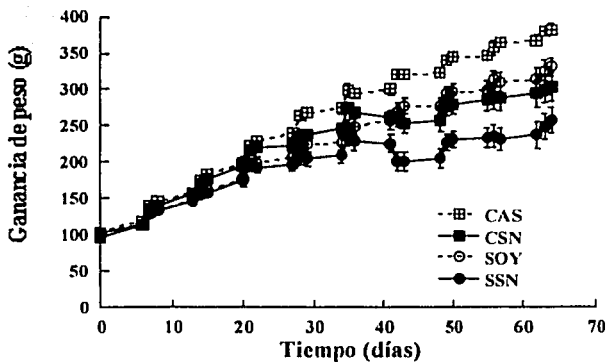


Figura 8. Ganancia de peso de los animales experimentales del Síndrome Nefrótico Crónico a lo largo de los 64 días del experimento en gramos (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGINALIDAD

PROTEINAS TOTALES URINARIAS

La excreción de proteínas totales urinarias no varió significativamente entre los grupos controles alimentados con caseína o proteína de soya durante el estudio; las concentraciones permanecieron por debajo de los 22 mg/día/dL. Como se muestra en la figura 9, las ratas nefróticas alimentadas con caseína o soya a partir del día 10 presentaron proteínas urinarias significativamente mayores que las de sus correspondientes grupos control. Sin embargo, la proteinuria fue siempre significativamente mayor en las ratas nefróticas alimentadas con dieta de caseína en comparación con las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya. Al final del estudio, la proteína urinaria fue 21 veces mayor en las ratas nefróticas alimentadas con caseína que su grupo control, mientras que las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya mostraron un incremento de 12 veces con respecto a su grupo control. Así, las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya redujeron en un 53% la excreción de proteína urinaria comparada con la de las ratas nefróticas alimentadas con dieta de caseína.

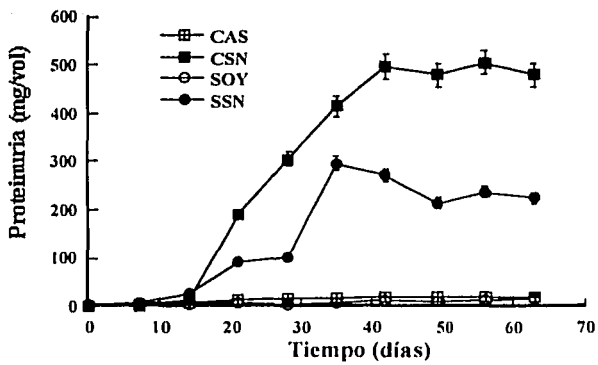


Figura 9. Contenido de proteína en la orina de los animales experimentales del Síndrome Nefrótico Crónico en mg/vol (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LIPIDOS SERICOS

Las figuras 10 y 11 muestran las concentraciones séricas de triglicéridos y colesterol en las ratas controles y nefróticas. Los resultados no mostraron una diferencia significativa en triglicéridos séricos (99.5 ± 4.1 vs. 74 ± 5.7 mg/dL) y colesterol sérico (65.1 ± 1.8 vs. 72.1 ± 2.3 mg/dL) entre las ratas controles alimentadas con caseína o proteína de soya respectivamente. Desde el día 2, las ratas nefróticas tuvieron concentraciones significativamente mayores de triglicéridos y colesterol séricos en comparación con sus controles. Sin embargo, las ratas

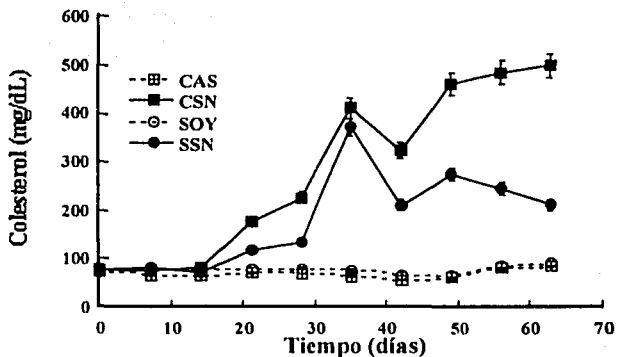


Figura 10. Contenido de colesterol en mg/dL (\pm error estándar) en el suero de animales experimentales con Síndrome Nefrótico Crónico. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

nefróticas alimentadas con proteína de soya presentaron menores incrementos de triglicéridos y colesterol séricos que las ratas nefróticas alimentadas con caseína a partir del día 21 hasta el final del estudio ($p < 0.05$). Así, en el día 64, la dieta de proteína de soya produjo un 56% y 59% de triglicéridos y colesterol séricos mas bajos que los de las ratas nefróticas alimentadas con caseína. Al final del estudio los triglicéridos séricos de las ratas nefróticas alimentadas con caseína fueron un 230% mas elevados que los de sus controles, mientras que las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya solo presentaron un incremento del 70% en comparación a sus respectivos controles. El colesterol sérico mostró un patrón similar; los niveles fueron 460% y 140% mayores en las ratas nefróticas alimentadas con caseína o proteína de soya en comparación con sus correspondientes controles.

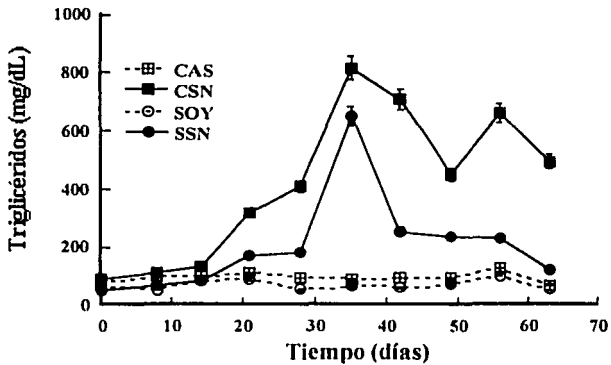


Figura 11. Contenido de triglicéridos en mg/dL (\pm error estándar) en el suero de animales experimentales con Síndrome Nefrótico Crónico. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

LIPIDOS EN HIGADO

La figura 12 muestra que las ratas control alimentadas con proteína de soya presentaron valores de colesterol en hígado 85% más altos que los encontrados en las ratas control con dieta de caseína ($p < 0.05$). Asimismo, las ratas nefróticas con dieta de caseína tuvieron una mayor concentración (50 %) ($p < 0.05$) de este lípido en

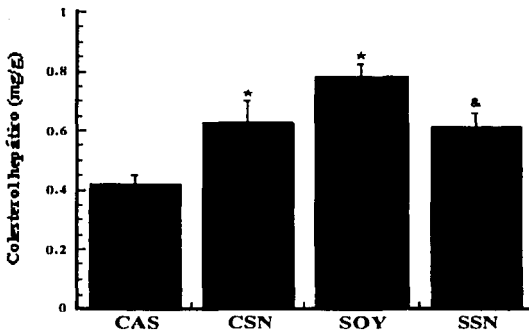


Figura 12. Colesterol en el hígado de ratas con Síndrome Nefrótico Crónico en mg/gramo de tejido (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p = 0.05$ vs. CAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hígado con respecto a las ratas control con dieta de caseína mientras que el grupo de ratas nefróticas alimentadas con soya presentaron valores 21.8 % mas bajos que su grupo control.

Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de triglicéridos en hígado de los cuatro grupos experimentales (Figura 13).

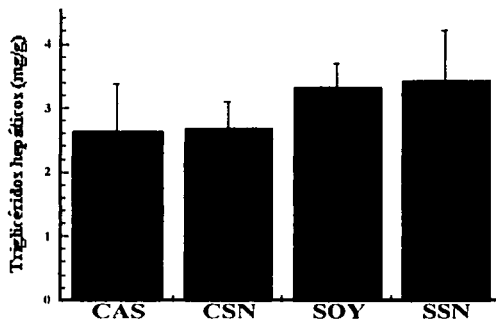


Figura 13. Triglicéridos en el hígado de ratas con Síndrome Nefrótico Crónico en mg/gramo de tejido (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

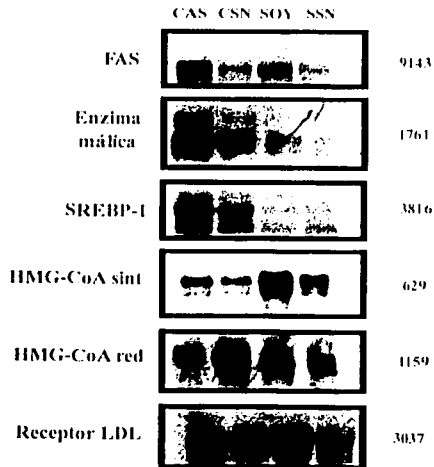
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANALISIS POR NORTHERN BLOT DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS Y COLESTEROL

Las ratas control alimentadas con proteína de soya tuvieron valores más bajos ($p < 0.05$) en la expresión génica de la Sintasa de ácidos grasos, la enzima málica y la proteína SREBP-1 en un 44, 47 y 54 % respectivamente comparadas con la expresión génica observada en las ratas control alimentadas con caseína. Por el contrario, las ratas control con dieta de soya presentaron una mayor expresión ($p < 0.05$) de los genes de las enzimas HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, así como del receptor LDL en un 94, 23 y 68% respectivamente, comparadas con lo encontrado en las ratas control que recibieron dieta de caseína (Figuras 14 y 15).

Las ratas con Síndrome Nefrótico Crónico alimentadas con caseína presentaron una menor expresión de la Sintasa de ácidos grasos, de la enzima málica, así como de la proteína SREBP-1 (51, 39 y 33%, respectivamente) y una mayor expresión de la HMG-CoA reductasa (1.5 veces) que las ratas control con dieta de caseína ($p < 0.05$). Las ratas nefróticas que consumieron proteína de soya presentaron una menor expresión génica para la HMG-CoA sintasa, la HMG-CoA reductasa y el receptor LDL (27, 33 y 50 %, respectivamente) comparadas con lo encontrado en las ratas control que consumieron dieta de soya (Figuras 14 y 15).

FIGURA 14
Northern Blot
Síndrome Nefrótico Crónico



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

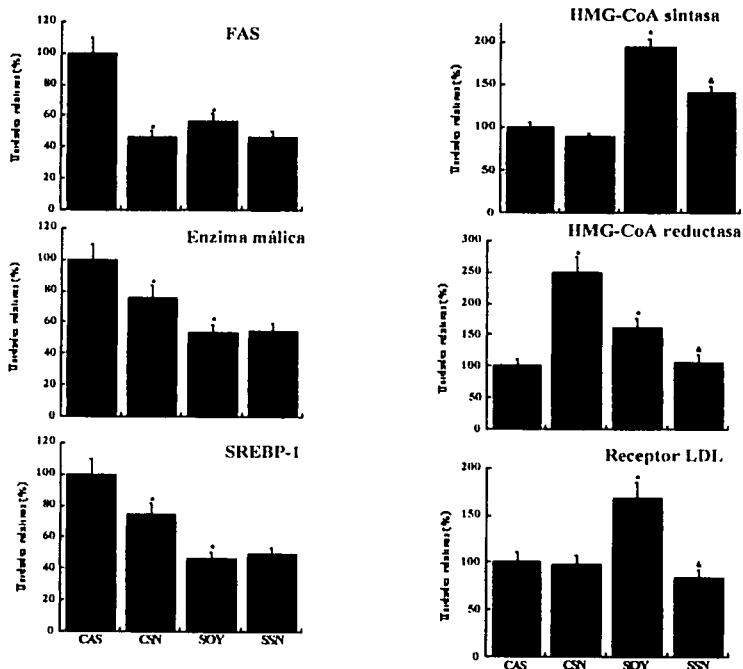


Figura 15. Expresión génica de enzimas de la biosíntesis del colesterol y triglicéridos expresada en unidades relativas (%) (\pm error estándar) de los animales del Síndrome Nefrótico Crónico. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p < 0.05$ vs. CAS, & $p < 0.05$ vs. SOY.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANALISIS POR INMUNOBLOT DE SREBP-1 y -2 EN EXTRACTOS NUCLEARES

Los animales del grupo control que recibieron una dieta basada en proteína de soya tuvieron valores mas bajos (73.6 %) de la cantidad de la forma madura de

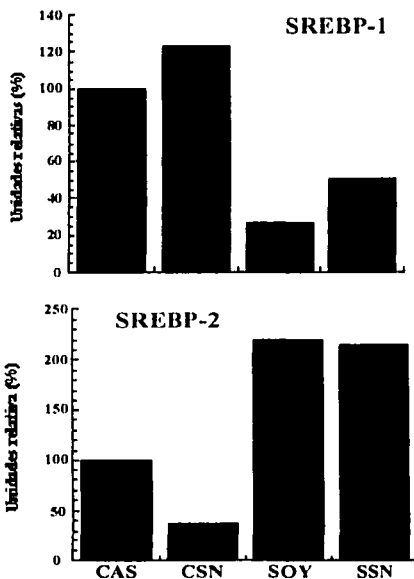
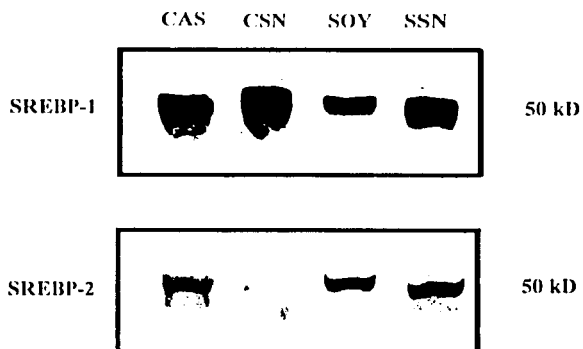


Figura 16. Ensayos de Western Blot de las proteínas SREBP-1 y SREBP-2 en los núcleos de hígado de los animales experimentales del Síndrome Nefrótico Crónico en unidades relativas (%). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

FIGURA 17
INMUNOBLOT SREBP-1 Y SREBP-2
SINDROME NEFROTICO CRONICO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SREBP-1 en extractos nucleares comparados con los de los animales control que recibieron dieta de caseína (Figuras 16 y 17). El Síndrome Nefrótico Crónico en ratas alimentadas con caseína o soya provocó un incremento de este factor transcripcional con respecto al observado en sus respectivos grupos control del 22.87 % y del 91.42 %, respectivamente. Con respecto a la proteína SREBP-2 se observó el efecto contrario, pues sus niveles en los animales control con dieta de soya fueron mayores (119 %) que en los núcleos del grupo control con dieta de caseína. Las ratas nefróticas que recibieron dieta de caseína tuvieron una menor cantidad de la proteína SREBP-2 (63.7 %) en los extractos nucleares comparada con su grupo control, sin embargo, las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya tuvieron valores muy similares a su grupo control (Figuras 16 y 17).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2 SINDROME NEFROTICO AGUDO

INGESTA DE ALIMENTO Y GANANCIA DE PESO

Las ratas control con dieta de caseína o soya consumieron cantidades de alimento similares durante los 6 días del experimento. Las ratas nefróticas alimentadas con dieta de caseína tuvieron una menor ingesta durante los dos

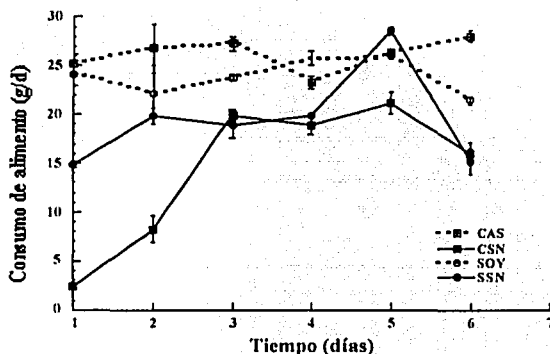


Figura 18. Consumo de alimento en gramos/día (\pm error estándar) de los animales con Síndrome Nefrótico Agudo. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

primeros días del estudio mientras que los animales con Síndrome Nefrótico que recibieron proteína de soya solo durante el primer día (Figura 18).

El peso corporal de los animales control alimentados con dieta de caseína aumentó un 16 % durante el periodo experimental, mientras que este aumentó fue solo del 6 % en las ratas control que recibieron proteína de soya ($p < 0.05$). Las ratas nefróticas que recibieron dieta de caseína aumentaron un 23 % su peso corporal ($p < 0.05$) y las ratas nefróticas con dieta de soya no aumentaron significativamente de

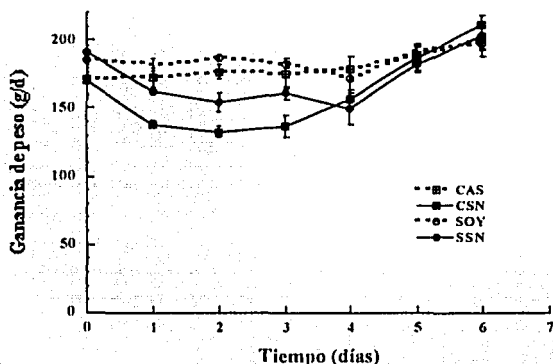


Figura 19. Ganancia de peso en gramos (\pm error estándar) de los animales del Síndrome Nefrótico Agudo. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

peso (Figura 19). El grupo de ratas nefróticas alimentadas con caseína mostró la mayor ganancia aparente de peso, sin embargo esto se asoció posiblemente a una mayor presencia de edema.

PROTEINAS TOTALES URINARIAS

En la figura 20 se muestra que en los grupos control alimentados con dieta de caseína o soya no se detectó excreción de proteína a través de la orina; sin embargo, los animales a los que se les indujo el Síndrome Nefrótico Agudo con ambas dietas presentaron valores altos en este parámetro.

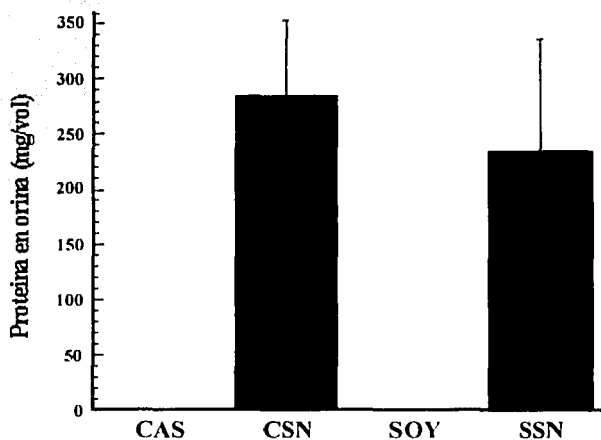


Figura 20. Concentraciones de proteína en la orina de los animales del Síndrome Nefrótico Agudo en mg/vol (\pm error estándar). CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

LIPIDOS SERICOS

Los grupos control con dieta de caseína o soya presentaron valores similares de colesterol en suero (77.4 ± 1.96 vs. 74.4 ± 4.88 mg/dL), mientras que los animales con Síndrome Nefrótico Agudo tuvieron niveles significativamente mayores ($p < 0.05$) que sus respectivos grupos control (313.4 ± 25.6 vs. 232.75 ± 5.23 mg/dL). Sin embargo, mientras que los niveles de colesterol en el grupo

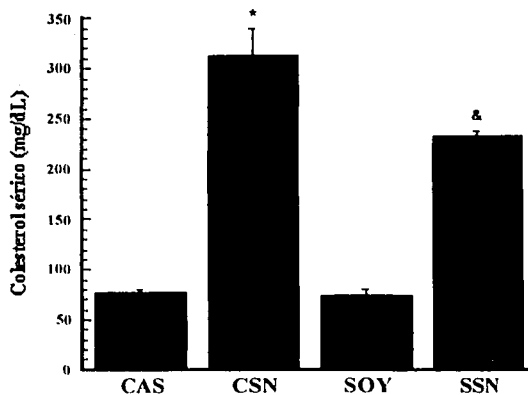


Figura 21. Colesterol en mg/dL (\pm error estándar) en el suero de los animales con Síndrome Nefrótico Agudo al final del experimento. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p < 0.05$ vs. CAS, & $p < 0.05$ vs. SOY.

nefrótico con dieta de caseína aumentaron un 305 % con respecto a su grupo control, solo aumentaron 210 % en el grupo nefrótico que recibió dieta de soya con su correspondiente grupo control (Figura 21).

Por otra parte, los triglicéridos séricos en el grupo control con dieta de proteína de soya fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los del grupo control que consumió dieta de caseína (92 ± 9.29 vs. 58.2 ± 6.88). Las ratas nefróticas que consumieron caseína tuvieron valores de triglicéridos séricos similares a su grupo control; por el contrario, los animales nefróticos alimentados con proteína de soya tuvieron un incremento significativo en las concentraciones de triglicéridos séricos ($p < 0.05$) de 2.36 veces con respecto a su grupo control (Figura 22).

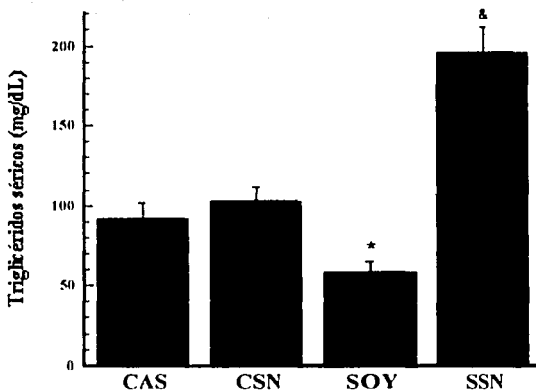


Figura 22. Triglicéridos en suero en mg/dL (\pm error estándar) de los animales con Síndrome Nefrótico Agudo al final del experimento. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p < 0.05$ vs. CAS, & $p < 0.05$ vs. SOY.

LIPIDOS EN HIGADO

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos experimentales con respecto a los niveles de colesterol en hígado (Figura 23). Sin embargo las concentraciones de triglicéridos en hígado en el grupo control con dieta de soya fueron significativamente mas altas ($p < 0.05$) que las del grupo control con dieta de caseína (2.09 ± 0.26 vs. 3.87 ± 0.7 mg/dL). Además, los valores

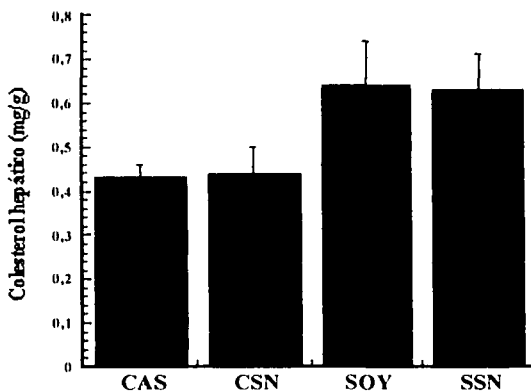


Figura 23. Contenido de colesterol en mg/gramo de tejido (\pm error estándar) de los animales del Síndrome Nefrótico Agudo. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

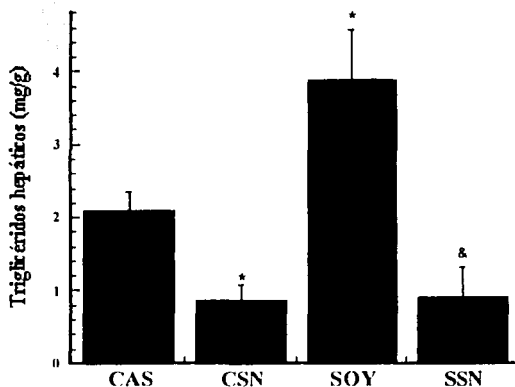


Figura 24. Triglicéridos en hígado en mg/gramo de tejido (\pm error estándar) de los animales con Síndrome Nefrótico Agudo al final del experimento. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p < 0.05$ vs. CAS, & $p < 0.05$ vs. SOY.

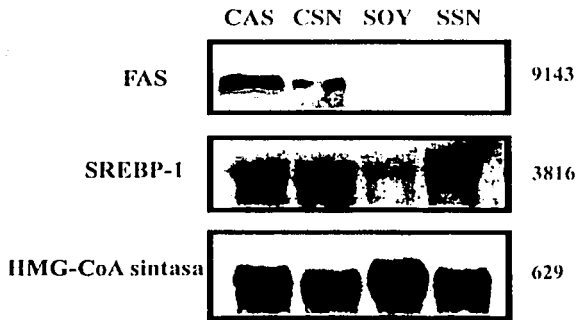
de triglicéridos en este órgano en ambos grupos con Síndrome Nefrótico Agudo fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que sus respectivos grupos control, siendo 60 % menores en el grupo con dieta de caseína y 76.5 % en el grupo con proteína de soya (Figura 24).

ANALISIS POR NORTEHRN BLOT DE LA EXPRESION GENICA DE LAS ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DE LIPIDOS Y COLESTEROL

La expresión genica de la enzima HMG-CoA sintasa aumentó 178.7 % en el grupo control que recibió dieta de soya comparado con el grupo control que recibió dieta de caseína. La expresión de la Sintasa de acidos grasos y de la proteína SREBP-1 disminuyó 64 y 23.6 % respectivamente en los animales control con dieta de soya comparándolos con los que se alimentaron con caseína ($p < 0.05$). Las ratas nefróticas alimentadas con caseína disminuyeron la expresión génica de la sintasa de acidos grasos en un 50.1 % con respecto a sus grupo control ($p < 0.05$), mientras que las ratas nefróticas alimentadas con proteína de soya disminuyeron en un 47.2 % la expresión génica de la HMG-CoA sintasa con respecto a su grupo control (Figuras 25 y 26).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 25
Northern blot
Síndrome Nefrótico Agudo



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

56

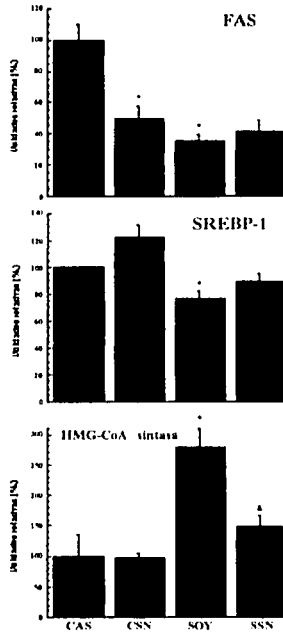


Figura 26 . Cuantificación de la expresión génica en unidades relativas (%) de algunas enzimas de la biosíntesis de colesterol y triglicéridos. CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico. * $p < 0.05$ vs. CAS, & $p < 0.05$ vs. SOY.

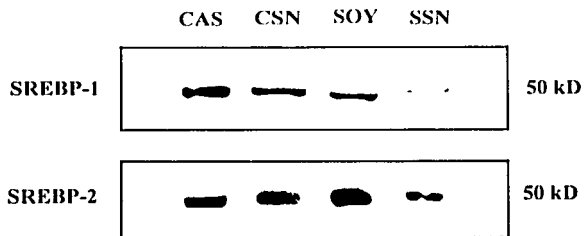
ANALISIS POR INMUNOBLOT DE SREBP-1 y -2 EN EXTRACTOS NUCLEARES

Se observó que la expresión de la proteína SREBP-1 fue menor (65 %) en el grupo control alimentado con proteína de soya con respecto al grupo control que recibió dieta de caseína. En los animales con Síndrome Nefrótico Agudo alimentados con caseína o soya se detectó una menor cantidad de la proteína SREBP-1 (20.4 y 81.1 %, respectivamente) en los extractos nucleares en relación a sus respectivos grupos control, siendo esta diferencia mas notoria en los grupos alimentados con dieta de soya (Figuras 27 y 28).

La expresión de la proteína SREBP-2 fue mayor en el grupo de animales control que recibieron dieta de soya (60 %) comparados con los de las ratas control alimentadas con caseína. Las ratas con Síndrome Nefrótico Agudo con dieta de caseína o soya tuvieron valores mas bajos en la expresión de esta proteína comparándolos con sus respectivos grupos control, aunque esta diferencia es mayor (71%) entre los grupos que recibieron dieta basada en proteína de soya y es solo del 27.8 % en el grupo nefrótico con dieta de caseína (Figuras 27 y 28).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 27
INMUNOBLOT SREBP-1 Y SREBP-2
SINDROME NEFROTICO AGUDO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

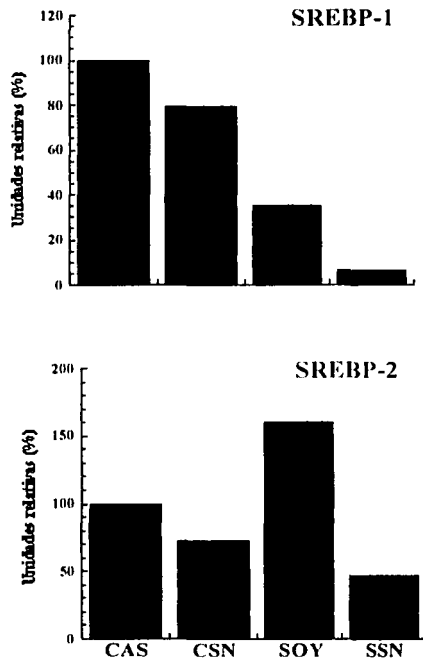


Figura 28. Presencia de las proteínas SREBP-1 y SREBP-2 en los núcleos de hígado de las ratas con Síndrome Nefrótico Agudo expresada en unidades relativas (%).CAS = Caseína, CSN = Caseína + Síndrome Nefrótico, SOY = Soya, SSN = Soya + Síndrome Nefrótico.

5. DISCUSION

El Síndrome Nefrótico está asociado con varias enfermedades tales como glomerulopatías primarias, Diabetes Mellitus y algunos trastornos del sistema inmunológico. La principal consecuencia que tiene el daño que se presenta en el riñón, es la pérdida de grandes cantidades de proteínas plasmáticas por la incapacidad de este órgano de retener a un gran número de proteínas con un peso molecular de entre 40 a 200 kDa. Como resultado de esto, se presenta un incremento en la síntesis de lipoproteínas en el hígado que son exportadas al plasma con el fin de compensar la presión oncótica, lo cual trae como consecuencia que una mayor cantidad de glomerulos se vean afectados. El presente trabajo demostró que la ingesta de proteína de soya, mejora los parámetros bioquímicos del Síndrome Nefrótico en el modelo experimental de este padecimiento inducido con ANP.

En cuanto al **consumo de alimento** no se encontraron diferencias significativas entre los 4 grupos experimentales del ensayo del Síndrome Nefrótico Crónico (SNC), lo cual aseguró que los efectos observados en otros parámetros no se debieron a posibles diferencias en la cantidad de dieta ingerida por los animales. En el caso del ensayo del Síndrome Nefrótico Agudo (SNA) se observó una menor ingesta de alimento en los dos primeros días en el caso de los animales con Síndrome Nefrótico que recibieron dieta de caseína y una baja en el primer día en el grupo que recibió dieta de soya; esto es debido a la indiferencia natural hacia el alimento que muestran las ratas después de la inyección con ANP. Sin embargo, el consumo de alimento se reestablece hasta alcanzar los valores comúnmente registrados en el laboratorio para animales de esta talla.

El **peso corporal** de los animales del experimento con SNC aumentó en los 4 grupos a lo largo de los 64 días del estudio, siendo ligeramente menor en el grupo control que recibió dieta de soya comparado con el grupo control que recibió dieta de caseína. En lo que se refiere a los grupos con SNC debe tomarse en cuenta que

los animales presentan edema como parte del cuadro clínico de esta patología, por lo que este parámetro debe tomarse con reserva. Sin embargo, es posible que la disminución en peso observada en el grupo que recibió dieta de soya con respecto al grupo con dieta de caseína pueda deberse al efecto benéfico de la soya, que cause una menor acumulación de líquidos en la cavidad abdominal de estos animales. En el caso del SNA se observó una disminución en el peso corporal de los grupos que recibieron el ANP, sobre todo en los animales que consumieron dieta de caseína y que también ingirieron menos alimento al inicio del experimento. Sin embargo, los animales recuperan el peso perdido después de unos días. Debe tomarse en cuenta que el efecto de una sola dosis de ANP de mucho mayor concentración que se utiliza en el modelo del SNA causa efectos mucho más dramáticos en un corto plazo de tiempo que en el caso del SNC en el que los daños se van dando de forma más paulatina.

Se detectó presencia de proteína en la orina tal y como se esperaba, en los grupos con SNC y con SNA independientemente de la dieta consumida, sin embargo los valores obtenidos por el grupo que recibió dieta de soya en el SNC fueron significativamente menores que los del grupo que consumió dieta de caseína, lo cual concuerda con lo observado por D' Amico *et al.* (1992) en pacientes nefróticos. Se cree por estudios realizados tanto en animales experimentales como en humanos que la soya, por algún mecanismo aun no descrito, disminuye el flujo sanguíneo renal, la hiperfiltración y la hipertensión glomerular por lo que existe un menor deterioro de los glomérulos y de esta manera disminuye la albuminuria (Viberti *et al.*, 1987; Williams y Walls, 1987; Kontessis *et al.*, 1990). Por el contrario, se ha reportado que una dieta basada en caseína aumenta la proteinuria, los daños morfológicos en el riñón y la presencia de urea en la orina del modelo experimental de riñón remanente en ratas (Williams y Walls, 1987). Sin embargo,

en el modelo del SNA no se observó este efecto debido posiblemente al corto tiempo del experimento.

Con respecto al **colesterol sérico** se observó tanto en el SNC como en el SNA que los valores de los grupos control independientemente de la dieta recibida eran normales y similares entre sí. De hecho, se sabe que la proteína de soya disminuye los niveles de colesterol solo cuando se encuentran elevados, pero en personas normocolesteronémicas la proteína de soya no tiene ningún efecto (Carroll *et al.*, 1978; Van Raaij *et al.*, 1981 y Sacks *et al.*, 1983). Por el contrario, los grupos a los que se les indujo el SN experimental tuvieron valores muy altos en este parámetro como esperaba observarse, sin embargo y de manera muy interesante los animales con dieta basada en proteína de soya presentaron valores significativamente más bajos que los animales que recibieron dieta de origen animal lo cual es similar a lo observado por D' Amico *et al.* (1992) en pacientes con nefropatía en cuanto al colesterol total y al LDL-colesterol. Este hecho confirma que la proteína de origen vegetal es recomendable en la dieta de los pacientes con Síndrome Nefrótico.

En cuanto a los **triglicéridos séricos** se observó el mismo comportamiento que para el colesterol en el experimento del SNC, aunque los valores en el grupo control que recibió dieta de soya fueron un poco más bajos que los de los animales que consumieron dieta de caseína. En el estudio del SNA también se encontró que los triglicéridos bajan en el suero de los animales control con dieta de soya con respecto al grupo control con caseína, sin embargo este parámetro no aumentó en el caso de los animales con SNA que recibieron dieta de caseína, y aumentó considerablemente en el grupo con SN y dieta de soya, lo cual ya había sido observado en nuestro laboratorio. Existen pocos datos reportados acerca de la influencia de la proteína de soya en los niveles de triglicéridos séricos, algunos autores mencionan un decremento (Grundy y Abrams, 1983), otros un aumento (Duane, 1999) y existen trabajos que no reportan cambios en este parámetro (Crouse

et al., 1999). Posiblemente al ser un tiempo muy corto el del SNA para el progreso del daño renal, el organismo trate de compensar la baja de la presión oncótica a través de la síntesis de proteínas plasmáticas, incluyendo a las lipoproteínas. Sin embargo, posiblemente en los animales nefróticos alimentados con caseína tengan una mayor actividad de la lipoproteína lipasa lo que reduce los niveles circulantes de triglicéridos, mientras que en las nefróticas alimentadas con soya, este aumento de actividad no ocurre. Esto deberá demostrarse en futuros estudios.

Con respecto a las concentraciones de colesterol en el hígado se observó que a corto plazo, como lo es en el caso del experimento del SNA, el colesterol en este órgano permaneció igual entre los cuatro grupos experimentales; sin embargo a largo plazo, representado por el ensayo del SNC, el colesterol se acumuló en el hígado de los animales control con dieta de proteína de soya, fenómeno que también se dio en los grupos con SNC en ambas dietas. De hecho aunque no existen diferencias estadísticamente significativas se observa esta misma tendencia en el caso del estudio del SNA. Es posible que uno de los efectos benéficos de la soya sea que favorezca que el colesterol se acumule dentro del hígado y no esté circulando en el organismo donde puede causar graves trastornos patológicos, sin embargo existen pocos reportes acerca de las concentraciones de colesterol en el hígado de animales experimentales con diferentes dietas; en estos estudios no se encontraron diferencias (Nagaoka *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1997) o bien, una ligera disminución en los animales con dieta de soya con respecto a los que consumieron caseína (Iritani *et al.*, 1996). Por otra parte este lípido en hígado estuvo significativamente elevado en el grupo con SNC en comparación con su grupo control con dieta de caseína, pero disminuyó en el caso de las ratas nefróticas que recibieron dieta de soya con respecto a su control. Estas diferencias se pueden deber a las posibles diferentes tasas de síntesis y movilización de este lípido debido al tipo de dieta y al Síndrome Nefrótico. Los valores de colesterol en hígado de animales con Síndrome Nefrótico

Experimental inducido con ANP obtenidos por otros autores no muestran diferencias con respecto a los de los animales control (Vaziri y Liang, 1995 y 1996; Liang y Vazari, 1997), sin embargo no existen aún reportes para este parámetro en los que se utilice el modelo del SN con dietas conteniendo diferentes tipos de proteína.

En cuanto a los **triglicéridos en hígado** y a diferencia de lo encontrado para el colesterol en este órgano, no se observaron cambios significativos a largo plazo como lo indican los resultados obtenidos en el experimento del SNC para ninguno de los 4 grupos de animales experimentales; sin embargo a corto plazo, como en el ensayo del SNA, se observó que los triglicéridos se acumularon en el hígado de los animales control que se alimentaron con dieta de soya comparándolos con los animales control con dieta de caseína, lo cual es contrastante con lo obtenido por Iritani *et al.* (1996) que encontraron una disminución de los triglicéridos en hígado de animales normales con dieta de soya con respecto a animales con dieta de caseína. A pesar de esto, los triglicéridos se encontraron en muy bajas concentraciones en los dos grupos con SNA. Esto tal vez se deba a que todos los triglicéridos sintetizados deban integrarse al plasma sanguíneo en las lipoproteínas con rapidez para compensar la presión oncótica que se encuentra disminuida.

A través de los análisis de **Northern Blot** se puede observar que el consumo de proteína de soya provocó un aumento en la expresión de los genes de algunas de las **enzimas de la biosíntesis de colesterol** a corto y a largo plazo. La soya posiblemente favorezca que el colesterol sea excretado a través de las heces o bien utilice otro mecanismo para su control, y entonces sea necesaria la síntesis endógena de este compuesto para compensar esta pérdida. Existen varios trabajos donde reportan que una dieta libre de colesterol basada en proteína de soya incrementa la excreción de ácidos biliares a través de las heces de animales experimentales con respecto a una dieta basada en caseína (Huff y Carroll, 1980; Nagata *et al.*, 1982;

Morita *et al.*, 1997) y proponen que este sea uno de los mecanismos por los cuales la soya logra disminuir los niveles de colesterol sérico. Sin embargo, se ha comprobado que existen otros medios por los cuales la proteína de soya reduce el colesterol como es a través de su bajo porcentaje de metionina, aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual la metionina influye en el metabolismo del colesterol (Morita *et al.*, 1997). Se ha reportado que una dieta basada en proteína de soya disminuye la expresión del ARNm de la apolipoproteína A-I que es la que estabiliza a las HDL y por lo tanto hay una menor secreción de estas por el hígado; como la mayor parte del colesterol sérico en las ratas pertenece a las HDL, entonces al haber menor presencia de estas hay menor concentración de colesterol total en suero (Oda *et al.*, 1991). Por el contrario se ha encontrado que una dieta libre de colesterol basada en proteína de soya suplementada con glicina reduce los niveles plasmáticos de colesterol en mayor grado que una dieta de soya no suplementada (Sugiyama *et al.*, 1993).

A pesar de esto, el **receptor LDL** no sufrió cambios en su expresión génica por la ingesta de proteína de soya, pues posiblemente no sea necesario aumentar su presencia en la membrana plasmática con el fin de capturar una mayor cantidad de colesterol, sino simplemente la concentración de este lípido se mantiene en valores óptimos con un aumento de su biosíntesis. Sin embargo hay que mencionar que algunos autores encontraron que una dieta de soya en mujeres postmenopáusicas hipercolesteronémicas redujo notablemente el colesterol LDL (Baum *et al.*, 1998), lo cual concuerda con lo observado por otros autores en animales experimentales; al parecer esto puede estar asociado con una mayor actividad del receptor LDL, es decir la soya, ya sea por los péptidos de la proteína o por su semejanza de sus isoflavonas con los estrógenos, aumenta sus concentraciones de ARNm y su actividad (Lovati *et al.*, 1987; Khosla *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1994; Sirtori *et al.*, 1995).

Los resultados de Northern Blot obtenidos para los grupos con SNC de ambas dietas en cuanto al **receptor LDL**, muestran que este disminuye en comparación con sus respectivos grupos control; tal vez esto sea necesario con el fin de permitir que el colesterol quede libre en el plasma sanguíneo para así compensar la presión oncótica y no sea necesario que las células capturen una gran cantidad de colesterol para mantener sus funciones. Vaziri y Liang (1996) encontraron que en el SN inducido con ANP hay cambios en el receptor LDL a nivel de proteína la cual disminuye conforme al tiempo aunque su ARNm permanece igual.

Por otra parte, y contrario a lo que podría pensarse, la expresión de las **enzimas de la biosíntesis del colesterol** no aumentaron considerablemente en los grupos con SNC. La enzima que aumenta su expresión génica en el grupo nefrótico que recibió dieta de caseína es la HMG-CoA reductasa y la que aumenta en el grupo nefrótico con dieta de soya es la HMG-CoA sintasa, lo cual se observa también en el SNA. Sin embargo, se sabe que la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol es la HMG-CoA reductasa que además tiene otra forma de regulación sobre la proteína ya traducida como es el de fosforilación-defosforilación, la cual regula la actividad de esta enzima. Cabe mencionar que según Vaziri y Liang (1995) en el SN experimental inducido con ANP hay un aumento durante los primeros días después de la inyección del nefrotóxico tanto de la transcripción como de la actividad de la HMG-CoA reductasa, pero después de algún tiempo tanto el ARNm como la actividad de esta enzima vuelven a la normalidad, por lo que estos autores concluyen que los altos valores de colesterol en el SN experimental logran mantenerse con la síntesis normal de colesterol después de un aumento inicial de su concentración. No obstante, la biosíntesis de colesterol hepática ha sido evaluada en el SN experimental y los resultados han sido contradictorios, pues se ha reportado que aumenta (Golper *et al.*, 1986), que disminuye (Dubach *et al.*, 1961, en Vaziri y Liang, 1995) o bien que permanece igual que en condiciones normales (Byers *et al.*,

1954 en Vaziri y Liang, 1995). Asimismo se ha reportado que la actividad de la HMG CoA reductasa en el modelo de ANP es normal (Thabet *et al.*, 1993) por lo que muchos autores creen que la hipercolesteronemia posiblemente no depende tanto del aumento en la síntesis de colesterol, sino del bajo catabolismo de las lipoproteínas (Davies *et al.*, 1990; Furukawa *et al.*, 1990; Marshal, *et al.*, 1990; Warwick *et al.*, 1990; Kaysen *et al.*, 1995; Shearer *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha reportado que hay una secreción normal de ácidos biliares en el SN inducido con ANP así como una actividad normal de la colesterol 7 alfa hidroxilasa, enzima limitante en la producción de ácidos biliares (Thabet *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan entonces a pensar que o hay un menor catabolismo de las lipoproteínas y esto hace que se mantengan los niveles de colesterol y triglicéridos altos en suero en el SN, o bien, la estabilidad del ARNm de estas enzimas es mayor por algún mecanismo no conocido. Se conoce también que en el SN la composición de las lipoproteínas está alterada, pues hay un aumento en la relación colesterol/ triglicéridos en las lipoproteínas que contienen apo B, y las concentraciones de colesterol incrementan también con respecto a las de proteína, lo cual describe una falla en su catabolismo (Gherardi *et al.*, 1977; Muls *et al.*, 1985). Asimismo se ha reportado que en el modelo de SN con ANP hay una disminución de la lipasa hepática (HL) que es una enzima ubicada en los hepatocitos y en las células endoteliales hepáticas que es capaz de hidrolizar los triglicéridos de las IDL y de los quilomicrones remanentes, lo cual sería otra de las razones de la hipercolesteronemia y de la hipertriglicerinemia en este modelo experimental (Liang y Vaziri, 1997a). También se ha reportado una disminución de la lipoprotein lipasa en este modelo (Furukawa *et al.*, 1990; Shearer *et al.*, 2001) así como una disminución en el receptor de HDL que forma parte del sistema de transporte reverso del colesterol, lo cual podría también contribuir a los altos valores de colesterol en el SN (Liang y Vaziri, 1999). Se ha reportado también una

disminución en los receptores VLDL en este modelo de SN experimental con ANP (Liang y Vaziri, 1997b). En el SN además hay una menor maduración de las HDL porque hay una disminución en la enzima LCAT (lecitin:colesterol aciltransferasa) implicada también en el transporte reverso del colesterol (Sestak *et al.*, 1989).

Los resultados de los ensayos de Northern Blot del SNC y del SNA para las enzimas de la biosíntesis de lípidos indican que existe una menor expresión génica de estas en los grupos control que recibieron dieta de soya con respecto a los grupos control que recibieron dieta con caseína, lo cual ya había sido observado por Iritani, *et al.* (1996). Esto puede deberse a que uno de los posibles mecanismos de la proteína de soya para bajar los niveles de triglicéridos es que exista una relación insulina/ glucagon menor que la provocada por la caseína (McCarty, 1999; Lavigne *et al.*, 2000) y por lo tanto que haya una menor estimulación de la proteína SREBP-1, lo cual de hecho se observó en estos experimentos, y de este modo no haya una expresión considerable de las enzimas de esta ruta biosintética. Se sabe que los aminoácidos esenciales son relativamente mas efectivos para la liberación de insulina que los aminoácidos no esenciales; particularmente la arginina y los precursores del piruvato liberan preferencialmente glucagon. En general, las dietas vegetarianas tienden a contener una mayor cantidad de aminoácidos no esenciales que las dietas de proteína animal, por lo que es razonable pensar que una dieta vegetariana promueve la actividad del glucagon (Sugano *et al.*, 1984; Kurowska y Carroll, 1992). Por el contrario la caseína proporciona una menor cantidad de aminoácidos no esenciales, siendo notablemente baja en arginina y en glicina que son excelentes secretogogos de glucagon. Se ha comprobado que adicionar estos aminoácidos a una dieta basada en caseína incrementa la actividad de glucagon hepático lo que se traduce en una reducción en la lipogénesis de novo, decrementando las reservas de grasa en los animales, así como una reducción en la síntesis de colesterol y del colesterol circulante (McCarty, 1995). Se ha identificado

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

que las subunidades ácidas A₁ y A₂ del extremo amino-terminal de la glicinina de la soya tienen gran afinidad por los ácidos biliares y de esta manera regulan la actividad de la insulina (Minami *et al.*, 1990).

Al igual que en el caso de las enzimas de la biosíntesis de colesterol, la expresión de las enzimas de la biosíntesis de lípidos no aumentó en los grupos con SNC sino que se encontró aproximadamente a los mismos niveles que la observada en el grupo control con dieta de soya. Esto tal vez podría explicarse porque la pérdida de proteínas a través de la orina incluye también a la insulina que es el activador de la expresión de SREBP-1, lo que a su vez reduce la expresión de enzimas lipogénicas.

En el SNA se observó que la expresión de la sintasa de ácidos grasos disminuyó en las ratas nefróticas alimentadas con caseína con respecto a su control, mientras que los grupos de soya con y sin Síndrome Nefrotico permanecieron sin cambio. Sin embargo, la SREBP-1 aumentó en ambos grupos con Síndrome Nefrótico; es posible que a corto plazo la SREBP-1 trate de estimular la síntesis de las enzimas de la ruta biosintética de los lípidos y posteriormente la degradación de las lipoproteínas sea la que mantenga altos los niveles de triglicéridos en sangre de los animales nefróticos.

Cabe mencionar que los niveles elevados de lípidos en suero que se presentan en el Síndrome Nefrótico contribuyen a aumentar los daños que sufre el riñón. Los factores que contribuyen al daño renal por parte del aumento en los lípidos son: una depositación de lipoproteínas en los glomérulos y en los túbulos intersticiales, la oxidación de las LDL, la citotoxicidad inducida por las lipoproteínas, así como un aumento en la producción de citocinas (Wheeler *et al.*, 1994). Se ha comprobado que la reducción en los niveles de lípidos plasmáticos hace mas lento el progreso del daño glomerular y tubulointersticial en el SN en animales y en humanos (Keane *et*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

al., 1991 y 1992), por lo que una dieta basada en proteína de soya es altamente benéfica en el tratamiento de este padecimiento.

Con respecto a los resultados de los ensayos de **Inmunoblot** para la detección de la forma madura nuclear de **SREBP-1** se observó el mismo comportamiento que el encontrado con los niveles de su ARNm. El consumo de la dieta de soya en las ratas controles reduce la concentración de este factor transcripcional en el núcleo de hepatocitos con respecto a los controles alimentados con caseína. Sin embargo se encontró que su presencia es mayor en animales con **SNC** comparándolos con sus respectivos grupos control. Posiblemente la estabilidad de esta proteína aumente en el **SNC** ya que los niveles de su ARNm no siguen el mismo comportamiento. Se ha demostrado que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados disminuye la estabilidad de la proteína **SREBP-1**, lo que demuestra que puede existir una regulación postraduccional de la proteína (Xu *et al.*, 2001). En el caso del **SNA** pudo observarse que la soya aún a un plazo de tiempo corto disminuye la expresión de **SREBP-1**. Sin embargo a diferencia del **SNC**, la cantidad de esta proteína en los grupos con **SNA** es menor que sus respectivos grupos control aunque no se muestra una respuesta paralela con los niveles de ARNm. Posiblemente, la velocidad de degradación de la forma madura de la **SREBP-1** sea elevada en los primeros días del Síndrome. Esto requiere investigación adicional.

En lo referente a la **SREBP-2** se observó que la soya promovió que hubiera una mayor concentración de la forma madura de este factor transcripcional, lo cual se vio reflejado en una mayor expresión génica de sus enzimas blanco. Asimismo el grupo con **SNC** alimentado con caseína presentó una menor proporción de esta proteína que su respectivo grupo control. Por otro lado, no hubo diferencia entre los alimentados con soya con y sin **SNC**. El grupo con **SNC** alimentado con dieta de soya mostró concentraciones mucho más altas comparándolas con el grupo con **SNC** que se alimentó con caseína, lo cual concuerda con los cambios observados

con el ARNm de la HMG-CoA sintasa. Sin embargo, no se muestra un paralelismo con la expresión del ARNm de la HMG-CoA reductasa y el receptor de LDL. La expresión de la HMG-CoA reductasa y del receptor LDL está controlada principalmente por la SREBP-2 aunque la tasa final de transcripción del receptor LDL y de la HMG-CoA reductasa depende de un grupo diferente de factores corregulatoios. Se ha mostrado que el promotor del receptor LDL requiere SREBP-2 y Sp1 (Specific protein 1), mientras que el promotor de la HMG-CoA reductasa requiere SREBP-2, NF-Y (Nuclear Factor Y) y CREBP (cAMP Response Element Binding Protein) (Bennet y Osborne, 2000). La regulación de estos otros factores transcripcionales puede explicar la diferencia de expresión de ambos genes en las ratas nefróticas alimentadas con caseína con respecto a las de soya. Estos resultados apoyan la evidencia de que durante el SNC existe una baja actividad del receptor LDL. Además también explica en parte que el incremento de la HMG-CoA reductasa se asocie con un aumento en la tasa de biosíntesis de colesterol como ha sido observado por algunos investigadores.

En cuanto a la proteína SREBP-2 en el experimento del SNA se observó que las ratas nefróticas alimentadas con caseína o soya, presentaron una disminución de la forma madura de la SREBP-2 con respecto a sus controles. Sin embargo, las ratas controles alimentadas con soya tuvieron una mayor concentración de este factor transcripcional en el núcleo de los hepatocitos, que aquellas alimentadas con caseína. Estos resultados concuerdan con la expresión de la HMG-CoA sintasa que es dependiente de SREBP-2.

En síntesis, estos resultados muestran que la proteína de soya ejerce un efecto benéfico en los parámetros bioquímicos de los animales que tienen Síndrome Nefrótico, en particular aquellos con SNC. Los mecanismos a través de los cuales la proteína de soya disminuye las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos es diferente. Aunque los factores transcripcionales SREBP-1 y SREBP-

2 están involucrados en estos mecanismos, la expresión de genes, en especial del metabolismo de colesterol están controlados también por otros factores de transcripción, lo que no permite en varios casos que exista una asociación directa entre los niveles de la forma madura de SREBP-2 con las concentraciones de los ARNm de genes involucrados en la síntesis de colesterol. En el caso de las enzimas lipogénicas la respuesta parece estar de una manera mas directa asociada con la SREBP-1, y esta a su vez posiblemente regulada por el nivel de insulina. Estos estudios están iniciando la elucidación del mecanismo por medio del cual la proteína de soya regula la concentración de lípidos en el organismo. Es importante reconocer que en meses recientes han aparecido otros factores transcripcionales que son de gran importancia, en especial para el control del metabolismo de colesterol los cuales pertenecen a la familia de los receptores huérfanos como es el LXR (Liver X Receptor) (DeBose-Boyd *et al.*, 2001). Esto muestra la complejidad de la regulación del metabolismo de lípidos en el organismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. CONCLUSIONES

A) A partir de los resultados derivados de este trabajo podemos concluir con respecto al efecto de la ingesta de proteína de soya sobre los niveles plasmáticos de colesterol y ácidos grasos que : una dieta basada en proteína de soya fue benéfica para decrementar los niveles plasmáticos de colesterol y ácidos grasos de los animales con Síndrome Nefrótico Crónico y Agudo.

B) En lo que se refiere a la expresión de algunos de los genes regulados por las proteínas SREBP's podemos concluir que a pesar de que no se observaron cambios en los lípidos plasmáticos de los grupos control, los resultados de los análisis de Northern Blot indican que la caseína y la soya regulan de manera diferente la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos, lo cual se observa también en los grupos con Síndrome Nefrótico Crónico y Agudo. Esto es, la caseína provoca que se sintetice una mayor cantidad de ácidos grasos con respecto a la soya, sin embargo, la soya promueve la biosíntesis de colesterol debido a que desciende los niveles plasmáticos de este lípido a cantidades que hacen necesaria su biosíntesis endógena.

C) En cuanto a los niveles de expresión de las proteínas SREBP's se concluye a partir de los análisis de Inmunoblot que una dieta basada en caseína y una dieta basada en proteína de soya, regulan de manera diferencial la biosíntesis de estos factores transcripcionales implicados en la expresión de varios de los genes de enzimas de las rutas de síntesis de colesterol y ácidos grasos, lo cual también se observa en el Síndrome Nefrótico Crónico y Agudo.

Es decir, la proteína de soya por su parte favorece la expresión de la proteína SREBP-2 implicada en la biosíntesis del colesterol, pues es necesario que el organismo sintetice este lípido de manera endógena por el efecto que la dieta basada en proteína de soya tiene sobre su concentración plasmática. Por otra parte, la proteína de soya disminuye los niveles de expresión de la proteína SREBP-1, implicada en la biosíntesis de ácidos grasos, que se encuentra elevada en el caso de la dieta basada en caseína.

Finalmente, desde el punto de vista aplicativo, el consumo de proteína de soya en humanos que tengan problemas relacionados con síndrome nefrótico, puede ser de gran beneficio, ya que este padecimiento está asociado a enfermedades con alta prevalencia como la diabetes o en algunas enfermedades de tipo autoinmune. Por lo tanto, su utilización en humanos debe considerarse como una opción dentro del tratamiento de este padecimiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

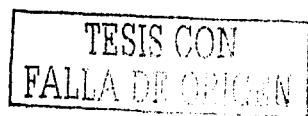
- A -

- Al-Bander, H. y Kaysen, G.A. (1991) Ineffectiveness of dietary protein augmentation in the management of the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 5: 482-486.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1990) *Biología Molecular de la célula*. Ed. Omega. España.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M. y Cook-Newell, M.E. (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333: 276-282.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L.Jr., Morgan, T.M. y Burke, G.L. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal Rhesus monkeys. *J Nutr* 126: 43-50.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B. y Williams, K. (1998) Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanism. *Am J Clin Nutr* 68 (Suppl): 1390S-1393S.

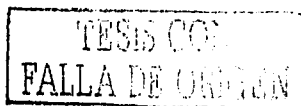
- B -

- Baum, A., Teng, H., Erdman, J.W., Weigel, R., Klein, B.P., Persky, V.W., Freels, S., Surya Bakhit, R.M., Ramos, E., Shay, N.F. y Potter, S.M. (1998) Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesteronemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68: 545-551.
- Bennet, M.K. y Osborne, T.F. (2000) Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding protein: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6340-6344.
- Boizard, M., LeLievre, X., Lemarchand, P., Fougelle, F., Ferré, P. y Dugail, I. (1998) Obesity-related overexpression of fatty acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* 273: 29164-29171.
- Brenner, T. y Sharif, E. (1980) Lipoprotein lipid and protein synthesis in experimental nephrosis and plasmapheresis. II. Perfused rat liver. *Lipids* 15: 637-643.
- Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S y Goldstein, J.L. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 268: 14490-14496.
- Brown, M.S y Goldstein, J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.

- Brown, M.S y Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11041-11048.
- Byers, S.O., Friedman, M. y Rosenman, R.N. (1954) Hepatic synthesis of cholesterol in nephrotic rats. *Am J Physiol* 170: 327-330.
- C -
- Carroll, K.K. (1991) Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J Am Diet Assoc* 91: 820-827.
- Carroll, K.K., Giovanetti, P.M., Huff, M.W., Moase, O., Roberts, D.C.K. y Wolfe, B.M. (1978) Hypocholesterolemic effect of substituting soybean protein for animal protein in the diet of healthy young women. *Am J Clin Nutr* 31: 1312-1321.
- Cheng, D., Espenshade, P.J., Slaughter, C.A., Jaen, J.C., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1999) Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274: 22795-22804.
- Clarke, S.D. (2001) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 131: 1129-1132.
- Crouse, J.R.III, Morgan, T., Terry, J.G., Ellis, J., Vitolins, M. y Borke, G.L. (1999) 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* 159: 2070-2076.
- D -
- D'Amico, G. y Gentile, M.A. (1993) Influence of diet on lipid abnormalities in human renal disease. *Am J Kidney Dis* 22: 151-157.
- D'Amico, G., Gentile, M.G., Manna, G., Fellin, G., Ciceri, R., Cofano, F., Petrini, C., Lavarda, F., Perolini, S. y Porrini, M. (1992) Effect of vegetarian soy diet on hyperlipidaemia in nephrotic syndrome. *Lancet* 339: 1131-1134.
- D'Amico, G., Remuzzi, G., Maschio, G., Gentile, M.G., Gotti, E., Oldrizzi, L., Manna, G., Mecca, G., Ruggiu, C. y Fellin, G. (1991) Effect of dietary proteins and lipids in patients with membranous nephropathy and nephritic syndrome. *Clin Nephrol* 35: 237-242.
- Davies, R.W., Strapans, I. y Hutchinson, F.N. (1990) Proteinuria, not altered albumin metabolism, affects hyperlipidemia in the nephrotic rat. *J Clin Invest* 86: 600-605.



- Davis, R.A., Engelhorn, S.C., Weinstein, D.B. y Steinberg, D. (1980) Very low density lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. Inhibition by albumin and other macromolecules. *J Biol Chem* 255: 2039-2045.
- Davis, R.W., Staprans, I., Hutchinson, F.N. y Kaysen, G.A. (1990) Proteinuria, not altered albumin metabolism, affects hyperlipidemia in the nephritic rat. *J Clin Invest* 86: 600-605.
- DeBose-Boyd, R.A., Ou, J., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (2001) Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat heptoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1477-1482.
- Don, B.R., Kaysen, G.A., Hutchison, F.N. y Schambelan, M. (1991) The effect of angiotensin converting enzyme inhibition and dietary protein restriction in the treatment of proteinuria. *Am J Kidney Dis* 17: 10-17.
- Duane, W.C. (1999) Effects of soybean protein and very low dietary cholesterol on serum lipids, biliary lipids, and fecal sterol in humans. *Metabolism* 48: 489-494.
- Dubach, U., Recant, L., Hatch, E. y Koch, M.B. (1961) Negative feedback mechanism of cholesterol synthesis in experimental nephrosis. *Proc Soc Exp Biol USA* 106: 136-139.
- Dullaart, R.P.F., Gansevoort, R.T., Sluiter, W.J., de Zeeuw, D. y de Jong, P.E. (1996) The serum lathosterol to cholesterol ratio, an index of cholesterol synthesis, is not elevated in patients with glomerular proteinuria and is not associated with improvement of hyperlipidemia in response to antiproteinuric treatment. *Metabolism* 45: 723-730.
- Duncan, E. A., Brown, M.S., Goldstein, J.L. y Sakai, J. (1997) Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-ser bond in luminal loop of sterol regulatory element binding protein-2. *J Biol Chem* 272: 12778-12785.
- Duncan, E. A., Davé, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1998) Second site cleavage in sterol regulatory element binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem* 273: 17801-17809.
- Dwyer, J. (1993) Vegetarian diets for treating nephritic syndrome. *Nutr Rev* 51: 44-56.
- E -
- Eddy, A.A. y Schnaper, W. (1998) The Nephrotic Syndrome: from the simple to the complex. *Semin Nephrol* 18: 304-316.
- Erdman, J. Jr. Y Fordyce, E.F. (1989) Soy products and the human diet. *Am J Clin Nutr* 49: 725-737.



- Ericsson, J., Jackson, S.M., Lee, B.C. y Edwards, P.A. (1996) Sterol element binding protein binds to a cis element on the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA 93: 945-950.

- Espenshade, P.-J., Cheng, D., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1999) Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. J Biol Chem 274: 22795-22804.

- F -

- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M. y Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. Mol Cell Biol 19: 5495-5503.

- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. y Foufelle, F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. Proc Natl Acad Sci USA 96: 12737-12742.

- Forsythe, W.A. (1986) Comparison of dietary casein or soy protein effects on plasma lipids and hormone concentration in the Gerbil (*Mertiones unguiculatus*) J Nutr 116: 1165-1171.

- Fujisawa, K., Yagasaki, K. y Funabiki, R. (1995) Reduction of hyperlipidemia and proteinuria without growth retardation in nephritic rats by a methionine-supplemented low-soy protein diet. Am J Clin Nutr 61: 603-606.

- Furukawa, S., Hirano, T., Mamo, J.C. (1990) Catabolic defect of triglyceride is associated with abnormal very low-density lipoprotein in experimental nephrosis. Metabolism 39: 101-107.

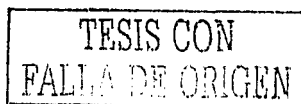
- G -

- Gasic, G.P. (1994) Basic-helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membrane-bound molecule. Cell 77: 17-19.

- Gaudette, D.C. y Holub, B.J. (1990) Effect of genistein, a tyrosine kinase inhibitor on U46619-induced phosphoinositide phosphorylation in human platelets. Biochem Biophys Res Commun 170:238-242.

- Gentile, M.G., Fellin, G., Cofano, F., Delle Fave, A., Manna, G., Ciceri, R., Petrini, C., Lavarda, F., Pozzi, F. y D'Amico, G. (1993) Treatment of proteinuric patients with a vegetarian soy diet and fish oil. Clin Nephrol 40: 315-320.

- Gherardi, E., Rota, E., Calandra, S., Genova, R. y Tamborino, A. (1997) Relationship among the concentrations of serum lipoproteins and changes in their chemical composition in patients with untreated nephrotic syndrome. Eur J Clin Invest 7: 563-570.



- Girard, J. (1998) The regulation of gene expression by nutrients. *Cur Opin Clin Nutr Metab Care* 1: 321-322.
- Goldberg, A.C.R.K., Oliveira, H.C.F., Quintao, E.C.R. y McNamara, D.J. (1982) Increased hepatic cholesterol production due to liver hypertrophy in rat experimental nephrosis. *Biochim Biophys Acta* 710: 71-75.
- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430.
- Golper, T.A., Feingold, K.R., Fulford, M.H. y Siperstein, M.D. (1986) The role of circulating mevalonate in nephrotic hypercholesterolemia in the rat. *J Lipid Res* 27: 1044-1051.
- Greaves, K.A., Parks, J.S., Williams, J.K. y Wagner, J.D. (1999) Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 129: 1585-1592.
- Grundy, M.S. y Abrams, J.J. (1983) Comparison of actions of soy protein and casein on metabolism of plasma lipoprotein and cholesterol in humans. *Am J Clin Nutr* 38: 245-252.
- Guan, G., Jiang, G., Koch, R.L. y Seechter, I. (1995) Molecular cloning and functional analysis of the promoter of the human squalene synthase gene. *J Biol Chem* 270: 21958-21965.
- II -
- Hannah, V.C., Ou, J., Loung, A., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (2001) *J Biol Chem* 276: 4365-4372.
- Harris, R. e Ismail, N. (1994) Extrarenal complications of nephritic syndrome. *Am J Kidney Dis* 23: 477-497.
- Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1998a) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in liver of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5987-5992.
- Horton, J.D., Shimomura, H., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. y Shimano, H. (1998b) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein. *J Clin Invest* 101: 2331-2339.
- Horton, J.D., Shimano, H., Hamilton, R.L., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1999) Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmask hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest* 103: 1067-1076.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L. y Wang, X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11603-11607.

- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1995a) Hairpin orientation of sterol regulatory element binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem* 270: 29422-29427.

- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. y Hobbs, H.H. (1995b) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and localization of SREBP-1 and SREBP-2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25: 667-673.

- Hua, X., Nothurfft, A., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1996a) Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage activating protein (SCAP). *Cell* 87: 415-26.

- Hua, X., Sakai, J., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1996b) Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 271: 10379-10384.

- Huff, M.W. y Carroll, K.K. (1980) Effects of dietary protein on turn-over, oxidation and absorption of cholesterol and on steroid excretion in rabbits. *J Lipid Res* 21: 546-558.

- I -

- Iritani, N., Hosomi, H., Fukada, H., Tada, K. y Ikeda, H. (1996) Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr* 126: 380-388.

- K -

- Kaisen, A. (1994) Nonrenal complications of the nephrotic syndrome. *Annu Rev Med* 45: 201-210.

- Kawabe, Y., Suzuki, T., Hayashi, M., Hamakubo, T., Sato, R. y Kodama, T. (1999) The physiological role of sterol regulatory element binding protein-2 in cultured human cells. *Biochim Biophys Acta*. 1436: 307-318.

- Kaysen, G.A., Hoye, E. y Jones, H., Jr. (1995) Apolipoprotein A-I levels are increased in part as a consequence of reduced catabolism in nephrotic rats. *Am J Physiol* 268: F532-540.

- Keane, W.F., Kasike, B.L., O' Donnell, M.P. y Kim, Y. (1991) The role of altered lipid metabolism in the progression of renal disease: Experimental evidence. *Am J Kidney Dis* 17: 38-42.

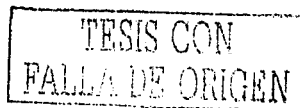
- Keane, W.F., St.Peter, J.V. y Kasike, B.L. (1992) Is the aggressive management of hyperlipidemia in nephrotic syndrome mandatory? *Kidney Int* 42: S134-141.

- Kim, J.B. y Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10: 1096-1107.



- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B. y Spiegelman, B.M. (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthase and leptin gene expression through ADD1/SREBP-1. *J Clin Invest* 101: 1-9.
- Kirk, E.A., Sutherland, P., Wang, S.A., Chait, A. y LeBoeuf, R.C. (1998) Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-959.
- Khosla, P., Samman, S., Carroll, K.K. (1991) Decreased receptor/mediated LDL catabolism in casein-fed rabbits precedes in the increase in plasma cholesterol levels. *J Nutr Biochem* 2: 203-209.
- Kontessis, P., Jones, S., Dodds, R., Trevisan, R., Nosadini, R., Fioreto, P., Borsato, M., Sacerdoti, D. y Viberti, R. (1990) Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kidney Int* 38: 136-144.
- Kumagai, H., Chun, K.T. y Sdimoni, R.D. (1995) Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of HMG-CoA reductase. *J Biol Chem* 270: 19107-19113.
- Kurowska, E.M. y Carroll, K.K. (1992) Effect of high levels of selected dietary essential aminoacid on hypercholesterolemia and down-regulation of hepatic LDL receptors in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1126: 192-199.

- L -
- Lavigne, C., Marette, A. y Jacques, H. (2000) Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278: E491-500.
- Liang, K. y Vaziri, N. (1997a) Down-regulation of hepatic lipase expression in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int* 51: 1933-1937.
- Liang, K. y Vaziri, N. (1997b) Acquired VLDL receptor deficiency in experimental nephrosis. *Kidney Int* 51: 1761-1765.
- Liang, K. y Vaziri, N. (1999) Down-regulation of hepatic high-density lipoprotein receptor SR-B1, in nephritic syndrome. *Kidney Int* 56: 621-626.
- López, J.M., Bennett, M.K., Sánchez, H.B., Rosenfeld, J.M. y Osborne, T.F. (1996) Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1049-1053.



- López, D. y McLean, M.P. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene. *Endocrinology* 140: 5669-5681.

- Lovati, M.R., Manzaoni, C. y Canavesi, A. (1987) Soybean protein diet increases low-density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. *J Clin Invest* 80: 1498-1502.

- M -

- Madani, S., López, S., Blond, J.P., Prost, J. y Belleville, J. (1998) Highly purified soybean protein is not hypocholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Nutr* 128: 1084-1091.

- Magaña, M.M., Koo, S.H., Towle, H.C. y Osborne, T.F. (2000) Different sterol regulatory element binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem* 275: 4726-4733.

- Magaña, M.M. y Osborne, T.F. (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem* 271: 32689-32694.

- Marshal, J.F., Apostolopoulos, J.J., Brack, L.M. y Howlett, C.J. (1990) Regulation of apolipoprotein gene expression and plasma high density lipoprotein composition in experimental nephrosis. *Biochim Biophys Acta* 1042: 271-279.

-McCarty, (1999) Vegan proteins may reduce risk of cancer, obesity, and cardiovascular disease by promoting increased glucagons activity. *Med Hypotheses* 53:459-485.

- Minami, K., Moriyama, R., Kitagawa, Y. Y Makino, S. (1990) Identification of soybean protein components that modulate the actino of insulin *in vitro*. *Agric Biol Chem* 54: 511-517.

- Moldes, M., Boizard, M., LeLievre, X., Féve, B., Dugail, I. y Pairault, J. (1999) Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor 1/SREBP-1c (ADD1/SREBP-1c) trans-factors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *Biochem J* 344: 873-880.

- Morita, T., Oh-hashii, A., Takei, K., Ikai, M., Kasaoka, S. y Kiriyaama, S. (1997) Cholesterol-lowering effects of soy-bean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *J Nutr* 127: 470-477.

- Muls, E., Rosseneu, M., Daneels, R., Schurgers, M. y Boelaert, J. (1985) Lipoprotein distribution and composition in the human nephritic syndrome. *Atherosclerosis* 54: 1933-1937.

- N -

- Nadasy, T., Silva, F. y Hogg, R. (1994) Minimal change nephrotic síndrome-focal sclerosis complex. En: *Renal pathology with clinical and functional correlations*. Ed. Lippincott Co., Philadelphia. 330-389.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Nagaoka, S., Awano, T., Nagata, N., Masaoka, M., Hori, G. y Hashimoto, K. (1997) Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in CaCo-2 cells by a soy protein peptic hydrolyzate. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 354-356.
- Nagaoka, S., Kanamaru, Y., Kuzuya, Y., Kojima, T. y Kuwata, T. (1992) Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1484-1485.
- Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G. y Yamamoto, K. (1999) Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and CaCo-2 cells. *J Nutr* 129: 1725-1730.
- Nagata, Y., Ishiwaki, M. y Sugano, M. (1982) Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. *J Nutr* 112: 1614-1625.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisu, N. y Shimizu, H. (1998) Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in japanese men and woman. *J Nutr* 128: 209-213.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. y Smith, T.F. (1994) The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300.
- Newmark, S., Anderson, C., Donadio, J. y Ellefson, R. (1975) Lipoprotein profiles in adult nephrotics. *Mayo Clin Proc* 50: 359-364.
- Nohturfft, A., Hua, X., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1996) Recurrent G to A substitution in a single codon of SREBP cleavage activating protein causes sterol resistance in three mutant Chinese hamster ovary cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13709-13714.
- Nohturfft, A., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1998) Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 12848-12853.
- Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R.A., Scheek, S., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1999) Sterol regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11235-40.
- O -
- Oda, H., Fukui, H., Hitomi, Y. y Yoshida, A. (1991) Alteration of serum lipoprotein metabolism by polychlorinated biphenyls and methionine in rats fed soybean protein diet. *J Nutr* 212: 925-933.
- Olmer, M., Pain, C., Dussol, B. y Berland, Y. (1989) Protein diet and nephrotic syndrome. *Kidney Int* 36, Suppl 27: S152-S153.

- Orth, S.R. y Ritz, E. (1998) The Nephrotic Syndrome. *N Engl J Med* 338 : 1202-11.

- P -

- Pai, J., Gurney, O., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1998) Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem* 273: 26138-26148.

- Potter, S.M. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr* 125: 606-611S.

- Potter, S.M., Pertile, J. y Berber-Jiménez, D. (1996) Soy protein concentration and isolated soy protein similar lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr*: 2007-2011.

- Powell, E.E. y Kroon, P.A. (1994) Low density lipoprotein receptor and 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leucocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J Clin Invest* 93: 2168-2174.

- R -

- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.G., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1997) Complementation cloning of *S2P*, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell*: 47-57.

- Rawson, R.B., Cheng, D., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1998) Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese Hamster Ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding protein at site 1. *J Biol Chem* 273: 28261-28269.

- S -

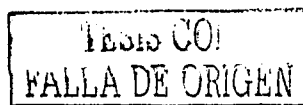
- Sacks, F.M., Breslow, J.L., Wood, P.G. y Kass, E.H. (1983) Lack of an effect of dietary protein (casein) and soy protein on plasma cholesterol of strict vegetarians. An experimental and a critical review. *J Lipid Res* 24: 1012-1020.

- Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85: 1037-1046.

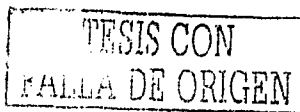
- Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 2: 505-514.

- Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1994) Assignment of the membrane attachment, DNA binding and transcriptional activation domains of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem* 269: 17267-17273.

- Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., Terada, T., Imanaka, T. y Maeda, M. (1999) Sterol regulatory element binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 274: 24714-24720.
- Sestak, T.L., Alavi, N., Subbaiah, P.V. (1989) Plasma lipids and acyltransferase activities in experimental in experimental nephritic syndrome. *Kidney Int.* 36: 240-248.
- Shearer, G.C., Stevenson, F.T., Atkinson, D. N., Hardin Jones, Jr., Staprans, I. Y Kaysen, G.A. (2001) Hypoalbuminemia and proteinuria contribute separately to reduced lipoprotein catabolism in the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 59: 179-189.
- Sheng, E., Otani, H., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1995) Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:935-938.
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1996) Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 7: 1575-1584.
- Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1997a) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 99: 846-854.
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R., Hero, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. y Horton, J.D. (1997b) Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest.* 100: 2115-2124.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1997a) Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12354-12359.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1997b) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99: 838-845.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B., Bashmakov, Y. y Horton, J. (1998) Nuclear sterol regulatory element binding proteins active genes responsible for the entire programs of upregulated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem* 273: 35229-35306.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Horton, J.D. (1999a) Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty fibres in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274: 30028-32.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1999b) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in livers of rats with streptozocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13656-61.



- Sirtori, C.R., Lovati, M.R., Manzoni, C., Monetti, M., Pazzucconi, F. y Gatti, E. (1995) Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J Nutr* 125: 5985-6055.
- Small, D.M. y Shipley, G.G. (1974) Physical-chemical basis of lipid deposition in atherosclerosis. *Science* 185: 222-229.
- Smil, V. (2000) Magic beans. *Nature* 407: 567.
- Spady, D.K., Woollett, L.A. y Dietschy, J.M. (1993) Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. *Annu Rev Nutr* 13: 355-381.
- Sugano, M., Ishiwaki, N., Nagata, Y. y Imaizumi, K. (1982) Effects of arginine and lysine addition to casein and soybean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagons in rats. *Br J Nutr* 48: 211-221.
- Sugano, M., Ishiwaki, N. y Nakashima, K. (1984) Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. *Annu Nutr Metab* 28: 192-199.
- Sugiyama, K., Kanamori, H. y Tanaka, S. (1993) Correlation of the plasma cholesterol-lowering effect of dietary glycine with the alteration of hepatic phospholipid composition in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1461-1465.
- Sun, X., Jones, H., Joles, J.A., Van Tol, A. y Kaysen, G.A. (1992) Apolipoprotein gene expression in analbuminemic rats and in rats with Heymann nephritis. *Am J Physiol* 262: F755-F761.
- **T**
- Thabet, M.A.E.H., Challa, A., Chanj, L.M., Paudak, W.H., Heuman, D.M. y Vlahcevic, Z.R. (1993) Studies of the alteration of hepatic cholesterol metabolism in puromycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Kidney Int* 44: 789-794.
- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A. y Spiegelman, B.M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13: 4753-4759.
- Torres, N., Bourges, H. y Tovar, A.R. (1996) Regulación de la expresión génica por nutrientes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 46: 89-96.
- Torres, N., Ascencio, C. y Tovar, A. (2000) Effect of protein quality on hepatic histidase expression in rats. *FASEB J* 746: 520-521.
- Tovar-Palacio, C., Potter, S., Hafermann, J.C. y Shay, N.F. (1998) Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils. *J Nutr* 128: 839-842.



- V -

- Van Raaij, J.M.A., Katan, M.B., Hautvast, J.G.A.J. y Hermus, R.J.J. (1981) Effects of casein versus soy protein diets on serum cholesterol and lipoprotein in young healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 34: 1261-1271.

- Vaziri, N.D. y Liang, K.H. (1995) HMG-CoA reductase gene expression during the course of puromycin-induced nephrosis. *Kidney Int* 48: 1979-85.

- Vaziri, N.D. y Liang, K.H. (1996) Down-regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis. *Kidney Int* 50: 887-893.

- Vega, G.L., Toto, R.D. y Grundy, S.M. (1995) Metabolism of low density lipoproteins in nephritic dyslipidemia: comparison of hypercholesterolemia alone and combined hyperlipidemia. *Kidney Int* 47: 579-86.

- Viberti, G.C., Bognetti, E., Wiseman, M.J., Dodds, R., Gross, J.L. y Keen, H. (1987) Effect of protein-restricted diet on renal response to meat meal in humans. *Am J Physiol* 253: F388-393.

- W -

- Wagner, J.D., Cefalu, W.T., Anthony, M.S., Litwak, K.W., Zhang, L. y Clarkson, T.B. (1997) Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factor and decrease aortic cholesteryl ester content in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Metabolism* 46: 698-705.

- Walser, M., Hill, S. y Tomalis, E. (1996) Treatment of nephrotic adults with supplemented, very low-protein diet. *Am J Kidney Dis* 28: 354-364.

- Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of LDL receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 268: 14497-14504.

- Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X. y Goldstein, J.L. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77: 53-62.

- Warwick, G.L., Caslake, M.J., Boulton-Jones, J.M., Dagen, M., Packard, C.J. y Shepherd, J. (1990) Low density lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Metabolism* 39: 187-192.

- Wheeler, D.C. y Bernard, D.B. (1994) Lipid abnormalities in the nephritic syndrome: causes, consequences and treatment. *Am J Kidney Dis* 23(3): 331-346.

- Williams, A.J. y Walls, J. (1987) Metabolic consequences of differing protein diets in experimental renal disease. *Eur J Clin Invest* 17: 117-122.

-Wong, W.W., O'Brian Smith, Stuff, J.E., Hachey, D.L., Heird, W.C. y Pownell, H.J. (1998) Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesteronemic and hypercholesteronemic men. *Am J Clin Nutr* 1385S-1389S.

- X -

- Xu, J., Teran-García, M., Park, J.H., Nakamura, M.T. y Clarke, S.D. (2001) Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein -1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem* 276: 9800-9807.

- Y -

- Yang, T., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (2000) Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterol from inhibiting SCAP-SREBP exit from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275: 29881-6.

- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (2000) ER Stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6:1355-1364.

- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1993) SREBP-1, a basic helix-loop-helix leucine zipper protein that controls transcription of the LDL receptor gene. *Cell* 75: 187-197.

- Z -

- Zelenski, N.G., Rawson, R.B., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1999) Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element binding proteins. *J Biol Chem* 274: 21973-21980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN