

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PPAR- γ , SREBPI, FAS, CYP7 Y
ABCA1 POR LA PROTEÍNA DE LA SOYA EN RATAS ZUCKER (fa/fa)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

Q.F.B. ANA LUCRECIA ELÍAS LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

México., D.F.

ENERO DE 2005



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ.
DIRECTOR GENERAL DE LA
ADMINISTRACIÓN ESCOLAR.
P R E S E N T E.-**

Me permito informar a Usted, que de acuerdo a los Artículos 19 y 20, Capítulo IV del Reglamento General de Exámenes, he leído en calidad de Sinodal, el trabajo de tesis que como prueba escrita presenta el (la) sustentante **C. GUILLERMO JR. CÁRDENAS SALGADO**, bajo el siguiente título: **"MÉXICO: CONFORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS GRUPOS FINANCIEROS, 1992-2003"** en tal virtud, considero que dicho trabajo reúne los requisitos para su réplica en examen profesional.

A t e n t a m e n t e

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Roberto Soto Esquivel'.

MTRO. ROBERTO SOTO ESQUIVEL.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

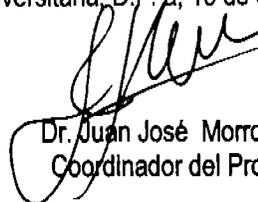
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Elías López Ana Lucrecia** con número de cuenta **501093604**, con la tesis titulada: **"Regulación de la expresión génica de PPAR γ , SREBP-1, FAS, CYP7 y ABCA1 por la proteína de la soya en ratas Zucker (fa/fa)"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Nimbe Torres y Torres**.

Presidente:	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Vocal:	Dra. María Cristina Fernández Mejía
Secretario:	Dra. Nimbe Torres Torres
Suplente:	Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas
Suplente:	Dr. Alberto Tovar Palacio

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 13 de diciembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo de investigación se realizó en el área de Nutriología Molecular del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la asesoría de: Dra. Nimbe Torres y Torres, Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía, Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias al financiamiento otorgado por CONACYT-Onmilife 2002 No.0050 y por la Asociación Americana de la Soya

Aquí y ahora lucho, me esfuerzo, insisto, me niego a que me arrolle la marea y estoy dispuesta a ser como una fortaleza...

ALEL

DEDICATORIA

Principalmente a mis padres con todo mi amor, respeto y admiración, el Dr. Abraham Elías Ventura y la Maestra Ma. Elizabeth López Mathew, cuyo ejemplo de lucha tenaz ha servido para mostrarme el camino hacia la realización de mis metas.

A mis cuatro mosqueteros:

Dr. Josué Isaac Elías López, por tu gran ejemplo de bondad, honestidad y amor por los tuyos

Maestro Abraham Elías López, porque con tu gran encanto, ternura y sensibilidad me has alentado para seguir adelante

Arq. Pablo David Elías López, porque con tus divertidos e ingeniosos consejos y tu amistad a toda prueba me has enseñado a confiar en la vida

Dr. Daniel Benjamín Elías López, porque tu compañía cerca y lejos me ha servido para sobrellevar los avatares de la vida

A ti, Oscar por ser mi compañero, amigo, esposo.....mi amor

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nimbe Torres y Torres por su valiosa asesoría y ejemplo de trabajo y dedicación

Al Dr. Armando Tovar, por su apoyo

A la Dra. Claudia Sánchez Castillo, con gran cariño, respeto y admiración, por ser mi guía hacia la luz

A la Dra. Claudia Ascencio, gracias a su ejemplo de profesionalismo y humanidad

Al Dr. Octavio Villanueva, gracias por la compañía y charla enriquecedoras del espíritu

A Euclides, mi querido y fiel amigo, gracias por compartir conmigo tu gran corazón

A mis queridísimos amigos Siraam Cabrera y Tere Guerra, gracias por mostrarme el lado bello y divertido de la ciencia

A mis compañeros del laboratorio de Nutriología Molecular: Iván, Víctor, Caro, Lety, Gaby y Adriana, por los momentos que compartimos

A Gris, gracias por tu apoyo eficiente y oportuno

Al Laboratorio de Nutriología Molecular del INCMNSZ, por todas las enseñanzas brindadas

INDICE

	pagina
1. Introducción.....	1
1.1 El frijol de soya	1
1.1.2 Contenido en nutrimentos del frijol de soya.....	1
1.1.3 Evaluación de la calidad de la proteína del frijol de soya.....	2
1.1.4 La proteína de la soya y sus efectos benéficos sobre las concentraciones de colesterol plasmático	4
1.1.5 Efecto hipocolesterolémico de la proteína de la soya: Mecanismos propuestos	4
1.1.6 Soya y enfermedades crónico-degenerativas	5
1.2 Diabetes tipo 2.....	6
1.2.1 Potencial diabetogénico de la obesidad	6
1.3 Factores transcripcionales y proteínas asociadas con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.....	8
1.3.1 PPAR- γ	8
1.3.2 SREBP-1.....	9
1.3.3 FAS	11
1.3.4 CYP7.....	12
1.3.5 ABCA1	12
2. Antecedentes del grupo de trabajo.....	14
3. Justificación y Planteamiento del problema.....	15
4. Hipótesis	17
5. Objetivo General	18
5.1 Objetivos Específicos.....	18
6. Metodología.....	19
6.1. Diagrama de bloques	19
6.2. Material y Métodos	20
6.2.1 Animales.....	20
6.2.2.1 La rata Zucker diabética obesa (ZDF) (fa/fa) como modelo de estudio de la Diabetes tipo 2	20

6.2.2.2 Características fenotípicas de la rata ZDF macho	21
6.2.2.3 Genética	21
6.2.2.4 Anormalidades pancreáticas.....	21
6.2.2.5 Transporte de glucosa.....	21
6.2.2.6 Secreción de insulina.....	22
6.3 Diseño del Estudio.....	22
6.3.1 Tratamientos	22
6.3.2. Tipo de estudio	22
6.3.3 Consideraciones éticas	22
6.4 Dietas.....	22
6.5 Determinación de peso corporal.....	24
6.6 Determinación del consumo de alimento	24
6.7 Obtención del tejido.....	24
6.8 Obtención y procesamiento de muestras de sangre y orina.....	24
6.9 Determinación de parámetros bioquímicos: Glucosa, colesterol y triacilglicéridos	24
6.10 Extracción de lípidos de tejido hepático.....	24
6.11 Determinación de proteínas totales	25
6.12 Determinación de creatinina y depuración de creatinina	25
6.13 Determinación de insulina	25
6.14 Extracción de RNA total.....	25
6.15 Cuantificación de RNA total.....	26
6.16 Electroforesis de RNA.....	26
6.17 Northern blot.....	26
6.17.1 Preparación de sondas de DNA.....	26
6.17.2 Hibridación del RNA con la sonda.....	28
6.18 Análisis Estadístico.....	29
7. Resultados	30
7.1 Consumo de alimento.....	30
7.2 Aumento en peso	31
7.3 Concentración de glucosa en suero.....	32

7.4	Concentración de colesterol en suero	32
7.5	Concentración de triacilgliceroles en suero	33
7.6	Concentración de insulina en suero.....	34
7.7	Concentración de proteínas en orina	35
7.8	Depuración de creatinina	36
7.9	Análisis histológico en tejido renal de ratas Zucker (fa/fa)	38
7.10	Concentración de colesterol en tejido hepático de ratas Zucker (fa/fa).....	38
7.11	Concentración de triacilgliceroles en tejido hepático de ratas Zucker (fa/fa).....	39
7.12	Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos	41
7.12.1	Hígado	41
7.12.1.1	SREBP-1	41
7.12.1.2	FAS	43
7.12.1.3	CYP7.....	45
7.12.1.4	ABCA1	47
7.12.2	Tejido adiposo	49
7.12.2.1	SREBP-1	49
7.12.2.2	PPAR γ	51
7.12.3.	Músculo	52
7.12.3.1.	SREBP-1	52
7.	Discusión.....	53
8.	Conclusiones.....	59
9.	Bibliografía	60
	Anexo I	68
	Anexo II.....	69
	Anexo III	70
	Anexo IV	71
	Anexo V.....	72
	Anexo VI	73
	Anexo VII.....	75
	Anexo VIII.....	76

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta del frijol de soya.....	1
Figura 2. Potencial diabetogénico de la obesidad.....	7
Figura 3. Mecanismos de regulación transcripcional por PPAR- γ	9
Figura 4. Mecanismo de acción de las SREBP's	10
Figura 5. Mecanismo de acción del transportador ABCA1	20
Figura 7 Consumo de alimento en ratas obesas	30
Figura 8. Aumento de peso en ratas obesas	31
Figura 9. Glucosa en suero de ratas obesas.....	32
Figura 10. Colesterol en suero de ratas obesas	33
Figura 11. Triacilgliceroles en suero de ratas obesas.....	34
Figura 12. Insulina en suero de ratas obesas	35
Figura 13. Proteínas en orina de ratas obesas	36
Figura 14. Depuración de creatinina de ratas obesas.....	37
Figura 15. Análisis histológico de riñón de ratas obesas	38
Figura 16. Contenido de colesterol en hígado de ratas obesas.....	39
Figura 17. Contenido de triacilgliceroles en hígado de ratas delgadas	40
Figura 18. Northern blot de SREBP- 1 en hígado y densitometría	42
Figura 19. Northern blot de FAS en hígado y densitometría	44
Figura 20. Northern blot de CYP7 en hígado y densitometría	46
Figura 21 Northern blot de ABCA1 en hígado y densitometría	48
Figura 22 Northern blot de SREBP-1 en tejido adiposo y densitometría	50
Figura 23. Northern blot de PPAR γ tejido adiposo y densitometría	51
Figura 24 Northern blot de SREBP-1 en músculo y densitometría.....	52

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Contenido de nutrimentos del frijol de soya.....	2
Tabla 2. Composición en aminoácidos de la proteína de soya.....	3
Tabla 3. Estadios de desarrollo de la obesidad y diabetes en la rata ZDF	20
Tabla 4. Contenido en nutrimentos de las dietas	23
Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados	29

RESUMEN

La homeostasis del metabolismo de lípidos se mantiene por una interacción entre diferentes proteínas y factores de transcripción responsables de la adquisición y eliminación de colesterol así como de la síntesis y oxidación de ácidos grasos. El objetivo de este trabajo fue elucidar el mecanismo por el cual la proteína de la soya tiene un efecto hipolipemiante. Para lo cual se estudiaron diferentes genes que participan en el metabolismo de lípidos en órganos que están involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina como son el hígado, el tejido adiposo y el músculo, en el modelo de rata obesa y diabética Zucker (fa/fa). **Materiales y Métodos.** Se estudiaron 80 ratas Zucker (fa/fa) de 4-5 semanas de edad, se dividieron aleatoriamente en dos grupos alimentados con 1) caseína al 20% y 2) soya al 20% por 160 días. Cada tercer día se les determinó la ganancia de peso y consumo de alimento. Cada 30 días se sacrificaron 6 ratas de cada grupo para determinar insulina (INS), colesterol (COL), triacilglicérolos (TG) y glucosa en suero, proteínas totales en orina, depuración de creatinina, COL y TG en hígado, expresión génica de SREBP-1, FAS, CYP7 y ABCA1 en hígado; SREBP-1, PPAR γ en tejido adiposo y SREBP-1 en músculo. Finalmente, se realizó un análisis histológico de riñón. **Resultados.** El aumento de peso al final del estudio fue mayor en las ratas alimentadas con soya a pesar de que la ingesta de alimento fue similar en ambos grupos, esto debido a que el deterioro físico fue mayor en las ratas alimentadas con caseína que con las de soya. Los animales alimentados con soya presentaron una reducción significativa de las concentraciones de COL y TG en suero por un 68.8% y un 43.78% respectivamente, así como una disminución en la acumulación de estos lípidos en hígado por un 54.7% y 32.1% con respecto a los animales alimentados con caseína. La ingestión de proteína de soya redujo la proteinuria en un 28.16%. De manera interesante, se observó que la expresión génica de SREBP-1 y genes lipogénicos como FAS se vieron aumentados en las ratas alimentadas con caseína. CYP7 y ABCA1 fueron mayormente inducidos en los animales alimentados con caseína. PPAR γ responsable de la adipogénesis se vio mayormente expresado en los animales que consumieron caseína. **Conclusiones.** Los resultados muestran que el consumo de una dieta con 20% de proteína de soya ejerce un efecto benéfico (hipolipemiante) en el metabolismo de ácidos grasos y colesterol, y que este efecto hipolipemiante es mediado por diferentes mecanismos debido a la interacción de diferentes factores transcripcionales involucrados en la síntesis de ácidos grasos, en la captura de colesterol y en la síntesis de ácidos biliares. El consumo de soya en ratas obesas diabéticas por un lado reprime la expresión de SREBP-1 lo que disminuye a su vez la biosíntesis de ácidos grasos mediada por FAS, de esta manera se disminuyen las concentraciones de TG en hígado. Esto ocasiona una reducción en las concentraciones de COL y TG tanto en suero como en hígado disminuyendo la esteatosis hepática a pesar de la presencia de hiperinsulinemia en este modelo. Al disminuir la hipercolesterolemia disminuyen las enzimas responsables de la síntesis de ácidos biliares (CYP7) y del transporte reverso de colesterol (ABCA1). En el tejido adiposo el consumo de proteína de soya disminuye la expresión de SREBP-1 reprimiendo la lipogénesis. Finalmente, el efecto hipolipemiante de la proteína de soya se vio reflejado en una disminución de la glomerulosclerosis y depósito de proteína en los túbulos renales, mejorando la función renal como lo indica la depuración de creatinina.

ABSTRACT

Lipid metabolism homeostasis is kept by interaction between proteins and transcription factors involved in the acquirement and elimination of cholesterol and by synthesis and oxidation of fatty acids. The objective of this work was to comprehend the mechanism by which the soy protein has a hipolipemic effect. Different genes that participate in the lipid metabolism were studied in organs involved in the development of insulin resistance (liver, adipocytes and muscle) in the model of obese and diabetic rat (*fa/fa* Zucker). **Materials and Methods.** Eighty Zucker rats of 4 to 5 weeks of age were studied, they were randomly divided in two groups, one feed on 20% casein diet the other on soy protein diet for 160 days. Weight gain and food consumption was determined every third day. Seven rats of each group were sacrificed to determinate insulin (INS), cholesterol (CHL), triglicerides (TG) and serum glucose, urine total proteins, and creatinine clearance, CHL and TG in hepatic tissue, SREBP-1, FAS, CYP7 and ABCA1 genic expression in liver; SREBP-1, PPAR γ genic expression in fatty tissue and SREBP-1 in muscle. Finally, histologic of kidney was made. **Results.** The increase of weight gain at the end of the study was greater in the rats feed with soy protein although the food ingestion was similar in both groups, probably because the physical deterioration was greater in the rats fed on casein diet compared with those fed on soy protein. The animals fed on soy protein diet presented a significant reduction of the concentrations of CHL and TG in serum by 68.8% and 43.78% respectively, as well as a disminution in the accumulation of liver lipids by 54.7% and 32.1% with respect to the animals fed on casein diet. The protein ingestion of soy reduced proteinuria in 28.16%. Interesting, although this model develops hiperinsulinemia, it was observed that the genetic expression of SREBP-1 and lipogenic genes as FAS were increased in the rats fed on casein diet. CYP7 and ABCA1 mainly were induced in the animals fed on casein diet. PPAR γ was mainly expressed in the animals that consumed casein diet. **Conclusions.** The results show that the consumption of a diet with 20% of soy protein exerts a beneficial effect in the fatty acid metabolism and cholesterol, and that its hipolipemic effect is egerced by different mechanisms due to the interaction from different transcriptional factors involved in the fatty acid synthesis, the cholesterol capture and the biliary acid synthesis. The consumption of soy protein by diabetic obese rats represses the expression of SREBP-1 that diminishes the fatty acid biosynthesis by the FAS pathway; by this way the concentrations of TG in liver are diminished. This causes a reduction in the concentrations of CHL and TG in serum and liver diminishing the hepatic steatosis in spite of the presence of hiperinsulinemia in this model. Diminishing hypercholesterolemia decrease the synthesis of enzymes responsible for the biliary acid synthesis (CYP7) and the reverse transport cholesterol (ABCA1). In the fatty tissue the consumption of soy protein decrease the expression of SREBP-1 repressing the lipogenesis. Finally, the hipolipemic effect of soy protein was reflected in a diminished glomerulosclerosis and protein deposit in the kidney tubules, improving the renal function by the creatinine clearance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *El frijol de soya*

En China la palabra para soya es ta-tou, la cual significa “el grano más grande” (Messina, 1995), esto no es raro ya que por más de 1000 años la soya ha tenido dos papeles importantes en la cultura asiática: alimentario y medicinal. En contraste, en los países occidentales esta leguminosa ha tenido menor importancia en dichos aspectos, es decir, hasta hace pocos años (en los últimos 15 años) se le ha reconocido como un alimento de alta calidad. Debido a esto se han realizado numerosos estudios con el propósito de elucidar los mecanismos por los cuales ejerce sus propiedades alimentarias y potencialmente farmacológicas (Golbitz, 1995) (Figura 1)



Figura 1. Planta del frijol de soya

1.1.2 *Contenido en nutrimentos del frijol de soya*

El contenido de proteína del frijol de soya es de aproximadamente el 40%, superior al de cualquier otra leguminosa. Su alta concentración proteica no es su única característica notable, también lo son su patrón de aminoácidos, su bajo contenido en grasas saturadas, su excelente origen de fibra dietaria y su contenido en una gran variedad de micronutrientes como: folatos, Fe, Zn, Ca; fitoquímicos (saponinas, isoflavonas, taninos); inhibidores de la tripsina, fitato (hexafosfato de inositol), oligosacáridos y ácido fático, entre otros (Messina, 1999) (Tabla 1).

NUTRIMENTO	CONTENIDO/ 100 GR BASE SECA
Hidratos de carbono complejos (g)	21
Hidratos de carbono simples (g)	9
Estaquirosa (mg)	3300
Rafinosa (mg)	1600
Proteína (g)	36
Ácidos grasos totales (g)	19
Grasa saturada (g)	2.8
Grasa monoinsaturada (g)	4.4
Grasa poliinsaturada (g)	11.2
Relación ácidos α -linolénico/linoléico (g)	1.3:9.9
Fibra insoluble (g)	10
Fibra soluble (g)	7
Calcio (mg)	276
Magnesio (mg)	280
Potasio (mg)	1797
Hierro (mg)	16
Zinc (mg)	4.8
Isoflavonas	530

Tabla 1. Contenido en nutrimentos del frijol de soya

1.1.3 Evaluación de la calidad de la proteína del frijol de soya

El ensayo convencional para evaluar la calidad de una proteína es la relación de eficiencia de proteína (PER, por sus siglas en inglés, protein efficiency ratio), el cual se basa en el crecimiento de las ratas de laboratorio. Para el crecimiento adecuado de las ratas de laboratorio los requerimientos de proteína y de determinados aminoácidos son superiores a los de un humano (Steinke 1979).

De manera específica, el requerimiento de metionina es aproximadamente 50% mayor para las ratas comparado con el requerimiento para humanos (Sarwar et al. 1985), como consecuencia, el valor de la proteína de la soya ha sido subvaluado debido a que el aminoácido limitante de esta proteína es precisamente la metionina (Tabla 2).

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

gr./100 gr. de producto

AMINOÁCIDO	CASEINA	SOYA
Alanina	2.7	3.8
Arginina	2.3	6.7
Ácido Aspártico	6.1	10.2
Cistina	0.25	
Ácido Glutámico	19.6	16.8
Glicina	1.6	3.7
Histidina	2.5	2.3
Isoleucina	5	4.3
Leucina	8	7.2
Lisina	7	5.5
Metionina	2.5	1.2
Fenilalanina	4.4	4.6
Prolina	9.2	4.5
Serina	4.8	4.6
Trionina	3.8	3.3
Triptofano	1	1.1
Tirosina	4.6	3.3
Valina	6	4.4
Cisteina		1.1

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína de la soya en comparación con la proteína caseína (gr por 100 g de producto)

Debido a la insuficiencia del PER para evaluar la calidad de una proteína y al tiempo y costo elevados del ensayo, la OMS y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) adoptaron la calificación de aminoácidos corregida por digestibilidad de proteína (PDCAAS, por sus siglas en inglés, protein digestibility corrected amino acid score), la cual representa la calificación de aminoácidos (empleando los requerimientos de aminoácidos para un niño de 2-5 años) después de ser corregida por la digestibilidad.

Las proteínas que proporcionan aminoácidos equivalentes o en exceso de requerimientos reciben una PDCAAS de 1.0. La proteína de la soya tiene un PDCAAS de 1.0, indicando que es capaz de cubrir los requerimientos de proteína necesarios para un adulto cuando es consumida como único origen proteico al nivel recomendado de ingesta (0.6 g/Kg de peso) (Young, 1991). Por lo anterior, a la proteína de la soya se le considera una proteína completa por su digestibilidad corregida igual a 1, similar a la albúmina de huevo, utilizada como estándar de oro, (Anderson, 1999) y por lo tanto puede ser sustituida por la proteína de origen animal en la alimentación del ser humano.

1.1.4 La proteína de la soya y sus efectos sobre las concentraciones de colesterol plasmático.

En los últimos años, se ha observado que distintos tipos de proteínas dietarias ejercen diferentes efectos sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol. Investigaciones realizadas en conejos han mostrado que dietas con proteína de origen animal son más hipercolesterolémicas que las dietas con proteína de origen vegetal. (Hamilton y Carroll 1976; Carrol, 1979) así mismo, (Van der Meer y Beynen, 1987) se han encontrado mayores concentraciones plasmáticas de colesterol en esta y otras especies cuando se les alimentó con una dieta a base de caseína que cuando se les alimentó con proteína de la soya.

Huff y Carrol (1980) reportaron que la proteína de origen animal, caseína, aumentó las concentraciones de colesterol en suero de animales de experimentación y en humanos, de manera contraria, el consumo de proteína de la soya disminuyó dichos niveles. Tal disminución se observó principalmente cuando la hipercolesterolemia era ocasionada por la dieta. (Kim, 1980; Terpstra, 1982; Forsythe, 1995). De la misma manera numerosos estudios (Carrol, 1991; Kritcheusky, 1993; Sirtori, 1993; Sugano y Koba, 1993) realizados en humanos y en modelos animales demostraron que la sustitución de la proteína animal por la proteína de la soya redujo las concentraciones plasmáticas de colesterol total y colesterol LDL.

En estudios en humanos, Sirtori y cols. (1977) reportaron que la sustitución de proteína animal por la proteína de la soya en la dieta de individuos hipercolesterolémicos conduce a una marcada disminución en las concentraciones séricas de colesterol total y colesterol LDL. De esta manera se observó que la disminución en las concentraciones séricas o plasmáticas de colesterol cuando la proteína animal se sustituyó por proteína de la soya fue generalmente mayor en individuos hipercolesterolémicos que en individuos normocolesterolémicos (Carrol, 1995).

Se conoce que el efecto hipocolesterolémico de la proteína de la soya sobre las concentraciones séricas de colesterol en humanos y en conejos es debido principalmente a cambios en las concentraciones de la fracción LDL, y que la hipercolesterolemia producida por la proteína caseína está asociada con desregulación de los receptores LDL (Carrol, 1995).

Por lo anterior, y desde una perspectiva nutricional, la proteína de la soya tiene muchas ventajas. Más allá de su bajo contenido en grasas saturadas, y por supuesto de colesterol, de mayor importancia se encuentra como ya hemos visto, su efecto hipocolesterolémico ya que se necesitan 25 gr. de proteína de soya para disminuir el colesterol en individuos hipercolesterolémicos (Bakhi et al. , 1994). De esta manera, el consumo de dietas a base de esta proteína vegetal representa un método no farmacológico, seguro, viable y práctico para disminuir el colesterol plasmático.

1.1.5 Efecto hipocolesterolémico de la proteína de la soya: Mecanismos propuestos.

Aunque la mayoría de investigaciones se han enfocado a la composición de aminoácidos de la proteína de la soya como posibles contribuyentes de sus efectos benéficos, más recientemente, otros componentes entre los que destacan las isoflavonas, péptidos, saponinas, ácido fítico, fibra e inhibidores de la tripsina también se han estudiado con este fin. Un interés particular se ha centrado en los isoflavonoides, genisteína y daidzeína por su similitud estructural con los estrógenos, los cuales poseen potencial hipocolesterolémico (Stamfer, 1985; Beynen, 1990; Anthony, 1996). Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que los isoflavonas no poseen efecto hipocolesterolémico, sino que más bien

participan en la regulación de genes involucrados en el metabolismo de lípidos (Tovar-Palacio, 1998; Tovar, 2002).

Por otro lado, y a pesar de la amplia evidencia que existe sobre el efecto benéfico de esta proteína sobre las concentraciones de colesterol plasmático en muchas especies, incluyendo humanos, el o los mecanismos, y principalmente los mecanismos moleculares, por los cuales ejerce dicho efecto no han sido demostrados de manera concluyente (Forsythe, 1995).

Se ha propuesto que la proteína de la soya: Aumenta la excreción fecal de ácidos biliares (Huff y Carrol, 1980; Nagata, 1982); ejerce efectos sobre el metabolismo hepático del colesterol, aumentando la actividad de la enzima HMG CoA reductasa (Nagata, 1982), incrementando la eliminación de LDL y VLDL por los hepatocitos (Huff y Carroll, 1980) y células humanas mononucleares; efectos endocrinos, aumentando las concentraciones de hormonas como la tiroxina, índice de tiroxina libre y en algunos casos de la hormona estimulante de la tiroides (Forsythe, 1990); y finalmente genera una disminución de la relación insulina: glucagon (Beynen, 1990; Ham, 1993). A pesar de lo anteriormente propuesto, se desconocen sus efectos a nivel molecular, así como los posibles mecanismos involucrados.

1.1.6 Soya y enfermedades crónico-degenerativas

Recientemente, se ha reportado que la alta calidad y concentración en nutrimentos aportados por el frijol de soya lo convierten en un alimento útil en el tratamiento y prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Anderson, 1999; Nilausen y Meinhertz, 1999; Goldberg, 1995), tal es el caso de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis (Anderson, 1999; Ascherio y Willett, 1995; Dwyer, 1995, Wilcox y Blumenthal, 1995), enfermedad cerebrovascular (Kanazawa, 1995), osteoporosis postmenopausica (Anderson, 1999; Arjmandi, 1995), cáncer (Anderson, 1999; Messina, 1994) y obesidad (Anderson, 1999).

Muchos de sus efectos benéficos se han atribuido por un lado a su contenido en isoflavonas, compuestos antioxidantes que poseen una estructura química muy similar a la de los estrógenos. Así como a su alto contenido en fibra soluble e insoluble y a los inhibidores de la tripsina, los cuales benefician la función gastrointestinal: las primeras a través de estímulos mecánicos, y los segundos por medio de la secreción de colecistocinina, hormona encargada de la contracción vesicular y la secreción de sales biliares (Potter, 1995).

Así mismo, se ha demostrado que la ingestión de la proteína del frijol de la soya tiene un papel importante en la prevención y tratamiento de la enfermedad renal (Kontessi, 1990) en pacientes con diabetes tipo 2. La sustitución de la proteína animal por esta proteína en estos pacientes resultó en una disminución en la hiperfiltración e hipertensión glomerular, protegiéndolos contra la nefropatía diabética (Anderson, 1998). Finalmente, se conoce que la expresión del gen del receptor de la insulina se incrementa cuando se consumen dietas a base de proteína de la soya, lo que reduce la resistencia a la insulina.

La composición de la dieta tiene implicaciones directas sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos. Gran parte del interés en el estudio de los beneficios del frijol de soya se debe al efecto hipocolesterolémico ejercido principalmente por el tipo de proteína que contiene. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que altos niveles de colesterol representan un factor de riesgo independiente de muerte por eventos cardiovasculares (Kritckevsky, 1995;

Grundy, 1994; Ogborn, 1994), por ello la FDA recomienda 25 gr. de proteína de la soya al día como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol para la prevención de dichos eventos (Messina, 1999).

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se propone que el consumo de dietas a base de proteína de la soya pueda ejercer efectos benéficos sobre las alteraciones que se presentan en la diabetes tipo 2.

1.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es un padecimiento de alta incidencia en la población mundial y en México que aumenta en proporciones alarmantes. Este tipo de diabetes involucra un estado pre-diabético caracterizado por *hiperinsulinemia* asociada con *resistencia a la insulina*, que es la incapacidad de los tejidos periféricos, incluyendo músculo, hígado y tejido adiposo, para responder a dosis fisiológicas de insulina. La diabetes clínica sobreviene cuando las *células beta del páncreas fallan* para secretar insulina apropiadamente y contrarrestar la resistencia a esta hormona (Fernández-Mejía, 1996).

La obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de este padecimiento. Los individuos obesos manifiestan de manera característica resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, (Seufert et al. 1999; The Expert Committee, 2002), sin embargo, la conexión entre el incremento de adiposidad y resistencia a la insulina se desconoce (Kahn, 1996).

Recientes observaciones realizadas en modelos animales lipoatróficos demuestran que estos tienen una predisposición similar para el desarrollo de diabetes. Así, en ambas condiciones, obesidad y lipodistrofia, la desregulación del tejido adiposo parece conducir al desarrollo de este tipo de diabetes, por lo que se requiere un número adecuado de adipositos funcionales para mantener la homeostasis de energía (Nadler, 2001).

1.2.1. Potencial diabetogénico de la obesidad

Durante la diferenciación de adipositos se induce la expresión de numerosos genes, los factores transcripcionales C/EBP β/δ , C/EBP α y de PPAR γ , los cuales son críticos para el mantenimiento de un adiposito maduro son los primeros en expresarse (Green, 1975). A continuación se incrementa la expresión de SREBP-1, un factor transcripcional importante en el metabolismo de lípidos. Como resultado de la elevada expresión de todos estos, se origina la expresión de varios genes metabólicos como GLUT4, esteaoril -CoA desaturasa (SCD1) y proteína de unión a ácidos grasos, generando de esta manera un adiposito lipogénico funcional. Estudios de expresión de genes en tejido adiposo de ratones normales y obesos, han mostrado que muchos genes cuya expresión se incrementó durante la diferenciación de dicho tejido en los ratones normales, disminuyó significativamente en los adipositos de ratones obesos. Los genes alterados fueron SREBP-1, PPAR γ y C/EBP α ; genes involucrados en el metabolismo de lípidos tales como SCD1, ATP-citrato liasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa así como proteínas que se secretan y expresan durante la adipogénesis. De manera contraria, los genes que disminuyen su expresión durante la diferenciación de los adipositos de ratones normales se incrementó en los adipositos de ratones obesos.

La disminución de genes adipogénicos en la obesidad significa que los adipositos de ratones obesos presentan una marcada disminución en su capacidad lipogénica, similar a la observada en los pre-adipositos, quienes no almacenan ni sintetizan lípidos y no responden a dosis fisiológicas de insulina como lo hacen los adipositos maduros normales, en contraste, los adipositos de ratones obesos son resistentes a la insulina. Por lo que las características fisiológicas de los preadipositos correlacionan con el patrón de expresión de genes de adipositos maduros de ratones obesos (Naddler,2001).

Aunque en la obesidad exista un gran número de adipositos, el número de estos funcionalmente maduros, está disminuida, por lo que estas células tienden a desarrollar resistencia a la insulina lo que conduce a un cambio en la carga metabólica hacia otros tejidos, esto es, almacenamiento de triacilgliceroles en hígado y músculo. Debido a esto, se ha propuesto que el potencial diabotogénico de la obesidad esté relacionado con la capacidad del hígado para realizar actividad lipogénica dada la disminución en dicha capacidad por el tejido adiposo (Figura 2) (Naddler, 2001).

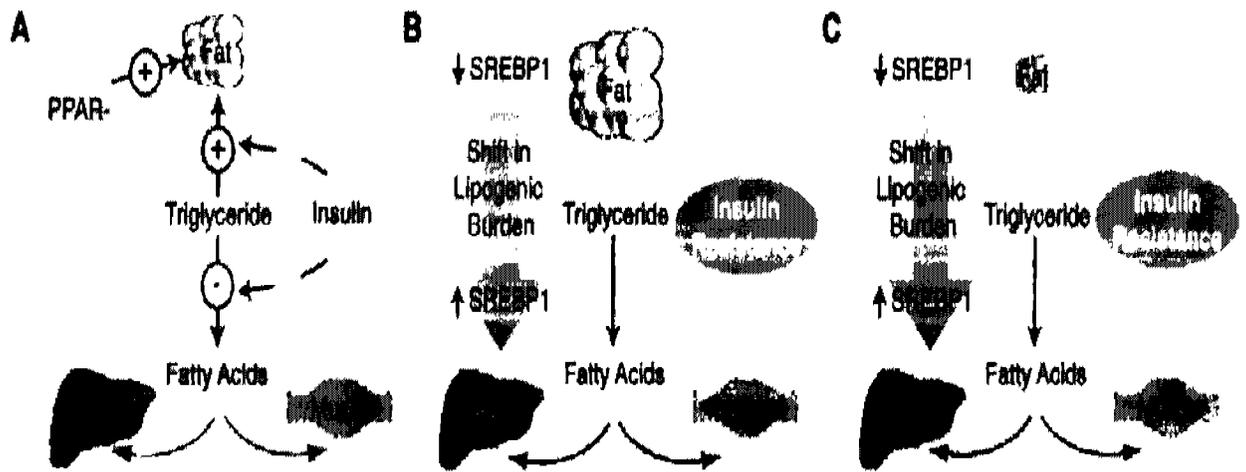


Figura 2. Potencial diabotogénico de la obesidad. A) Condiciones normales, B) Obesidad, C) Lipodistrofia. Tomado de Nadler and Attie.2001. Please pass the chip: Genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 131: 2078-2081.

Como podemos observar, la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 son condiciones clínicas estrechamente relacionadas, sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen esta estrecha asociación no son claros, pero se sabe que pueden estar involucrados algunos factores transcripcionales y proteínas que participan en la regulación del metabolismo de lípidos así como en algunos de los procesos que desencadenan la resistencia a la insulina.

Es así, que en este trabajo se estudió la regulación de SREBP-1, PPAR γ , FAS, CYP7 y ABCA1 por la proteína de la soya, los cuales se sabe que están involucrados en el metabolismo de lípidos y en la resistencia a la insulina. Lo anterior, con el fin de comprender la participación de dicha proteína en el mejoramiento de algunas de las alteraciones (principalmente la

dislipidemia, resistencia a la insulina y el daño renal) que se presentan en un modelo de obesidad y diabetes tipo 2.

1.3 Factores transcripcionales y proteínas asociadas con obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

1.3.1 Receptor del proliferador activado de peroxisomas (PPAR γ)

En estudios a nivel molecular se ha asociado al receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR- γ) con la resistencia a la insulina. Este factor transcripcional pertenece a la familia de los receptores esteroides nucleares y su funcionalidad biológica depende de la formación de un complejo heterodimérico con el receptor de retinoides X (RXR) (Wahli, 1991; Mukherjee, 1997; Ren, 1996). Al ser activado por sus ligandos (Figura 3) (prostaglandinas, ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3, tiazolidinedionas) PPAR- γ activa la transcripción de genes involucrados principalmente en la diferenciación de adipositos (como son: proteína de unión a ácidos grasos, lipasa lipoprotéica, acil-CoA sintasa, transportador GLUT 4) así como en la expresión de genes de enzimas lipogénicas y de homeostasis de glucosa (Forman, 1995). Se sabe que la inducción de estos genes mejora la sensibilidad a la insulina.

El reciente descubrimiento de mutaciones negativas dominantes de PPAR- γ en gemelos humanos con resistencia a la insulina ha sugerido que este se encuentra involucrado en el mantenimiento normal de la sensibilidad a la insulina (Barroso, 1999). Este factor transcripcional se expresa principalmente en tejido adiposo aunque también se ha identificado en hígado y músculo.

Por otro lado, se conoce que los ligandos sintéticos activadores de PPAR γ , las tiazolidinedionas (TZD), son un grupo de agentes sensibilizantes de insulina que ejercen sus efectos funcionando como activadores de este factor transcripcional (Berger, 1996; Lehmann, 1995; Harris, 1994). El tejido adiposo y el músculo parecen ser sus órganos blanco. La activación de PPAR γ por TZDs en tejido adiposo aumenta la tasa de diferenciación celular, la cual se acompaña de un aumento en el número de células y aumento en la expresión del transportador GLUT4, proteína de unión a ácidos grasos y lipasa lipoprotéica; en músculo aumenta la expresión de lipasa lipoprotéica y GLUT4 (Nolan, 1994). El resultado de estas acciones es un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina, aumento del metabolismo de glucosa y disminución en las concentraciones de triacilglicerolos.

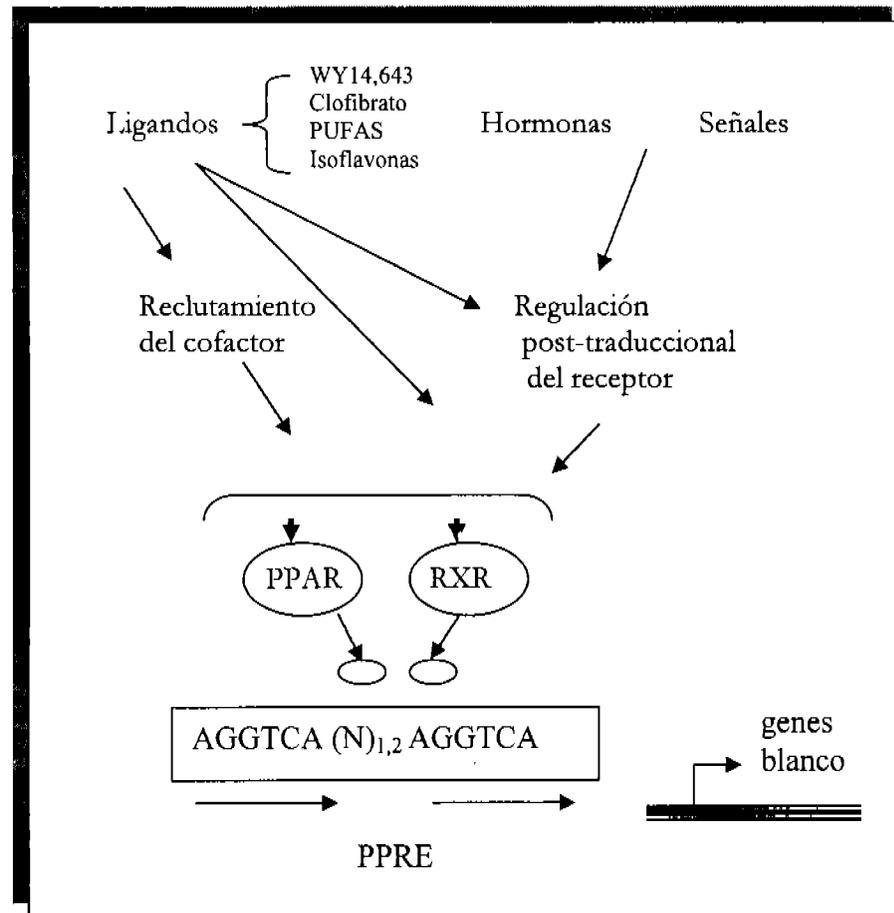


Figura 3. Mecanismos de regulación transcripcional de genes por los PPARs a través de elementos de respuesta a PPARs (PPRE)

1.3.2 Proteínas que se unen a los elementos reguladores de esteroides (SREBP1)

La forma en como la célula reconoce el nivel de colesterol es a través de una familia de proteínas que se unen a los elementos reguladores de esteroides (SREBP's). Estas proteínas regulan la expresión de varios genes involucrados en la biosíntesis y captura de colesterol como son la HMGCo A reductasa, HMGCoA sintasa, farnesil difosfato sintasa y escualeno sintasa (Goldnstein and Brown, 1990; Osborne, 1995; Guan et al., 1995). Así mismo se ha encontrado que los SREBP's modulan la transcripción de genes que codifican para enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos como son la acetil Co A carboxilasa, sintasa de ácidos grasos (FAS), esteroid CoA desaturasa-1 y lipasa lipoprotéica (Tontonoz et al., 1993; Kim and Spiegelman, 1996; Shimano et al., 1996). De esta manera los SREBP's coordinan la síntesis de: Colesterol y ácidos grasos.

Se han identificado tres familias (SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2), que tienen una estructura similar y están formadas de tres dominios 1) un dominio NH₂-terminal, de aproximadamente 480 aminoácidos que permiten que las SREBP's funcionen como factor transcripcional; 2) una región media con dos segmentos hidrofóbicos transmembrana de 22 aminoácidos cada uno, separados por una asa de 31 aminoácidos y 3) un dominio regulador COOH-terminal de una longitud aproximada de 590 aminoácidos (Figura 4). Las SREBP's tienen un peso molecular de 125 kDa y están localizadas en el retículo endoplásmico con los extremos NH₂ y COOH terminales orientados hacia el citoplasma con un pequeño fragmento intermedio orientado hacia el lumen de este organelo (Hua, 1995).

Esta forma precursora permanece unida al retículo endoplásmico (RE) y a la envoltura nuclear en presencia de concentraciones adecuadas de esteroides (Brown y Goldstein, 1997). Cuando las concentraciones de esteroides disminuyen dicha proteína precursora es transportada al aparato de Golgi y sufre un corte secuencial por dos proteasas (S1P y S2P) para liberar el dominio NH₂-terminal. Esta forma madura entra al núcleo y activa la transcripción de genes involucrados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos al unirse a elementos reguladores de esteroides (5' - TCACCCCCAC-3') y a las secuencias palindrómicas E-boxes (5' - CANNTG-3') (Amemiya-Kudo, 2000).

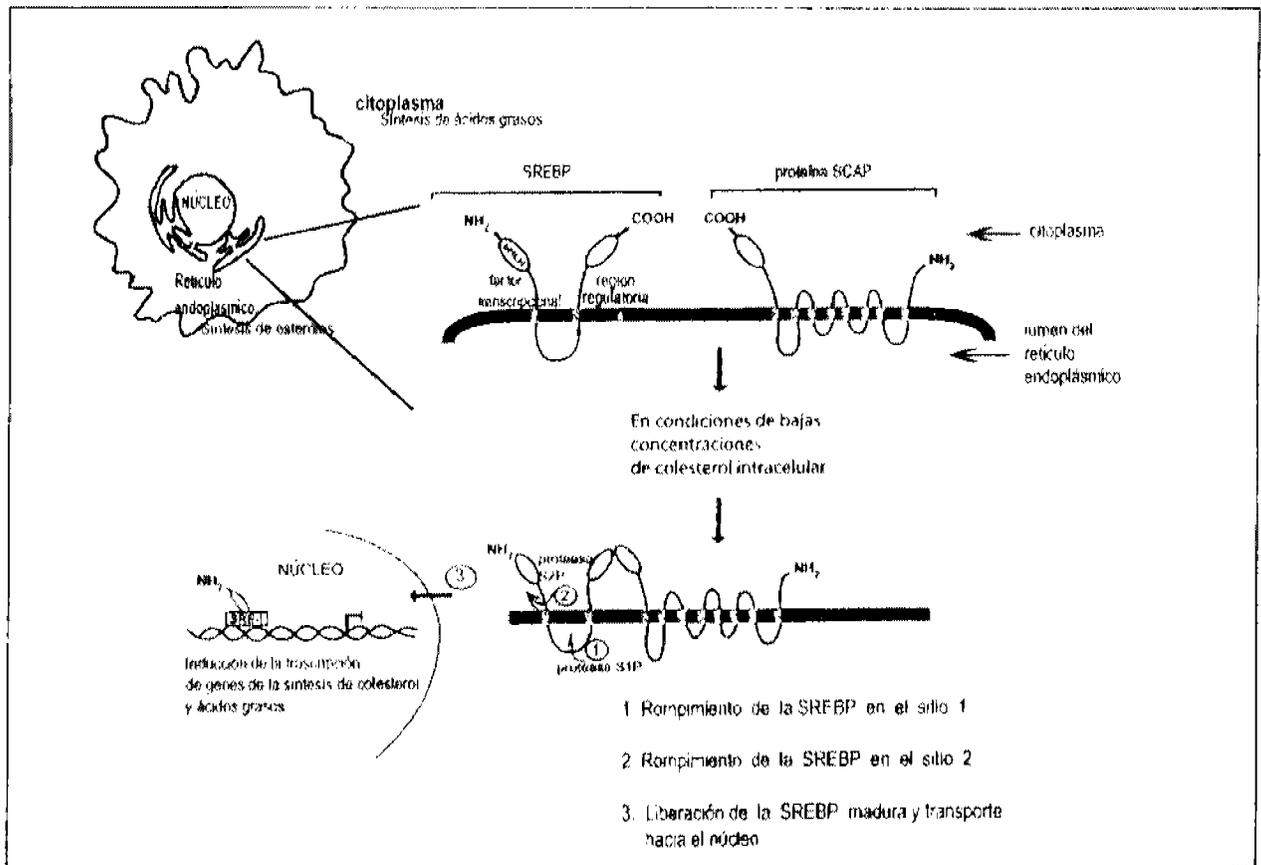


Figura 4. Mecanismo de acción de las SREBP's

El procesamiento proteolítico de las SREBP's está regulado negativamente por esteroides, los cuales por lo tanto reprimen su propia síntesis. La regulación por esteroides está mediada por la proteína de activación de corte de SREBP (SCAP), una proteína de membrana que forma un complejo con SREBP en el RE. Esta proteína es un sensor de esteroides, cuando estos se acumulan en las células SCAP no transporta SREBPs y el procesamiento proteolítico no se lleva a cabo (Nhturfft, 2000). En el hígado se expresan las tres familias descritas así como también se expresan SCAP y las proteasas S1P y S2P.

Interesantemente, la relación de SREBP-1c:SREBP-1a tanto en ratones como en humanos varía de acuerdo con el órgano de que se trate. Por ejemplo, en hígado existe una proporción de 9:1 del transcrito 1c con respecto al 1a; valores similares han sido detectados en glándula adrenal y tejido adiposo; por el contrario el bazo tiene una relación 1c:1a de 1:10 (Shimomura,1997). La abundancia del tercer miembro de esta familia, la SREBP-2, es más uniforme.

Se ha establecido (Azzout-Marniche, 2000) que la insulina estimula la transcripción del gen de SREBP-1c en hígado (Kim, 1998) y en tejido adiposo (Foretz, 1999), sin embargo, la ruta de señalización de la insulina que conduce a un incremento en la transcripción de este gen se desconoce. En condiciones normales el hígado no produce las formas maduras de los SREBP's, en su lugar produce las formas precursoras que deben ser procesadas proteolíticamente para activar la transcripción. Este proceso es activado por la insulina, la cual aumenta los niveles del RNAm y de la proteína SREBP-1c en este órgano (Foretz, 1999).

El aumento en la transcripción del gen de SREBP-1c podría lógicamente resultar en un aumento en la cantidad de la forma precursora de SREBP-1c en membranas del RE hepático. De manera análoga a la regulación de la actividad transcripcional de SREBP-2, la cual involucra un proceso proteolítico dependiente de colesterol (Goldstein y Brown, 1999), la insulina podría también aumentar la proteólisis de la forma precursora de SREBP-1c y de esta manera su concentración nuclear. En algunos estudios se ha encontrado que SREBP-1c nuclear se encuentra aumentado en hígado de ratones que han sido alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono o en hígado de ratas diabéticas que han sido tratadas con insulina (Horton, 1998).

Cualquiera que sea el mecanismo involucrado en el proceso proteolítico, se desconoce si una cantidad incrementada de la forma nuclear de SREBP-1c es el único mecanismo por el cual la insulina aumenta la transcripción de los genes blanco de este importante factor transcripcional. Finalmente, estudios en ratones transgénicos han demostrado que la SREBP-1 tiene un papel más activo regulando la transcripción de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos que en la síntesis de colesterol.

1.3.3 Sintasa de ácidos grasos (FAS)

La FAS es una enzima importante en la lipogénesis, pues cataliza reacciones de condensación, deshidratación y reducción que darán lugar a la formación de un ácido graso.

Se conoce que esta enzima está bajo regulación transcripcional de SREBP-1c (Tontonoz,1993; Shimano,1996), además, recientemente se ha descrito que SREBP-1c es un gen blanco para el heterodímero receptor hepático X-receptor de retinoides X (LXR-RXR).

El receptor hepático X (LXR) es miembro de factores transcripcionales de la familia de receptores nucleares huérfanos el cual para unirse al DNA forma un heterodímero con el receptor de retinoides X, como se ha demostrado en estudios con ratones que carecen de LXR

, los niveles de expresión basal del RNAm de SREBP-1c en hígado disminuyeron significativamente, de manera paralela a la reducción en la expresión de RNAm de enzimas lipogénicas reguladas por SREBP-1c, dentro de las que se encuentra principalmente la FAS.

Además, en ratones alimentados con dietas altas en colesterol y retinoides (agonistas de LXR) se observó un incremento en RNAm de SREBP-1c y de su proteína en ratones tipo silvestre, pero no en ratones LXR α /LXR $^{-/-}$ (Horton y Shimomura 1999; Shimano et al. 1999). En estos estudios se muestra a SREBP-1c como gen blanco para LXR y sugieren una nueva convergencia de mecanismos homeostáticos en el metabolismo del colesterol y ácidos grasos.

1.3.4 7- α hidroxilasa de colesterol (CYP7)

Los ácidos biliares juegan dos papeles opuestos en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol: por un lado son el producto final del catabolismo del colesterol, y su biosíntesis y excreción sirven para disminuir los niveles de colesterol en el hígado. En segundo lugar, su presencia en el intestino facilita la solubilización de las grasas dietarias y colesterol y la subsiguiente captura de estos importantes nutrimentos y es de esta manera que, los ácidos biliares incrementan los niveles de colesterol en todo el organismo.

Estas observaciones sugieren que la producción de ácidos biliares en el hígado debe ser cuidadosamente regulada a fin de mantener un balance de estas dos funciones antagónicas (Carey, 1982).

La síntesis de ácidos biliares es llevada a cabo por aproximadamente 10 enzimas. En el humano y en la rata los productos principales formados son los ácidos biliares primarios, ácido cólico y el ácido quenodeoxicólico. La reacción paso limitante en esta ruta es la introducción de un hidroxilo en la posición 7 α del colesterol, esta reacción es catalizada por la enzima 7- α hidroxilasa de colesterol (CYP7) (Myant, 1977). Una vez formado el 7- α hidroxil-colesterol este es rápidamente convertido a ácidos biliares primarios.

Se conoce que la circulación enterohepática de ácidos biliares inhibe la tasa de síntesis y actividad de CYP7 (Myant, 1977). Así, en animales mantenidos con una dieta que contiene ácidos biliares el nivel de CYP7 es reducido, de manera contraria, animales que han sido expuestos a colestiramina, una resina que se une a ácidos biliares y aumenta la excreción de estos, incrementan los niveles hepáticos de esta enzima y por lo tanto la producción de ácidos biliares. Bajo condiciones normales, CYP7 se expresa únicamente en el hígado (Jelinek, 1990). La regulación de CYP7 es compleja y se da a nivel transcripcional.

Se conoce que CYP7 es un gen blanco del receptor hepático X (LXR). El patrón de expresión de LXR (y sus ligandos) ha sugerido un papel importante de este factor transcripcional en el metabolismo del colesterol. Estudios realizados en ratones sometidos a dietas altas en colesterol o a agonistas sintéticos de LXR mostraron incremento en la expresión de CYP7A1, dando como resultado incremento en la producción y eliminación fecal de ácidos biliares derivados del colesterol (Repa et al. 2000).

1.3.5 Cassette de unión a ATP A1 (ABCA1)

El gen ABCA1 es un miembro de la superfamilia de transportadores de cassette de unión a ATP A (ABCA1) y codifica para una proteína de membrana la cual transporta una

amplia variedad de moléculas incluyendo proteínas, lípidos, iones y azúcares. ABCA participa en la eliminación de colesterol y fosfolípidos celulares, paso inicial en el transporte reverso de colesterol. El transporte reverso de colesterol es un proceso por el cual el colesterol de los tejidos periféricos es redistribuido a sitios de excreción y metabolismo del mismo, tales como hígado y tejidos endocrinos. Se sabe que este proceso es mediado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL). El paso inicial durante el transporte reverso de colesterol es la liberación de colesterol libre y fosfolípidos de la membrana plasmática a partículasceptoras (Apo-A1), en este paso participa ABCA1 la cual actúa como una “flípasa” del colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática (Figura 6). Esta proteína se expresa en hígado, intestino delgado, placenta y cerebro. (Costet et al. 2000). ABCA1 es un gen blanco de LXR.

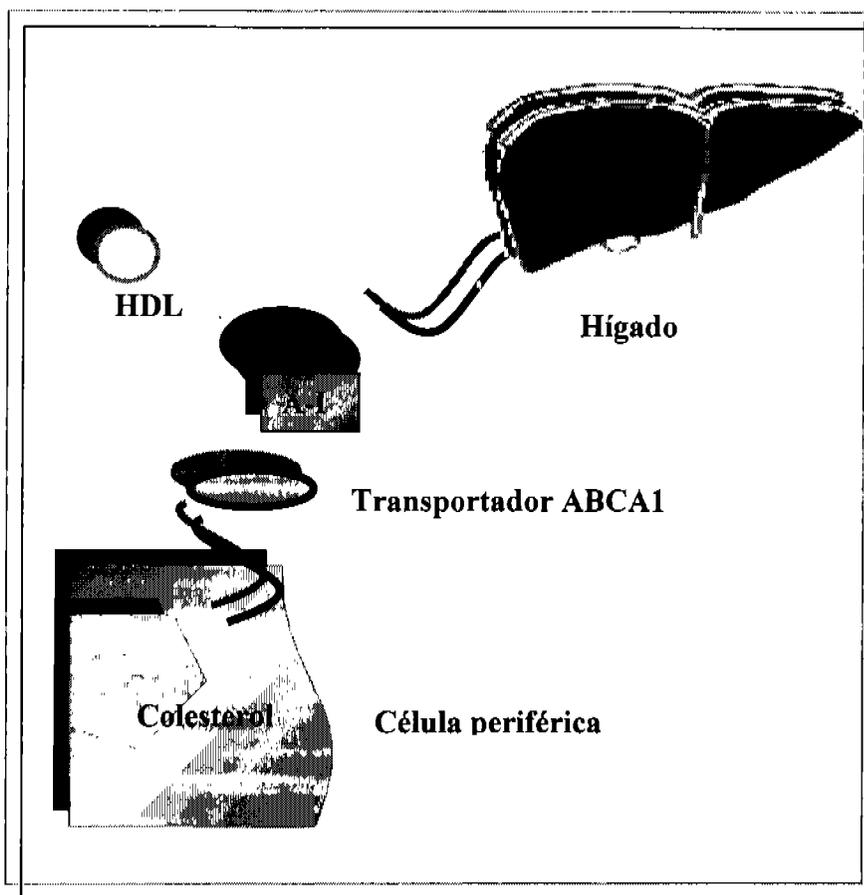


Figura 5. Mecanismo de acción del transportador ABCA1

2. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

A través de estudios en el laboratorio de Nutriología Molecular se ha demostrado que ratas alimentadas con una dieta que contiene 20% de proteína de soya crecen a una misma velocidad que las ratas que son alimentadas con caseína al 20%, además de que presentaron una disminución de aproximadamente el 25% en las concentraciones de colesterol y triacilgliceroles en suero.

Posteriormente en un modelo de síndrome nefrótico experimental crónico (SN) inducido a ratas con amininucleósido de puromicina que se caracteriza por el desarrollo de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalbuminemia y proteinuria, el consumo de una dieta a base de proteína de soya al 20% mejoró la depuración de creatinina en un 24%, redujo la proteinuria en un 53%, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteína de baja densidad (LDL) en comparación con las ratas con SN alimentadas con 20% de caseína, las cuales presentaron concentraciones de VLDL 3.4 veces más elevadas y 2.9 veces más elevadas que las alimentadas con proteína de la soya (Tovar, 2002).

Por otra parte, la ingestión de proteína de soya por las ratas normales reduce la expresión génica de SREBP, la enzima málica, la FAS y las concentraciones de colesterol en hígado lo que induce a la hidroximetilglutaril Co A reductasa (HMGCoAr) y al receptor de LDL.

Finalmente en este laboratorio, se ha encontrado que el consumo de proteína de soya evita que se eleven las concentraciones de insulina lo que tendría un gran potencial en retrasar el desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes obesos con tendencia a desarrollar diabetes tipo 2.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia de la diabetes sigue ascendiendo en todo el mundo. En 1985 se estimó que existían 30 millones de personas con diabetes y para 1995 esta cifra ascendió a 135 millones y para el año 2025 se calcula será de 300 millones aproximadamente. En México, según información de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC 1993), se estimó una prevalencia de diabetes de 8.2% en la población mexicana de 20 a 69 años y para el año 2000 la Encuesta Nacional de Salud (ENSA, 2000) estimó una prevalencia en 10.9%. Se espera que para el año 2025 existan 7 millones de afectados y que nuestro país ocupe el séptimo lugar mundial.

Estas cifras convierten a esta enfermedad en uno de los principales problemas de salud en México, en la principal causa de incapacidad prematura y la principal causa de muerte en los mexicanos mayores de 40 años. Además, la diabetes tipo 2 es la causa más importante de amputación de miembros inferiores, de origen no traumático, así como de otras complicaciones como retinopatía e insuficiencia renal y un factor de riesgo importante para el desarrollo de aterosclerosis. La obesidad es un factor de riesgo importante para su desarrollo, en nuestro país, de acuerdo a las estadísticas existe una epidemia de obesidad (30.6% de mujeres con sobrepeso y 21.2% con obesidad).

La diabetes tipo 2 se caracteriza fisiopatológicamente por un estado prediabético caracterizado por hiperinsulinemia asociada a resistencia a la insulina. La diabetes clínica se presenta cuando las células beta del páncreas fallan para secretar insulina apropiadamente para contrarrestar la resistencia a esta hormona (Fernández-Mejía, 1996).

La hiperlipidemia asociada a este padecimiento (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) produce daño renal, promoviendo daño mesangial, esclerosis glomerular y un incremento en la permeabilidad de la membrana basal glomerular. Dichas anomalías lipídicas aceleran los procesos aterogénicos.

Con frecuencia el diagnóstico de la diabetes tipo 2 se realiza de manera tardía esto, aunado a la baja adherencia al tratamiento por tratarse de un padecimiento incurable, los pacientes permanecen en descontrol metabólico crónico durante años. Lo anterior conduce al desarrollo de daño renal, complicación que afecta al 30-50% de los pacientes diabéticos. La progresión de la enfermedad renal se acelera por la ingestión de dietas altas en proteína animal.

Se conoce que pacientes y animales de experimentación nefróticos con restricción de proteína dietaria mejoran la proteinuria, además que dietas bajas en proteínas mejoran no únicamente la proteinuria sino que también la hipercolesterolemia (Ascencio, 1997). Sin embargo a pesar de sus efectos benéficos, dietas bajas en proteínas retardan el crecimiento en individuos jóvenes y reducen las proteínas tisulares en adultos (Harper, 1984; Torres, 1998; Tovar, 1998). Se ha propuesto que el consumo de dietas que contienen proteína vegetal puede retardar el daño renal disminuyendo la tasa de filtración glomerular y excreción de albúmina urinaria (Kontessis, 1990).

La proteína de la soya es una proteína vegetal que mantiene el crecimiento adecuado en ratas y en niños, tiene un perfil de aminoácidos que cubre los requerimientos para cada aminoácido en humanos y en ratas. Por lo que se le considera una proteína completa con una digestibilidad corregida de 1. Además, la proteína de la soya tiene también un coeficiente arginina/lisina alto el cual se ha asociado con una menor secreción de insulina comparada con la proteína de origen animal. El extracto de proteína de soya también actúa como un estrógeno débil a través

de su contenido en isoflavonas, inhibiendo la tirosina cinasa. A través de estudios epidemiológicos, se sabe que el consumo de 25g de proteína de soya diariamente tiene un efecto hipocolesterolémico (Bakhit, 1994).

Por lo anterior, proponemos que el consumo de una dieta a base de proteína de soya al 20% que cubre los requerimientos de proteína en la rata, mejora la hiperlipidemia y disminuye el daño renal en un modelo de ratas obesas y genéticamente predispuestas a desarrollar diabetes tipo 2. De esta misma manera examinamos el efecto de esta dieta sobre la expresión de genes que regulan el metabolismo de lípidos para elucidar el posible mecanismo por el cual disminuye las concentraciones plasmáticas y en tejido hepático de colesterol total y triacilglicérolos.

4. HIPÓTESIS

La proteína de soya disminuye las concentraciones séricas de colesterol y triacilgliceroles tanto en suero como en hígado a través de la regulación de los factores transcripcionales SREBP-1, PPAR- γ así como de las proteínas FAS, CYP7 y ABCA1 involucrados en el metabolismo de lípidos en ratas obesas diabéticas Zucker (fa/fa)

5. OBJETIVO GENERAL

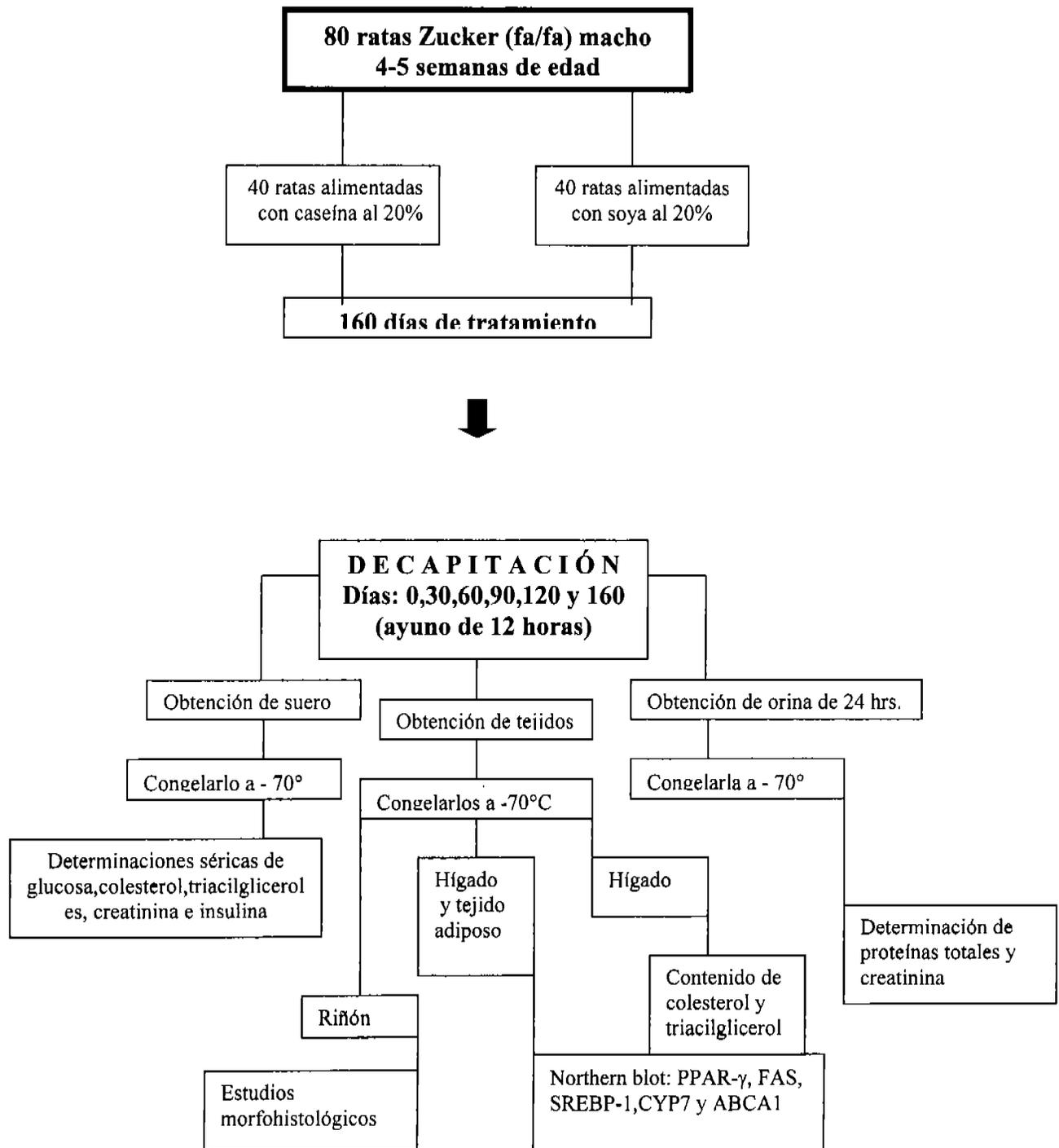
Determinar el efecto de la proteína de la soya sobre la expresión génica de SREBP-1, PPAR- γ y de las proteínas FAS, ABCA1 y CYP7 en ratas obesas diabéticas Zucker (fa/fa)

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la ingesta de una dieta a base de proteína de soya al 20% y compararla con la ingesta de una dieta a base de caseína al 20 % en las ratas Zucker obesas
2. Determinar la ganancia de peso de ratas Zucker alimentadas con soya al 20% y compararla con las alimentadas con caseína al 20%.
3. Determinar las concentraciones de glucosa en suero de ratas Zucker obesas
4. Determinar las concentraciones de insulina en suero de ratas Zucker obesas alimentadas con soya o caseína al 20% .
5. Cuantificar las concentraciones de colesterol y triacilgliceroles en suero e hígado de ratas Zucker alimentadas con soya o caseína al 20%.
6. Conocer la posible regulación de la proteína de la soya sobre la expresión génica de factores transcripcionales y proteínas involucrados en el metabolismo de lípidos en tejidos de ratas Zucker obesas a través de la:
 - a) Cuantificación de los RNAm de SREBP-1 , sintasa de ácidos grasos (FAS) CYP7 y ABCA1 en hígado
 - b) Cuantificación de la expresión de los RNAm de PPAR- γ , SREBP-1 en tejido adiposo
 - c) Cuantificación de la expresión del RNAm de SREBP-1 en músculo
7. Comparar el efecto de la proteína de la soya contra el efecto de la proteína caseína sobre la función renal a través de la determinación de:
 - a) Depuración de creatinina
 - b) Protcinuria
8. Comparar el efecto de la proteína de la soya contra el efecto de la caseína sobre la morfología del tejido renal

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama de Bloques



6.2 Material y Métodos

6.2.1. Animales

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron 40 ratas macho obesas diabéticas Zucker (ZDF) (*fa/fa*) de 4-5 semanas de edad obtenidas de la compañía Harland. Los animales se mantuvieron en el Bitoterio del Instituto Nacional de Ciencias médicas y Nutrición “Salvador Zubirán en las siguientes condiciones: en jaulas metabólicas individuales para medir la ingesta de alimento (diariamente), la ganancia de peso (cada tres días) y recolección de orina de 24 horas (cada 30 días), con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a temperatura y humedad controladas por un periodo de 160 días.

6.2.2.1 La rata Zucker diabética obesa (ZDF) (*fa/fa*) como modelo de estudio para la diabetes tipo 2.

Las ratas diabéticas obesas Zucker *fa/fa* son un modelo para el estudio de diabetes tipo 2, fisiopatológicamente se caracterizan por desarrollar hiperfagia, obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y daño en la tolerancia a la glucosa (Gassler et al. 2001). Dos mutaciones (autosómicas recesivas) en el gen *fa* que codifica para el receptor de la leptina producen obesidad en esta rata. A la ZDF macho se le considera un buen modelo para el estudio de la Diabetes tipo 2 y ha sido ampliamente utilizada desde la década de los 80's para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de este padecimiento.

Este modelo también se ha usado para probar muchas de las drogas que han sido y son usadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 así como para el estudio de sus complicaciones a largo plazo. La rata ZDF macho desarrolla diabetes rápidamente entre la 6 y 10 semanas de vida (Tabla 3) a diferencia de la hembra quien típicamente no la desarrolla con las dietas chow comercialmente disponibles, sin embargo, cuando se le alimenta con una dieta alta en grasa de origen animal desarrolla diabetes en pocas semanas.

Edad de la rata ZDF (semanas)	Estado de desarrollo del modelo ZDF	Referencias en la literatura
4-5	Pre-obesas	Unger,1999
8-9	Obesa y Pre-diabética	Unger,1999, Shimabukuro,1998
12-14	Obesa y diabética	Unger,1999; Shimabukuro,1998

Tabla 3. Estadios de desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 en la rata ZDF macho a partir del destete.

6.2.2.2 Características fenotípicas de la rata ZDF macho

Las características fenotípicas generales de la rata ZDF macho son:

1. Hiperglicemia, la desarrollan entre la 7 y la 10 semana de edad.
2. Hiperinsulinemia temprana, la cual desciende rápidamente paralela al fallo de las células β .
3. Hiperglicemia en ayuno, la cual aparece en las primeras 10 a 12 semanas y progresa con la edad.
4. Intolerancia a la glucosa, la cual empeora de manera progresiva con la edad.
5. Hiperlipidemia
6. Hipertensión media
7. Enfermedad renal

6.2.2.3 Genética

El receptor de la leptina (Lepr o Ob-R) es el receptor de membrana para la leptina, dos mutaciones en este receptor producen obesidad en la rata. La primera de las mutaciones se le definió como *fa* a la cual también se le ha llamado *Lep^{fa}* o *Ob-R^{fa}* y resulta de un acortamiento en la proteína del receptor de la leptina, el cual no interacciona adecuadamente con la leptina (Chua et al., 1996; White et al., 1997). La otra mutación del receptor de la leptina ha sido conocida como *cp*, *k*, o *fa^p*, esta es una mutación sin sentido en la tyr763 antes del dominio transmembrana (Takaya et al., 1996; Wu-Peng et al., 1997), el resultado es la ausencia del receptor para la leptina. Ambas mutaciones en el receptor son expresadas fenotípicamente como obesidad y con altos niveles de leptina normales circulantes en la sangre. Las ratas ZDF lleva la mutación *Lep^{fa}* o *Ob-R^{fa}* la cual es llamada únicamente *fa*.

6.2.2.4 Anormalidades pancreáticas

Muchas de las características de la diabetes tipo 2 encontradas en la rata ZDF son similares a las características de este padecimiento encontradas en humanos. Se ha encontrado anormalidades significativas en la estructura y función del páncreas. La mayoría de los estudios se han enfocado al páncreas y sus respuestas funcionales, antes y después de que la diabetes se ha iniciado. Los cambios observados han sido en los transportadores de glucosa (Unger, 1991), en la liberación de insulina, metabolismo de lípidos en los islotes (Unger, 1995), apoptosis de las células β , y otros mecanismos relacionados con la liberación de insulina.

6.2.2.5 Transporte de glucosa

Una de la hipótesis tempranas con respecto al desarrollo de diabetes en la rata ZDF fue relacionada con la baja expresión del transportador GLUT-2. La demostración de que el macho ZDF tenía poco transportador GLUT-2 en las células β sugirió que la Km de este estaba alterada y de esta manera la secreción de insulina estimulada por glucosa era defectuosa y no podía corregir la hiperglicemia (Johnson et al., 1990; Orci et al., 1990). En resumen,

cuando una reducción en la actividad del transportador GLUT-2 ocurre, las ratas ZDF desarrollan diabetes (Unger,1991a; Unger 1991b).

6.2.2.6 *Secreción de insulina*

Los estudios realizados sobre el transportador GLUT-2 involucrado en la liberación de insulina, y relacionando el nivel de GLUT-2 con los cambios en la liberación de insulina demostraron que existe una buena correlación entre la pérdida de transportador y la disminución en la liberación de insulina estimulada por glucosa (Milburn et al., 1993; Ohneda et al., 1993^a, Ohneda., 1993b).

6.2.2 *Diseño del estudio*

6.2.2.1 *Tratamientos*

Las ratas Zucker obesas (fa/fa) fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos:

- ❖ GRUPO CASEÍNA 20% (fa/fa): (grupo control)
- ❖ GRUPO SOYA 20% (fa/fa): (grupo experimental)

Durante el estudio las ratas se alimentaron *ad libitum*. Se les sacrificó en diversos intervalos de tiempo a lo largo del experimento: los días 0, 30, 60 90, 120 y 160 (ratas Zucker (fa/fa) durante los cuales se obtuvieron muestras de suero para la determinación de glucosa, colesterol, triacilgliceroles, insulina, glucagon y creatinina; orina de 24 horas para la determinación de proteínas totales, creatinina, nitratos y nitritos; tejidos para la cuantificación de la expresión del RNAm de PPAR- γ (adiposo), SREBP-1 (hígado, adiposo y músculo) CYP7A1 y ABCA1 (hígado), determinación del contenido de colesterol y triacilgliceroles (hígado) así como como para realización de estudios morfohistológicos (riñón) y de depósito de lípidos (hígado).

6.2.2.2 *Tipo de estudio*

El estudio fue experimental y longitudinal. El seguimiento de las ratas se realizó durante un periodo de 160 días.

6.2.2.3 *Consideraciones éticas*

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

6.2.3. *Dietas*

Las dietas a base de caseína o soya al 20% se prepararon de acuerdo a las proporciones de ingredientes señaladas en la tabla 4. Como fuente de proteína se utilizaron: caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad) y proteína aislada de soya Supro 710 (Protein Technologies International); almidón y dextrosa como fuente de hidratos de carbono; aceite de maíz (comercial) como fuente de lípidos; cloruro de colina. Para su preparación, los ingredientes se

homogenizaron en una mezcladora durante 20 minutos a velocidad 2 y se almacenaron a 4° C. Se les proporcionó a los animales en polvo seco en contenedores (comederos) de acero inoxidable.

Tabla 4. Contenido en nutrimentos de las dietas a base de caseína o soya al 20%

Ingrediente	Proteína de soya	Caseína
	gr/Kg de dieta	
Proteína de soya ¹	200.0	0.0
Caseína ²	0.0	200.0
Almidón ²	345.0	345.0
Dextrosa	345.0	345.0
Colina	1.65	1.65
Accite de maíz	50	50
Mezcla de minerales ³	50	50
Mezcla de vitaminas ⁴	10	10

1 Protein technologies, S.A. de C.V., México.

2 Tekland Test diets, Madison, WI.

3 Rogers-Harper, Teklad Test diets.

4 Mezcla de vitaminas, Teklad 40060 (mg/kg de dieta): 110 ácido p-amino-benzoico, 991 ácido ascórbico; 0.4 biotina; 30 vitamina B-12; 66 pantotinato de calcio; 3497 citrato de colina; 2 ácido fólico; 110 inositol; 99 niacina 22 piridoxina HCl; 22 riovoflavina; tiamina HCl 22; 40 palmitato de retinol; 4 colecalciferol; 242 acetato de α -tocoferol

6.2.4 Determinación del peso corporal

Desde el inicio del estudio (día 0) y hasta el final del mismo, las ratas se pesaron por las mañanas tres veces por semana en una báscula Sartorius (mod. BP-1200). Se tomó la lectura y se registró el peso en gr/día.

6.2.5 Determinación del consumo de alimento

Durante el todo el estudio se pesaron los comederos por las mañanas todos los días en una báscula Sartorius (mod. BP-1200). El consumo de alimento se registró en gr/24 horas, a partir de la diferencia del registro del peso del comedero del día anterior.

6.2.6. Obtención de tejidos

Las ratas se mantuvieron en ayuno de 12 horas previas a la decapitación. Se tomaron 500 mg de cada uno de los tejidos en el siguiente orden: hígado, adiposo y músculo. Se enjuagaron con solución salina (0.9%) fría, inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta el momento de la extracción de RNA total.

6.2.7. Obtención y procesamiento de muestras de sangre y orina

Las muestras de sangre se obtuvieron inmediatamente después de la decapitación y se recolectaron en tubos con gel (sin anticoagulante). Las muestras de orina se recolectaron en tubos falcon de 50 ml 24 horas antes del sacrificio; se transfirieron a tubos de vidrio de 13x100. Ambas muestras se centrifugaron a 4000 rpm 15 minutos. Se separó el plasma y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 ml a -70° C hasta la realización de las determinaciones.

6.2.8. Determinación de parámetros bioquímicos

Se realizaron las determinaciones séricas de glucosa, colesterol, triacilglicérolos por método enzimático con el analizador automatizado *Technicon ames RA-50 Chemistry Analyzer* y el *kit SERA-PAK* de BAYER. No catálogo 6676/6634/6635, 6670/6671, 6684/6687 respectivamente.

6.2.9. Extracción de lípidos de tejido hepático

La extracción de lípidos en tejido hepático se realizó por el método de Folch que consiste en homogenizar el tejido en una mezcla de cloroformo-metanol 2:1(v/v) y filtración del homogenado. Posteriormente, el filtrado, el cual contiene los lípidos del tejido acompañado de sustancias no lipídicas fue separado de estas sustancias al ponerse en contacto con agua (5 veces su volumen) (Folch et al., 1957).

6.2.10. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales en orina y suero se realizó espectrofotométricamente por el método de Lowry modificado (Lowry et al., 1952). Esta técnica utiliza como patrón albúmina sérica de bovino en concentraciones que van de 25 a 250 µg/ml. La técnica consta de dos fases: en la primera se forma un complejo de reacción proteína-cobre en solución alcalina y en la segunda el complejo se reduce con un reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin y Ciocalteu), produciendo un color azul cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra. Las unidades en que se reportaron los valores fueron mg/vol (orina) y g/dl (suero).

6.2.11 Creatinina y Depuración de creatinina (CrCl)

La creatinina excretada en orina proviene del catabolismo de fosfatos de creatina que están principalmente en músculo, por lo que es un parámetro que nos puede dar una buena aproximación del índice de masa corporal. Tanto la creatinina sérica como la urinaria se determinaron por un método colorimétrico con ayuda de un analizador 2 (Beckman, USA). Se utiliza el reactivo de Jaffé, el cual se basa en el aumento de la absorción por la formación de picrato de creatinina. Los resultados fueron reportados en mg/dl.

La depuración de creatinina es un parámetro que nos proporciona información sobre el estado del funcionamiento renal. Se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{CrCl} = \frac{\text{Creatinina urinaria (mg/dl)} \times \text{Volumen urinario (ml/24 horas)}}{\text{Creatinina sérica (mg/dl)}}$$

6.2.12 Determinación de Insulina

Las determinaciones hormonales (Insulina) en suero se realizaron por medio de radioinmunoensayo, *Rat Insulin RLA Kit*, de LINCO No de catálogos RI-13K.

6.2.13 Extracción de RNA total

El RNA total se aisló por una extracción de tiocianato de guanidina y por un gradiente de cloruro de cesio (Chirwin, et al. 1979; Glisin et al, 1974). Todas las soluciones y el material utilizados para la extracción del RNA estaban libres de RNAsas (tratamiento con dietil-piropiridato 0.1 %, DEPC, y esterilización a 180 C/4 horas respectivamente).

Se realizó extracción de RNA total homogenizando entre 0.5-1 gr de cada uno de los tejidos obtenidos de cada uno de los días de sacrificio del experimento (polytron PT-2000 velocidad 3) en solución desnaturizante (tiocianato de guanidina 4 M y β-mecaptoetanol). Una vez homogenizado completamente se agregaron 400 µl de sarcosil al 10% y se mezcló por inversión. Se centrifugó (J2-MC, rotor JA-20) 15min/18° C. El sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga (Beckman 331374) y se formó un gradiente con 4 ml de solución de

CsCl 5.7 M y se ultracentrifugó por 18 hrs/18C/29000 rpm en una ultracentrífuga (XL-90 rotor SW 40 Ti) . Se obtuvo un precipitado el cual se resuspendió en 600 µl de agua DEPC. Se precipitó el RNA durante 24 horas en etanol al 100% a -70° C. Transcurrido este tiempo se eliminó el etanol al 100% centrifugando 30 mint. 14000 rpm en una microcentrífuga y se lavó con etanol al 70 %. El precipitado se resuspendió en formamida.

6.2.13.1 Cuantificación del RNA total

Se cuantificó la concentración de RNA extraído con un espectrofotómetro (Beckman DU mod. 640) a 260/280 nm. Se tomaron 4 µl de RNA y 996 µl de buffer TE pH 7.5 en un tubo eppendorf, se mezclaron en vórtex y se cuantificó a 260 nm en celdas de cuarzo.

Para calcular la concentración del RNA :

1 D.O. ——— 40 µg de RNA

D.O. muestra ——— X µg de RNA

(X µg de RNA) (Factor de dilución (1:250) = X' µg de RNA /ml)

D.O. = densidad óptica

6.2.13.2 Electroforesis de RNA

Del RNA extraído (15 µg) se cargó en geles de agarosa al 1% (1 gr de agarosa,72 ml de agua DEPC,10 ml GRB 10X,18 ml de formaldehído al 40%) y se corrió a 10V/cm (100 volts) por 2.5 horas.

El RNA se transfirió a membranas de Nylon (Hybon N+) en solución SSC 20X (NaCl 0.15 M, Citrato de sodio 15 mM) por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron las membranas SSC 2X por 10 minutos y se dejaron secar en campana de extracción de 30-35 min. Se fijó el RNA a la membrana con UV a 700 lambdas en un crosslinker (Amersham, UK).

6.17. Northern blot

6.17.1 Preparación de sondas de DNA

Con el número de acceso proporcionado por la bibliografía se obtuvieron las secuencias de DNA de PPARγ, SREBP-1, FAS, CYP7 y ABCA1 (clonados en rata, ratón y hámster), y con el programa Oligo 5.0 se diseñaron los primers específicos con alta estringencia. (Tabla 5).

RT-PCR

El botón de RNA total (tejido adiposo, hígado y músculo) se resuspendió en agua-DEPC en un tubo microtubo.

RNA (0.66 µg/µl) 3 µl

Oligo dT 1µl

Agua DEPC 8 µl

Centrífugo e incubó en el Termociclador Perkin Elmer (mod. 9600) a 70 °C por 10 min. Se transfirió el tubo a hielo y se agregó al mismo:

Buffer de PCR (10X)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
DTT (0.1M)	2 µl

La reacción se incubó a 42 °C por 5 min. Se agregó 1µl de transcriptasa reversa (Seperscript II.GIBCO BRL, cat.18064-014) y se incubó nuevamente a 42 °C por 50 min y a 70 °C por 15 min Se colocó en hielo y se adicionó 1µl de RNAsa H, (GIBCO BRL, cat. 18021-071). Se incubó a 37 °C por 20 min. y se almacenó a -20 °C.

PCR

Se prepararon las sondas a partir del cDNA obtenido de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción: (por reacción)

Buffer de PCR (10X)	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
Mezcla de dNTP's (10mM)	1 µl
Upper primer (20µM)	1µl
Lower primer (20µM)	1µl
Taq DNA polimerasa	0.5 µl
Agua desionizada, estéril y filtrada	15.5µl
cDNA (producto de RT)	2.0 µl

Se centrifugo brevemente y se colocó en el temociclador con las siguientes condiciones:

1 Ciclo 95 °C 5 min.
 T.A., 1 min.
 72 °C 1 min. 30 seg.

33 Ciclos 95 °C 1 min.
 T.A. 1 min.
 72 °C 1 min 30 seg.

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

Nota: T.A. indica la temperatura de alineación

Electroforésis de los productos de RT-PCR

Todo el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% (con marcador de peso molecular XIV o con una escalera de DNA de 100 a 1500 bp de Boehringer Mannheim) a 95 volts por 45 min.

Electroelución de los productos de RT-PCR

Después del corrimiento se cortaron las bandas (correspondientes al peso molecular esperado) del gel (en el transiluminador). Se introdujeron los fragmentos del gel con las bandas a membranas de diálisis con buffer TAE 1X, se colocaron pinzas en los extremos de las membranas y se colocó nuevamente en la cámara de electroforésis a 95 volts por 45 min. En buffer TAE 1X. Posteriormente se invirtieron los polos por 1 minuto para despegar el producto de la membrana.

6.17.2 Hibridación del RNA con la sonda

La hibridación se realizó con el kit *rediprime™ II random prime labelling system* No. Catálogo RPN 1633/RPN 1634. Se prepararon las sondas (cDNA) para las hibridaciones con RT-PCR (kit Superscript) y PCR con primers de GIBCOBRL Custom Primers. Las secuencias de los primers utilizados para la preparación de las sondas se muestran en la tabla 5.

Prehibridación

La membrana se colocó en un tubo de hibridación y se puso en contacto con un buffer (15 ml) de prehibridación Rapid Hyb (Amersham Pharmacia Biotech, cat.1636) durante 1 hora a 65 C velocidad 5.

Marcaje de la sonda con ^{32}P

Se lleva la sonda de DNA a una concentración de 2.5 a 25 ng (diluida en buffer TE), se calienta a ebullición 5 min. y se mantiene en hielo 5 min. Se da un spin (centrífuga) por 4 seg. Se agrega toda la sonda al tubo de reacción de Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, cat. 1634). Se adicionan 4 μl de ^{32}P dCTP (Amersham Pharmacia Biotech. 3000 Ci/mmol, cat. AA0005) se mezcla hasta observar color violeta uniforme. Incubar 37° C/1 hora. Transcurrido el tiempo se agregan 5 μl de EDTA 0.2 M y se calienta a ebullición 5 min.

Hibridación

La sonda marcada se coloca en el fondo del tubo de prehibridación (que contiene la membrana prehibridada) adicionada conjuntamente con 500 μl del buffer de prehibridación (tomado del tubo de prehibridación). Se humedece la membrana y se deja hibridando a 65° C por 2.5 horas a velocidad 5.

Lavados

Se tomó la membrana hibridada y se lavó con solución (120 ml) 2XSSC/1X SDS a temperatura ambiente por 20 minutos. Se precalentó una solución (120 ml) 0.1XSSC/0.1XSDS a 65° C. Se lavó la membrana con esta solución incubándola a 65 C por 15 minutos (repetir el segundo lavado).

Se envolvió la membrana en papel de plástico y se coloca en un cassette de autorradiografía con una placa intensificadora de rayos X y se guarda a -70 °C. Transcurridas 24 horas se reveló la autorradiografía.

Tabla 5. Primers utilizados

Gen	Primer (5'-3')	Tamaño (bp)	Especie	No. acceso Gene bank
SREBP-1				
Sentido	TCCCAGAGTAGCCCCTTGTC	1008	Hamster	U09103
Antisentido	CCAGTCCCCATCCACGAA			
PPAR-γ				
Sentido	GTTGACACAGAGATGCCATTC	1145	Rata	Y12882
Antisentido	CAGCGACTGGGACTTTTCT			
ABCA1				
Sentido	GGAGGA GGA CGG CTT CAA T	1100	Rata	NM178095
Antisentido	CAG TAG GGC GGT TTT CAC AA			
CYP7A1				
Sentido	GGTCACGGAAGGGATGTA	1250	Rata	
AH002160				
Antisentido	ATCATGTAGTGGTGGCAAAT			
FAS				
Sentido	GCTTTGCTGCCGTGTCCTTT	793	Rata	X62888
Antisentido	GTGTCTGCTGGGGTCCTCGTT			

Abreviaciones: SREBP-1, proteína de unión al elemento regulador de esteroides; PPAR-γ, receptor del proliferador activado de peroxisomas; cassette de unión a ATP, CYP7A1, colesterol 7α hidroxilasa; FAS, sintasa de ácidos grasos

6.18 Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como las medias ± SEM (error estándar de la media). Los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías, teniendo como variables independientes al tiempo y al tratamiento dietario.

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

7. RESULTADOS

7.1 Consumo de alimento

El consumo de alimento en las ratas obesas alimentadas con ambos tipos de dieta fue muy similar (Fig 7), el promedio de consumo de las alimentadas con caseína y soya fue de 24.59 ± 2.18 y 24.92 ± 2.41 respectivamente. No hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

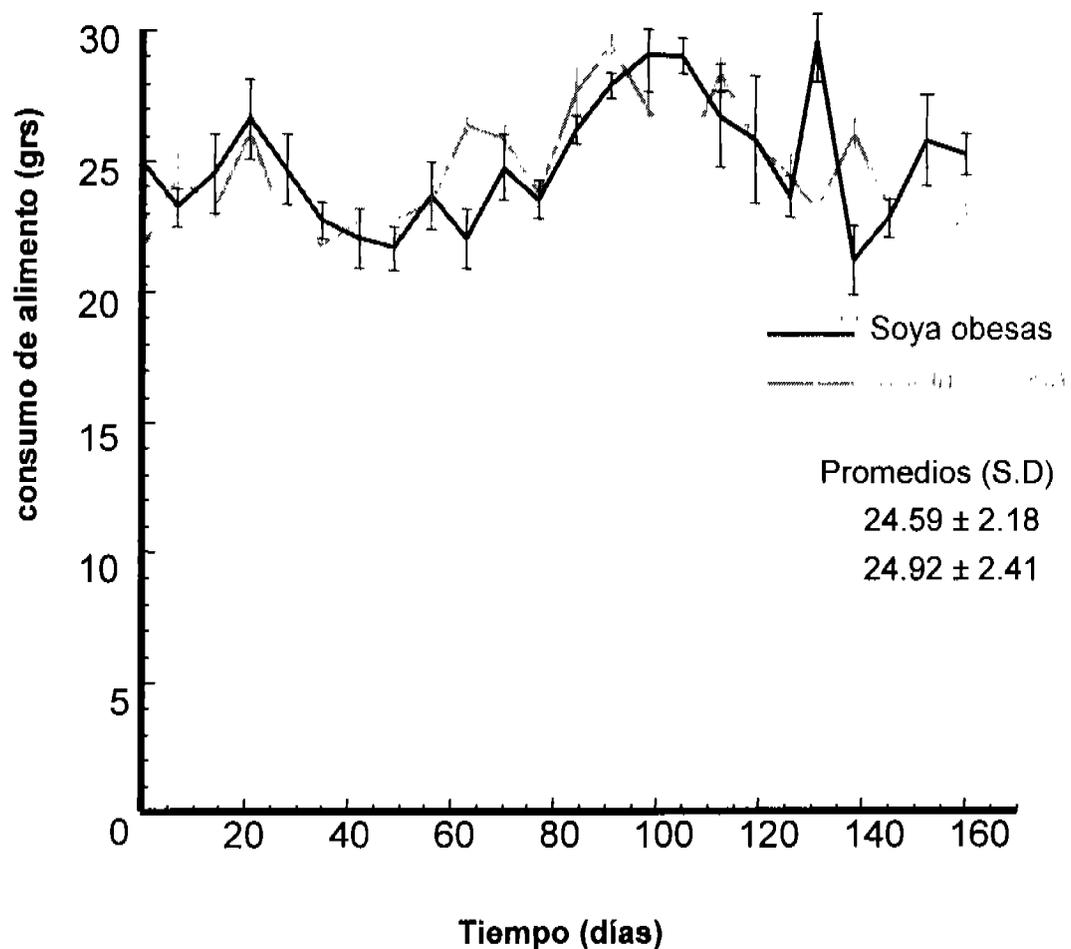


Figura 7. Consumo de alimento en ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% durante un periodo de 160 día (n=6)

7.2 Aumento de peso

Como se puede observar en la **figura 8**, las ratas Zucker obesas, la ganancia de peso de las alimentadas con caseína y proteína de soya fue igual hasta el día 140 de tratamiento. Sin embargo, hacia el día 150, las ratas alimentadas con caseína perdieron peso de manera significativa con respecto a las que fueron alimentadas con soya ($p= 0.004$). Al día 160, esta disminución de peso por las ratas alimentadas con caseína se hizo mas significativa ($p= 0.0004$). Las ratas obesas alimentadas con caseína alcanzaron un peso de $591.92 \text{ g} \pm 48.44$, mientras que las alimentadas con soya alcanzaron un peso de $686.63 \text{ g} \pm 21.62$, lo que indica que las ratas alimentadas con caseína tuvieron una ganancia de peso significativamente menor ($p= 0.0004$) que las alimentadas con soya. Esta disminución en el peso de las ratas obesas alimentadas con caseína se debió posiblemente a un mayor deterioro físico el cual se vió reflejado por la presencia de irritación de la piel, provocando pérdida de pelo por debilitamiento de los folículos pilosos así como desprendimiento de escamas con pigmentación ocre.

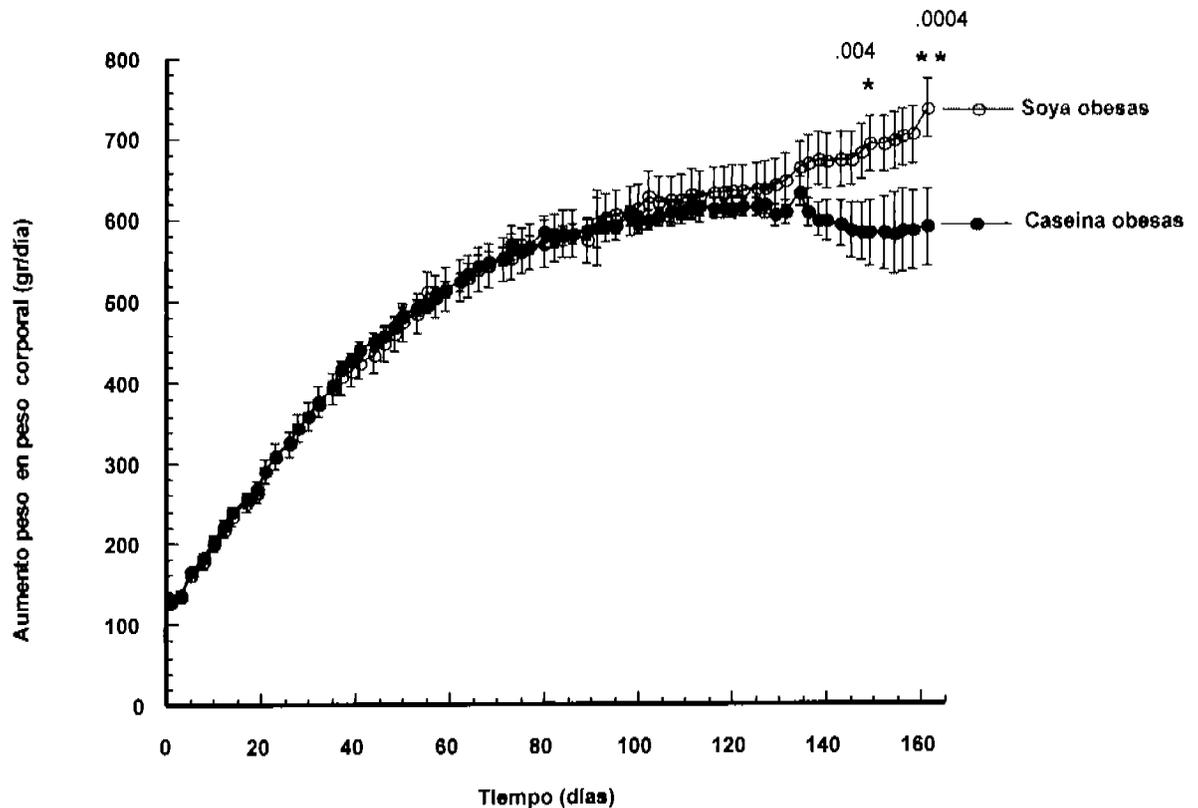


Figura 8 . Aumento de peso en ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% durante un periodo de 160 días ($n=6$).

7.3 Concentraciones de glucosa en suero.

En la **figura 9** se observa que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de glucosa en suero de ratas obesas alimentadas con caseína y soya a lo largo del tratamiento, a excepción del día 160 donde sí hubo una diferencia, aunque no significativa, entre ellas (135.5 ± 10 vs 168 ± 20.38).

Aunque no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa en el suero de las ratas obesas alimentadas con ambos tipos de dietas, se presentó una hiperglicemia moderada desde el inicio hasta el final del tratamiento.

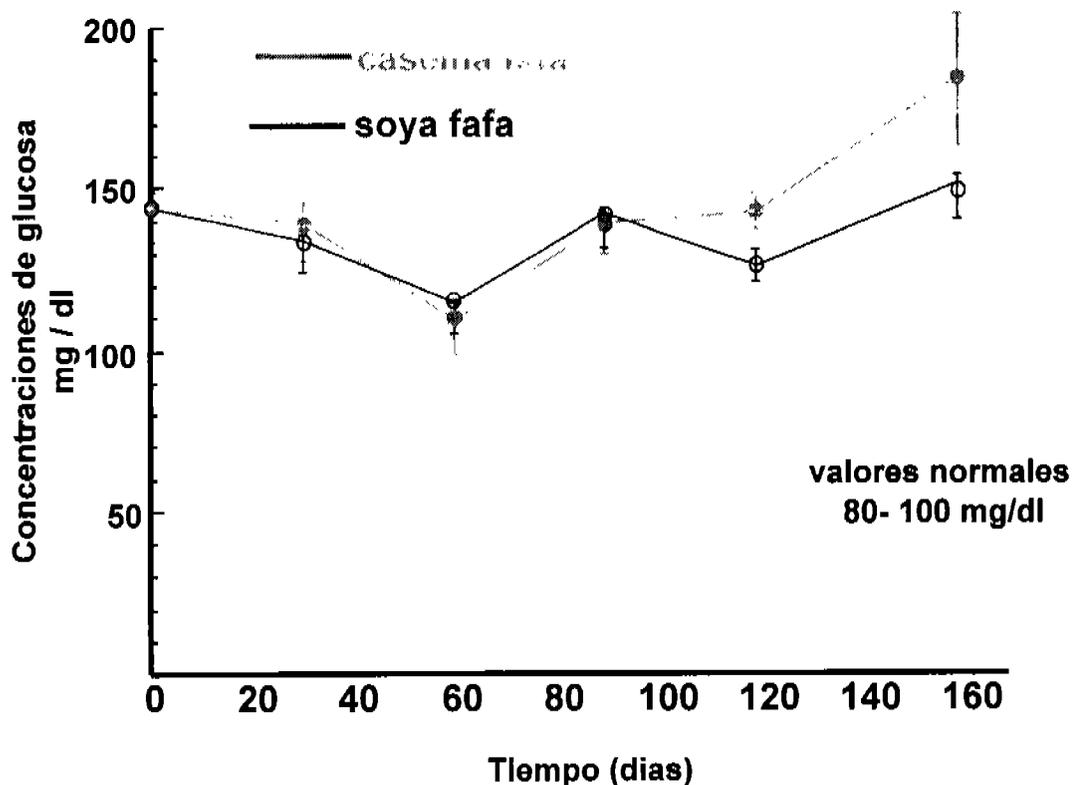


Figura 9. Concentración de glucosa en suero de ratas Zucker obesas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6).

7.4 Concentraciones de colesterol en suero.

En las ratas Zucker obesas, las concentraciones de colesterol fueron aumentando significativamente contra el tiempo en las ratas alimentadas con caseína, alcanzando un valor máximo el día 160 del tratamiento ($575 \text{ mg/dl} \pm 66$) indicando una hipercolesterolemia severa. Las ratas obesas alimentadas con proteína de soya presentaron valores que fluctuaban entre 52 mg/dL y el máximo de 175 mg/dL alcanzado el día 160. Por otra parte, hubo diferencia significativa en las concentraciones de colesterol entre las ratas obesas alimentadas con caseína y con proteína de soya a lo largo del tratamiento (días 30, 60, 90, 120 y 160). El consumo de proteína de soya redujo en un 48, 48 50, 60 y 70 % las concentraciones de colesterol durante estos días de tratamiento (**Figura 10**).

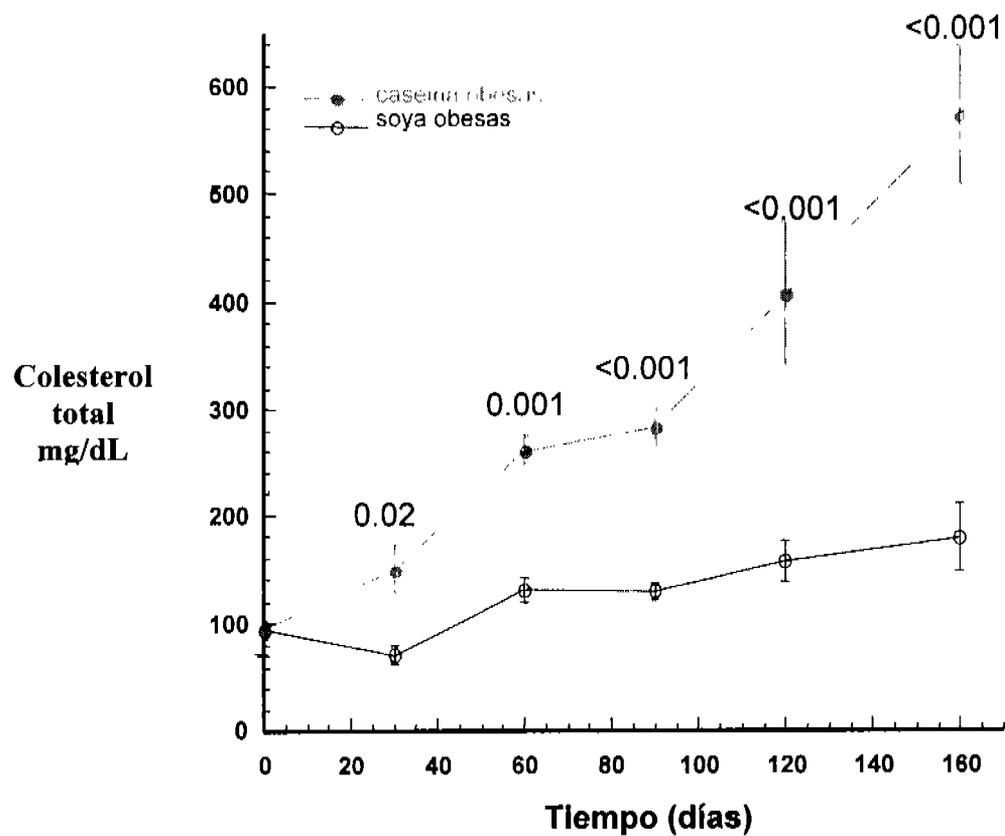


Figura 10. Concentraciones séricas de colesterol en ratas obesas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6).

7.5 Concentraciones de triacilglicérols en suero.

Con respecto a las concentraciones de triacilglicérols en las ratas Zucker obesas, no hubo una diferencia significativa en los días 30, 60 y 90 del tratamiento en las ratas alimentadas con caseína. Sin embargo, hubo un aumento significativo a partir del día 90 al 120 ($p < 0.03$), y del día 120 al 160 ($p < 0.0001$) alcanzando un valor máximo de $813.75 \text{ mg/dL} \pm 116.3$. En cuanto a las ratas obesas alimentadas con proteína de soya no hubo un cambio significativo

entre los días 30, 60, 90 y 120; sin embargo, a partir del día 120 al 160 hubo un aumento significativo ($p < 0.03$) alcanzando un valor de 457.5 mg/dL.

De esta manera, observamos que el consumo de proteína de soya redujo en un 43.77% la

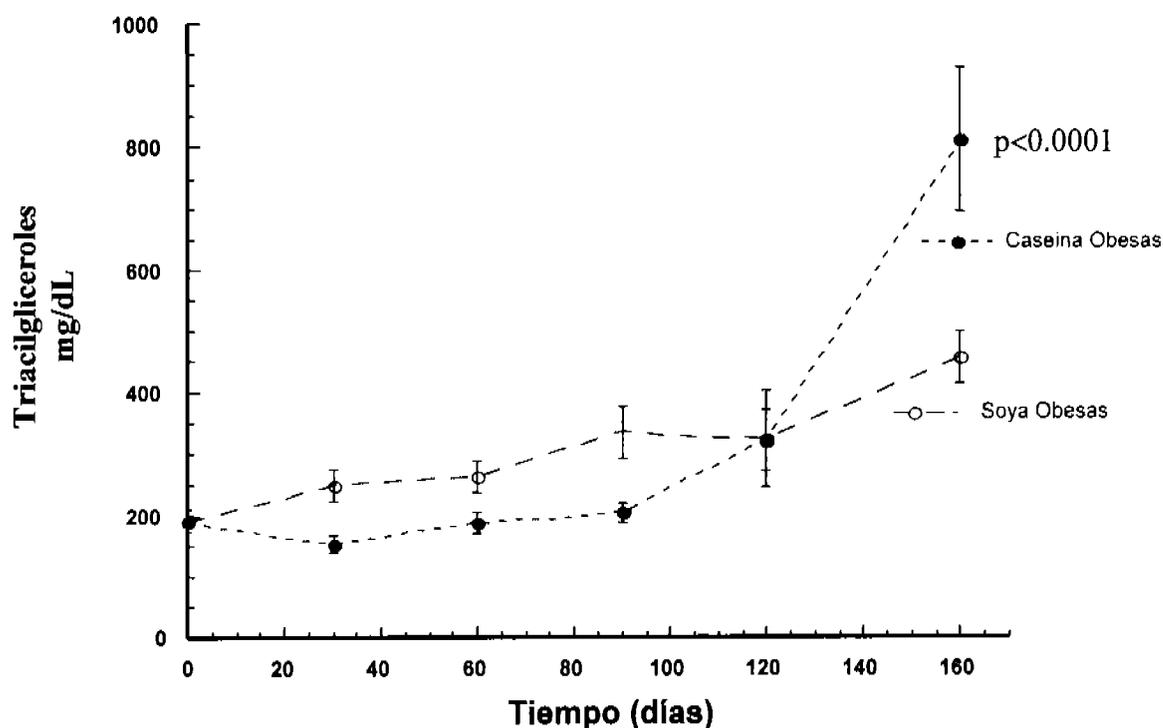


Figura 11. Concentraciones de triacilgliceroles en suero de ratas Zucker obesas y delgadas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6).

7.6 Concentraciones de insulina en suero.

En la **Fig. 12** se muestran las concentraciones de insulina en suero de las ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o proteína de soya. Se puede observar que la concentración de insulina en suero de las ratas alimentadas con proteína de soya fueron de 1.94 ± 0.234 ng/mL. Mientras que la concentración de insulina para ese día en las ratas obesas fue de 6.74 ng/ml ± 0.78 y de 7.13 ng/ml ± 1.45 para las ratas alimentadas con caseína y soya respectivamente, indicando hiperinsulinemia en estos grupos, ya que los valores normales de insulina son de $0.5 - 2$ ng/mL. También se puede observar que las ratas presentan hiperinsulinemia desde el inicio del tratamiento (5.52 ng/mL), alcanzando los máximos valores el día 90 de 12.36 ng/ml ± 0.67 y 10.93 ng/ml ± 0.63 en las alimentadas con caseína y soya respectivamente. A partir del día

90, las ratas obesas muestran una reducción en las concentraciones de insulina en los días subsecuentes (120 y 160) con valores de aproximadamente la mitad con respecto a los días anteriores.

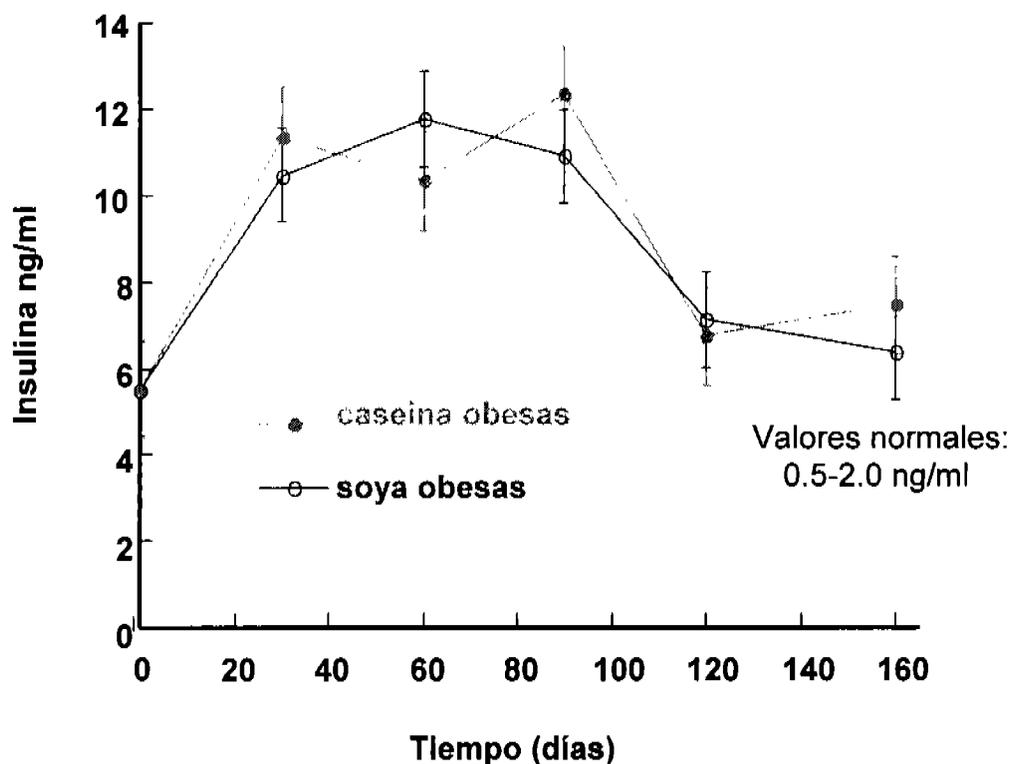


Figura 12. Concentraciones de insulina en suero de ratas Zucker obesas y delgadas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6).

7.7 Concentraciones de proteínas en orina.

La concentración de proteínas en orina en las ratas obesas alimentadas con caseína presentó una proteinuria considerable a partir del día 60 con valor de 75.0 mg /vol 24 horas y hacia el día 90 con 175 mg/vol 24h , alcanzando su máximo valor el día 120 con 300 mg/vol 24h , mientras que en las ratas alimentadas con soya el máximo valor que obtuvieron fue el día 160 con una concentración de 92.83 mg/ vol 24 hrs. Como se puede observar en la **Figura 13**, hubo una reducción en un 66.9% en la proteinuria en las ratas obesas alimentadas con soya.

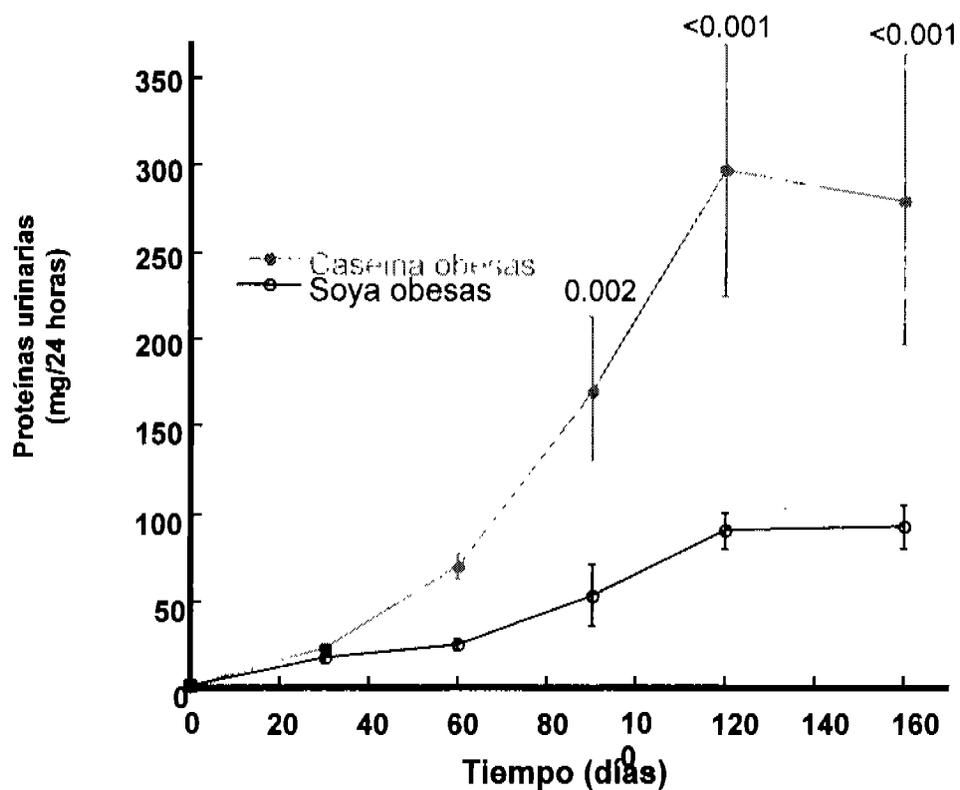


Figura 13. Proteínas totales en orina de ratas Zucker obesas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6).

7.8 Depuraciones de creatinina.

En la **Figura 14** se muestran las depuraciones de creatinina de las ratas Zucker delgadas y obesas alimentadas con caseína o soya. En las ratas obesas alimentadas con caseína o soya se presentaron valores de 1.4 ml/min al inicio del experimento, los cuales disminuyeron significativamente hasta 0.4 ml/min (día 30) sin presentarse diferencias significativas entre los dos grupos. Apartir de este punto los valores de las depuraciones de las ratas aumentaron hasta el final del experimento alcanzando valores máximos de 1 ml/min y 0.6 ml/min las alimentadas con soya y caseína respectivamente sin diferencias significativas. En este mismo grupo la única diferencia significativa se presentó el día 160 siendo mayor en las ratas alimentadas con soya.

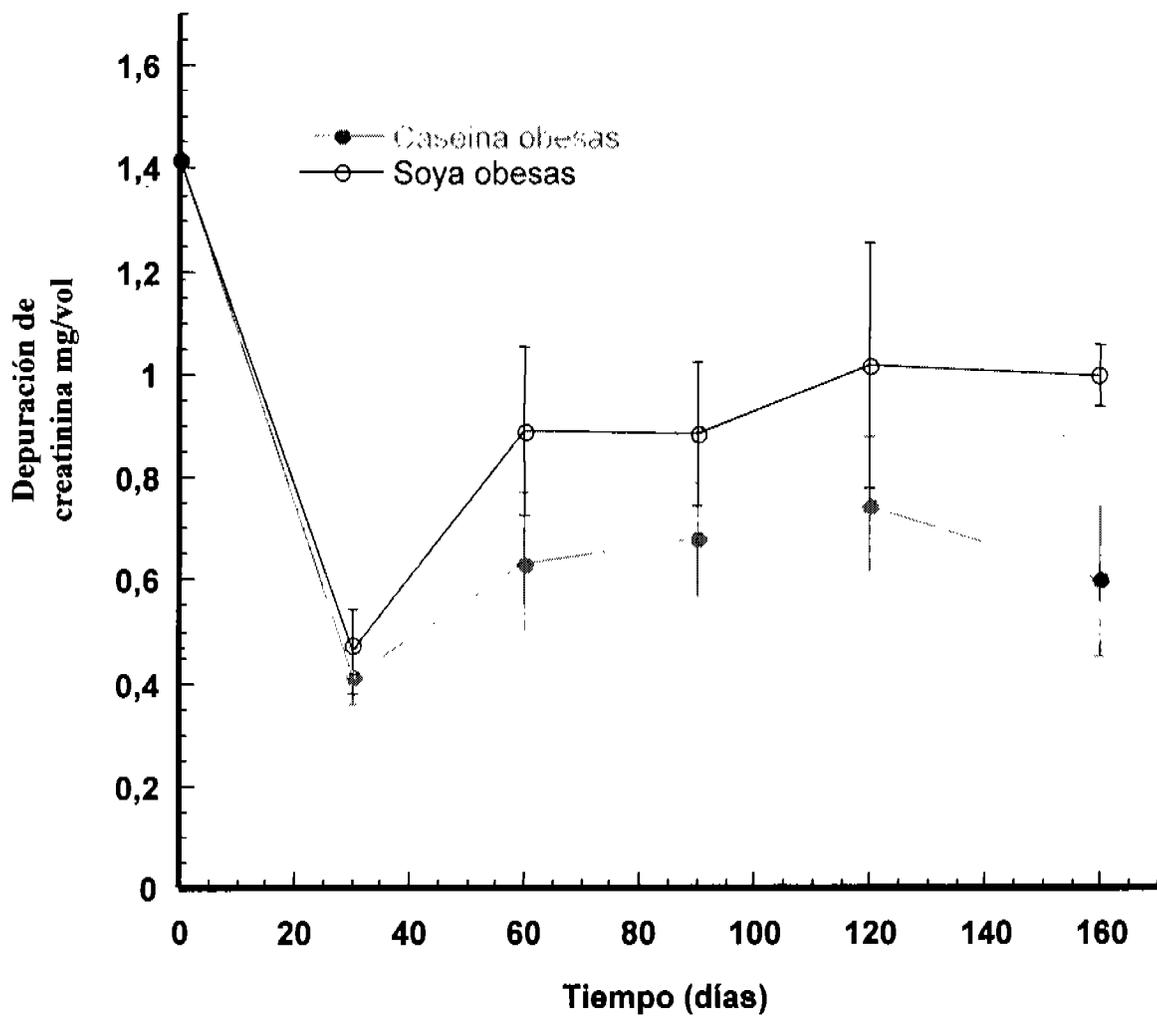


Figura 14. Depuración de creatinina en ratas Zucker obesas y delgadas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6).

7.9 Análisis histológico en tejido renal de ratas Zucker (fa/fa)

En la **Figura 15** se muestran cortes histológicos de tejido renal de las ratas obesas alimentadas con caseína (Figura 15A) o soya (Figura 15B) el día 160 del tratamiento. En la primera figura se observa que las ratas obesas alimentadas con caseína desarrollaron mayor esclerosis focal y segmentaria, y dilatación tubular. Este último hallazgo concuerda con el mayor porcentaje de proteínas encontradas en orina de 24 en este mismo grupo de ratas (Figura 13). En contraste, las ratas obesas alimentadas con soya dichas alteraciones histológicas estuvieron muy disminuidas, lo que concuerda con la menor proteinuria encontrada en estas mismas (Figura 13).

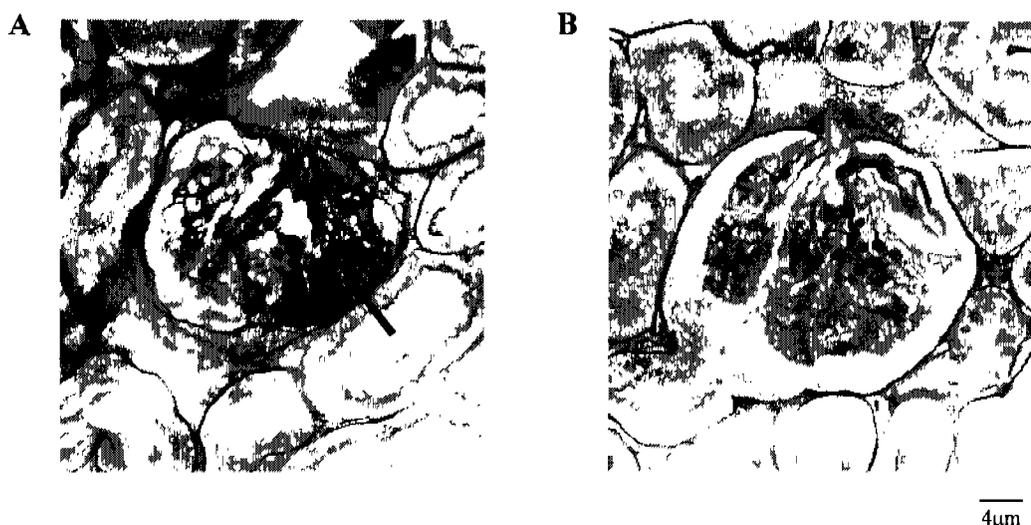


Figura 15. Análisis histológico para evaluar glomeruloesclerosis en ratas obesas alimentadas con caseína al 20 % A) o soya al 20% (B) (n=6).

7.10 Concentración de colesterol en tejido hepático de ratas Zucker (fa/fa).

El contenido de colesterol en el tejido hepático de las ratas Zucker obesas (fa/fa) alimentadas con dietas a base de caseína o soya se muestran en la **Figura 16**.

Al inicio del experimento las ratas alimentadas con caseína y soya mostraron el mismo contenido de colesterol (1.4 mg/gr de tejido), pero a partir del día 30 las ratas alimentadas con caseína mostraron una elevación en el contenido de colesterol significativamente mayor que las alimentadas con soya (8.4 mg/gr de tejido vs 2 mg/gr de tejido), lo mismo fue observado los días 60 y 90 del experimento, en el primer se alcanzaron los valores máximos para ambos grupos siendo mucho mayores los de las ratas alimentadas con caseína (11.8 mg/gr de tejido vs 5.8 mg/gr de tejido). En los días 30,60 y 90 se observaron las mayores deferencias significativas ($p < 0.001$). En los siguientes días, 120 y 160, se presentaron niveles menores a los anteriores pero siendo mayores en las ratas alimentadas con caseína así como, menores deferencias significativas. El día 160 se observa menor deferencia en el contenido de colesterol

en tejido hepático ($p < 0.03$). Por lo anterior, el consumo de proteína de soya redujo el contenido de colesterol en un 51% en tejido hepático de ratas obesas

7.11 Concentración de triacilgliceroles en tejido hepático de ratas obesas Zucker (fa/fa).

En la **Figura 17** se muestran las concentraciones de triacilgliceroles en tejido hepático de ratas Zucker obesas (fa/fa) alimentadas con caseína o soya. El día inicial del experimento las ratas alimentadas con ambas dietas mostraron las mismas concentraciones de triacilgliceroles (11.2 mg/gr de tejido), sin embargo los días subsiguientes, 30, 60 y 90, las ratas alimentadas con caseína mostraron un gran aumento en las concentraciones alcanzando valores máximos el día 60 (94 mg/gr de tejido) observándose en este la mayor significancia ($p < 0.001$). Por su parte las ratas alimentadas con soya mostraron valores significativamente menores en estos mismos días (24, 36 y 23 mg/gr de tejido respectivamente). Los días 120 y 160 las diferencias fueron las menos significativas. Por lo que nuevamente el consumo de proteína de soya redujo las concentraciones de triacilgliceroles en un 60% en tejido hepático de ratas obesas.

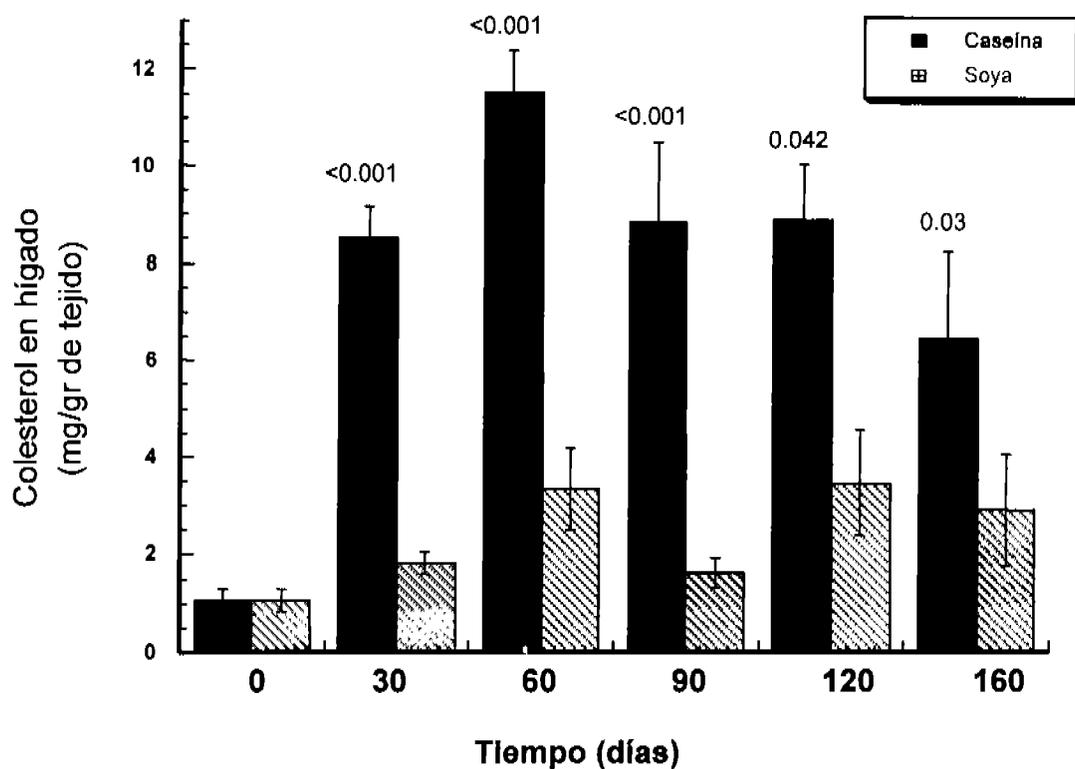


Figura 16. Concentración de colesterol en tejido hepático de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

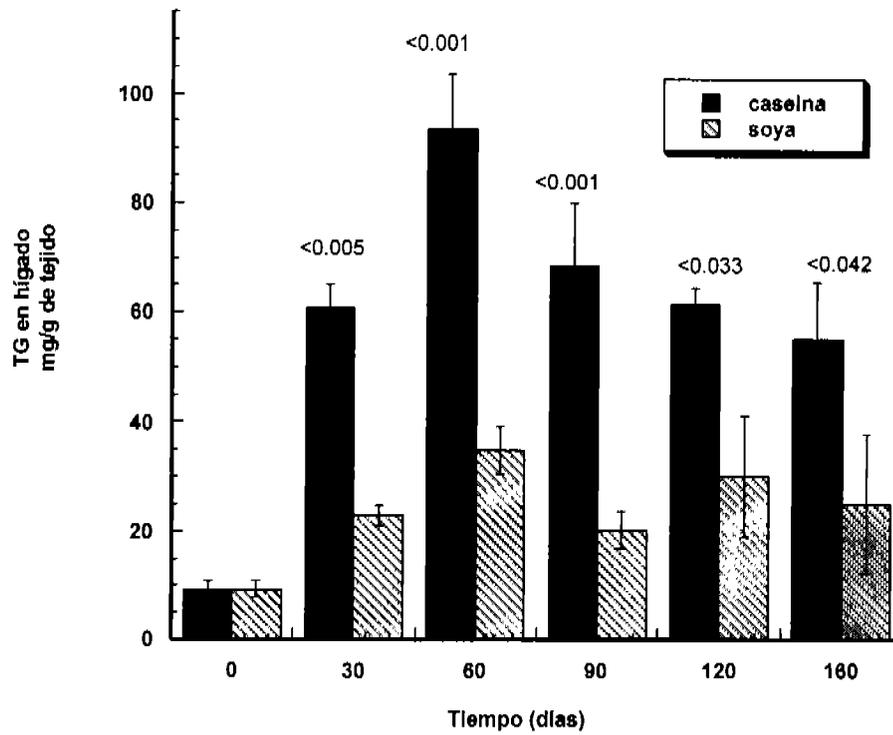


Figura 17. Concentraciones de triacilglicérols en tejido hepático de ratas Zucker obesas alimentadas con una dieta a base de caseína o soya al 20% (n=6)

7.12 Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en ratas obesas alimentadas con caseína o soya.

La homeostasis del metabolismo de lípidos se mantiene por una interacción entre diferentes proteínas y factores de transcripción responsables de la adquisición y eliminación de colesterol así como de la síntesis y oxidación de ácidos grasos. Con el objeto de poder elucidar el mecanismo por el cual la proteína de soya tiene un efecto hipolipemiante se estudiaron diferentes genes que participan en el metabolismo de lípidos en órganos que están involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina como son el hígado, el tejido adiposo y el músculo.

7.12.1 Hígado

7.12.1.1 Proteína de Unión a Elementos Regulados por Esteroles (SREBP)-1

El gen de SREBP-1 presentó un aumento en las ratas alimentadas con caseína a partir de los 30 días de estudio de 1.38 veces. En este grupo la expresión de este gen aumentó 4 veces a los 60 días de estudio con respecto al día 30 y continuó aumentando a lo largo del estudio hasta alcanzar una diferencia al final del estudio de 18.41 veces respecto al inicio y 7.2 veces respecto al día 30 de estudio (Figura 18).

En las ratas alimentadas con soya la expresión de este gen también mostró un aumento a partir del día 30 de 6.62 veces respecto al día 0, hasta un valor de 10.03 veces en el día 160. Los animales alimentados con soya mostraron una menor expresión hepática de SREBP-1 a partir del día 60 de estudio de 23% en comparación con caseína. Al final del estudio la expresión del factor de transcripción SREBP-1 fue 43% menor en el grupo de soya respecto a caseína.

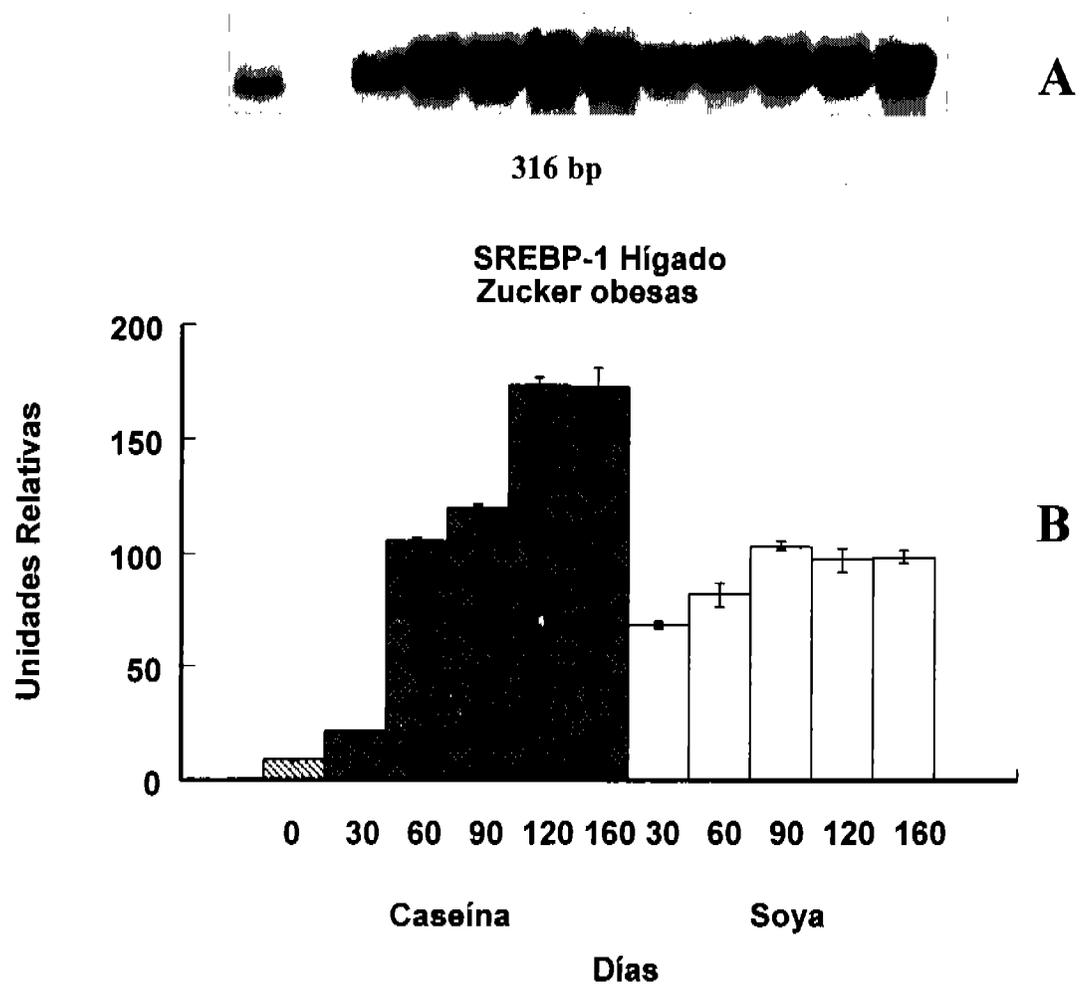


Figura 18 A) Expresión del RNAm de SREBP-1 y B) Unidades relativas de la abundancia del RNAm de SREBP-1 en hígado de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n= 6)

7.12.1.2 Sintasa de Ácidos Grasos (FAS)

Enzima que regula la lipogénesis de novo, catalizando todos los pasos en la conversión de malonil CoA a palmitato. La expresión de FAS en hígado de las ratas alimentadas con caseína aumentó 2.93 veces a los 30 días de estudio con respecto al inicio y continuó aumentando a lo largo del estudio hasta alcanzar una diferencia al final del estudio de 6.26 veces respecto al tiempo 0. La expresión de este gen en las ratas alimentadas con soya también mostró un aumento a partir del día 30 de 1.37 veces respecto al día 0, hasta 4.84 veces en el día 160.

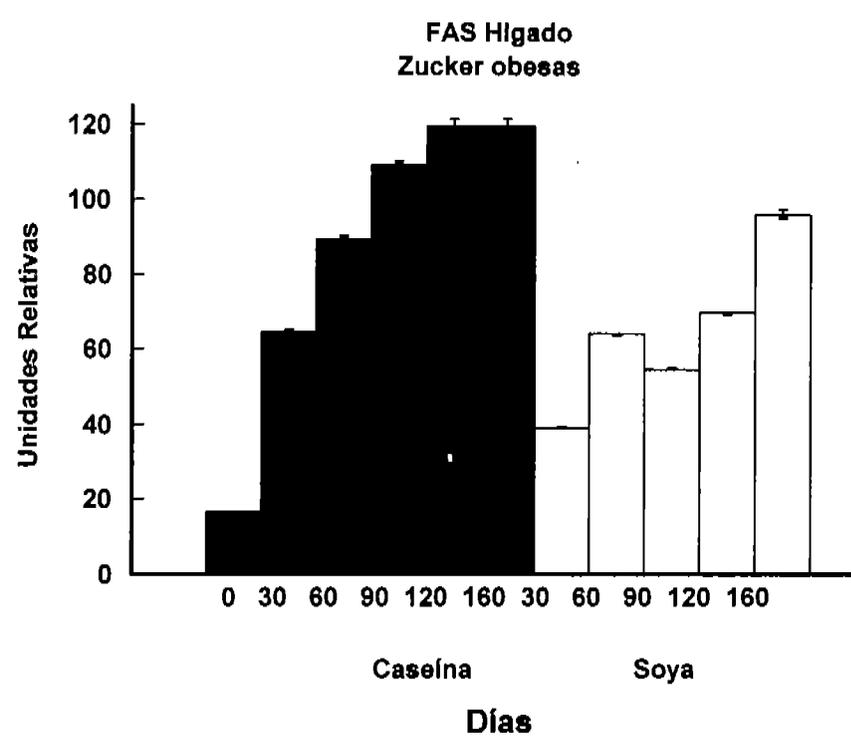
Los animales alimentados con soya mostraron una menor expresión hepática de FAS a lo largo del estudio en comparación con caseína. Esta diferencia se observa a partir de los 30 días de estudio, siendo 40% menor que caseína. La mayor diferencia en la expresión del gen lipogénico FAS se encontró a los 90 días de estudio, siendo 50% menor en el grupo de soya respecto al grupo de caseína. Al final del estudio la expresión de FAS fue menor en el grupo de soya en un 20% (Figura 19).

Esta enzima se encontró mayormente expresada en animales alimentados con caseína en comparación con los animales alimentados con proteína de soya. El aumento en SREBP-1 se vio reflejado en un aumento en la expresión de FAS. Estos resultados concuerdan adecuadamente ya que el gen de la FAS tiene elementos de respuesta para SREBP-1.



A

9121 bp



B

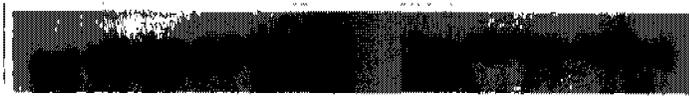
Figura 19 A) Expresión del RNAm de la FAS y B) Unidades relativas de su abundancia en hígado de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

7.12.1.3 7 α -hidroxilasa de colesterol (CYP 7A1)

La 7 α -hidroxilasa de colesterol (CYP7A1) es la enzima limitante de la ruta clásica que convierte colesterol en ácidos biliares y de esta manera se pueda eliminar colesterol del cuerpo. La expresión de CYP7 en hígado de las ratas alimentadas con caseína aumentó 6.95 veces a los 30 días de estudio con respecto al inicio y en adelante comenzó a disminuir a partir del día 60. Al final del estudio la expresión de este gen fue 2.98 veces mayor al tiempo 0 y 51.4% menor al día 30. La expresión de este gen en las ratas alimentadas con soya también mostró un aumento a partir del día 30 de 1.61 veces respecto al día 0, hasta 2.54 veces al final del estudio.

Los animales alimentados con soya mostraron una menor expresión de CYP7 en hígado a lo largo del estudio en comparación con los animales alimentados con caseína, con una expresión 67.2% menor a los 30 días y 11.07% menor al final del estudio.

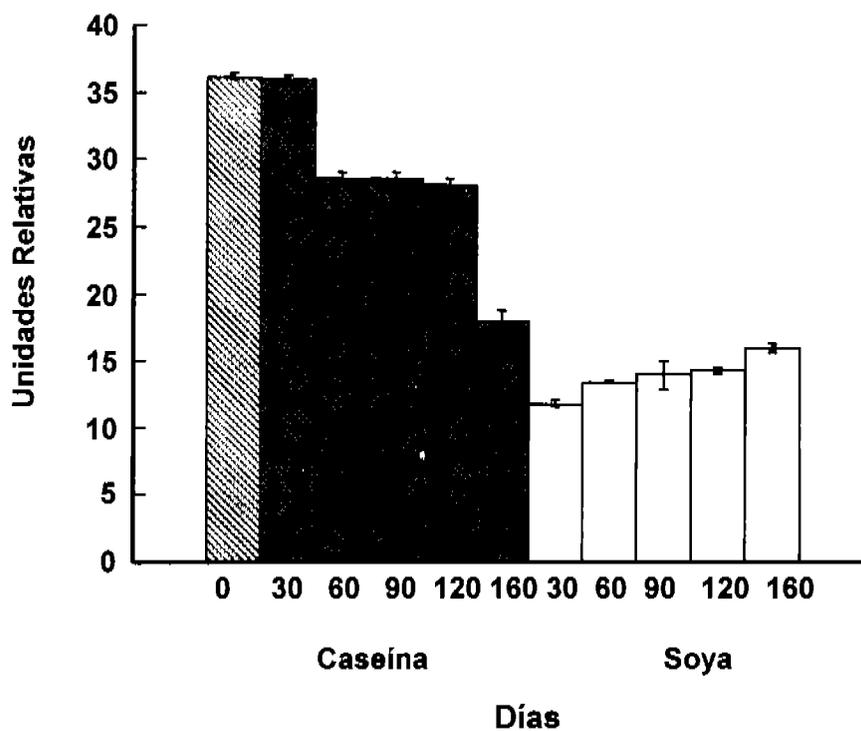
La expresión de este gen se vio mayormente expresada en ratas alimentadas con caseína que con soya. Estos resultados indican que existe mayor necesidad de eliminar colesterol en las ratas que presentan mayor concentración de colesterol como lo es el caso de las ratas alimentadas con caseína. Esto concuerda con el hecho de que los animales alimentados con caseína presentan mayor concentración de colesterol en el suero y en el hígado lo que induce la expresión de CYP 7 (Figura 20).



3535 bp

A

CYP 7 Hígado
Zucker obesas



B

Figura 20 A) Expresión del RNAm y B) Unidades relativas de su abundancia en hígado de ratas Zucker alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

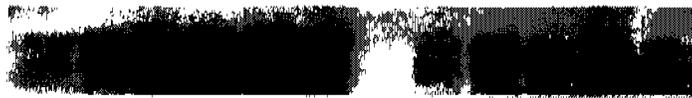
7.12.1.4 ABCA-1

Los transportadores ABC son proteínas transmembranales que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para mover sustratos a través de las membranas celulares. El transportador ABCA-1 facilita el transporte reverso de colesterol. En el intestino, el transportador ABCA-1 no permite que el colesterol se absorba y lo bombea de regreso hacia el lumen. En los macrófagos, el transportador ABCA-1 saca el exceso de colesterol de estas células para que no se formen células espumosas promotoras de la aterogénesis y el colesterol sea eliminado a través de las HDL.

La expresión de ABCA1 en hígado de las ratas alimentadas con caseína aumentó 19.84% a los 30 días de estudio con respecto al inicio y continuó aumentando a lo largo del estudio hasta alcanzar una diferencia al final del estudio de 9.26 veces respecto al tiempo 0. La expresión de este gen en las ratas alimentadas con soya también mostró un aumento a partir del día 30 en un 13.95% respecto al día 0 y 10.91% al día 160.

Los animales alimentados con soya mostraron una menor expresión hepática de ABCA1 a lo largo del estudio en comparación con caseína. A los 90 días de estudio, la diferencia entre caseína y soya fue 1.2 veces y al final del estudio la diferencia fue 8.25 veces.

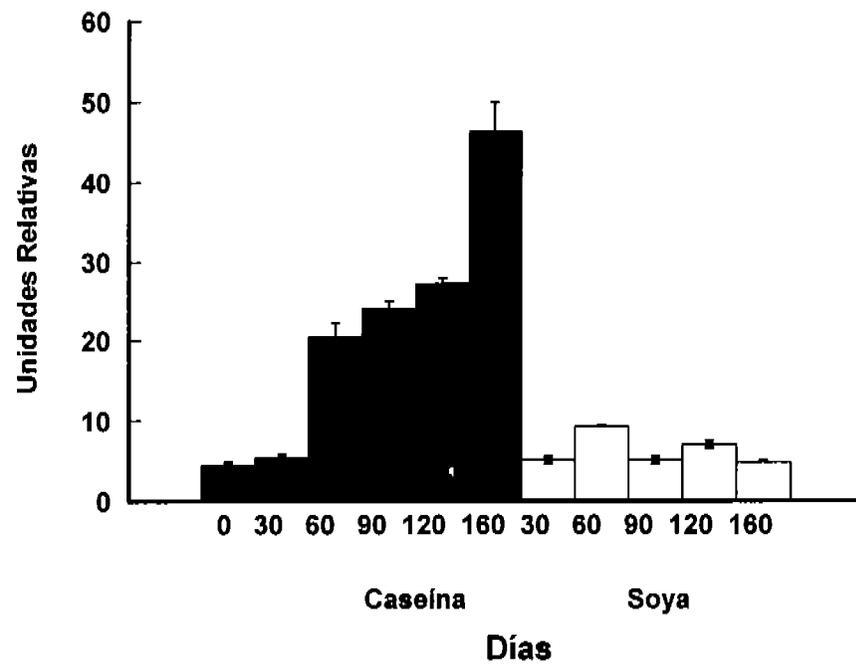
Como se puede ver, la presencia de este transportador se va induciendo conforme pasa el tiempo en los animales alimentados con caseína, sin embargo esto no se observa en los animales que son alimentados con proteína de soya. Estos resultados nos indican que el transportador es regulado por el tipo de proteína en la dieta, que la presencia de este transportador en el hígado podría tener un papel de eliminar el exceso de colesterol del hígado hacia la formación de la bilis y por último que los animales alimentados con proteína de soya debido a que presentan menos acumulación de colesterol en el hígado no necesitan de la inducción de este transportador para eliminar colesterol (Figura 21).



A

7873 bp

ABC A1 Hgado
Zucker obesas



B

Figura 21 A) Expresión del RNAm de ABCA1 y B) Unidades relativas de su abundancia en hígado de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

7.12.2 Tejido Adiposo

7.12.2.1 Proteína de Unión a Elementos Regulados por Esteroles (SREBP-1)

La expresión de SREBP-1 en tejido adiposo del grupo alimentado con caseína aumentó 40% a los 30 días de estudio con respecto al inicio y continuó aumentando a lo largo del estudio hasta alcanzar una diferencia de 3.15 veces en el día 160 respecto al tiempo 0. La expresión de este gen en las ratas alimentadas con soya también mostró un aumento a partir del día 30 de 20.4% respecto al día 0, hasta 43.4% al final del estudio.

Los animales alimentados con soya mostraron una menor expresión en tejido adiposo de SREBP-1 a lo largo del estudio en comparación con los animales alimentados con caseína, con una expresión 14% menor a los 30 días y 65% menor al final del estudio. Es importante señalar que la expresión de SREBP-1 en el día 160 fue ~ 10% mayor en el grupo alimentado con soya con respecto al grupo alimentado con caseína (Figura 22).

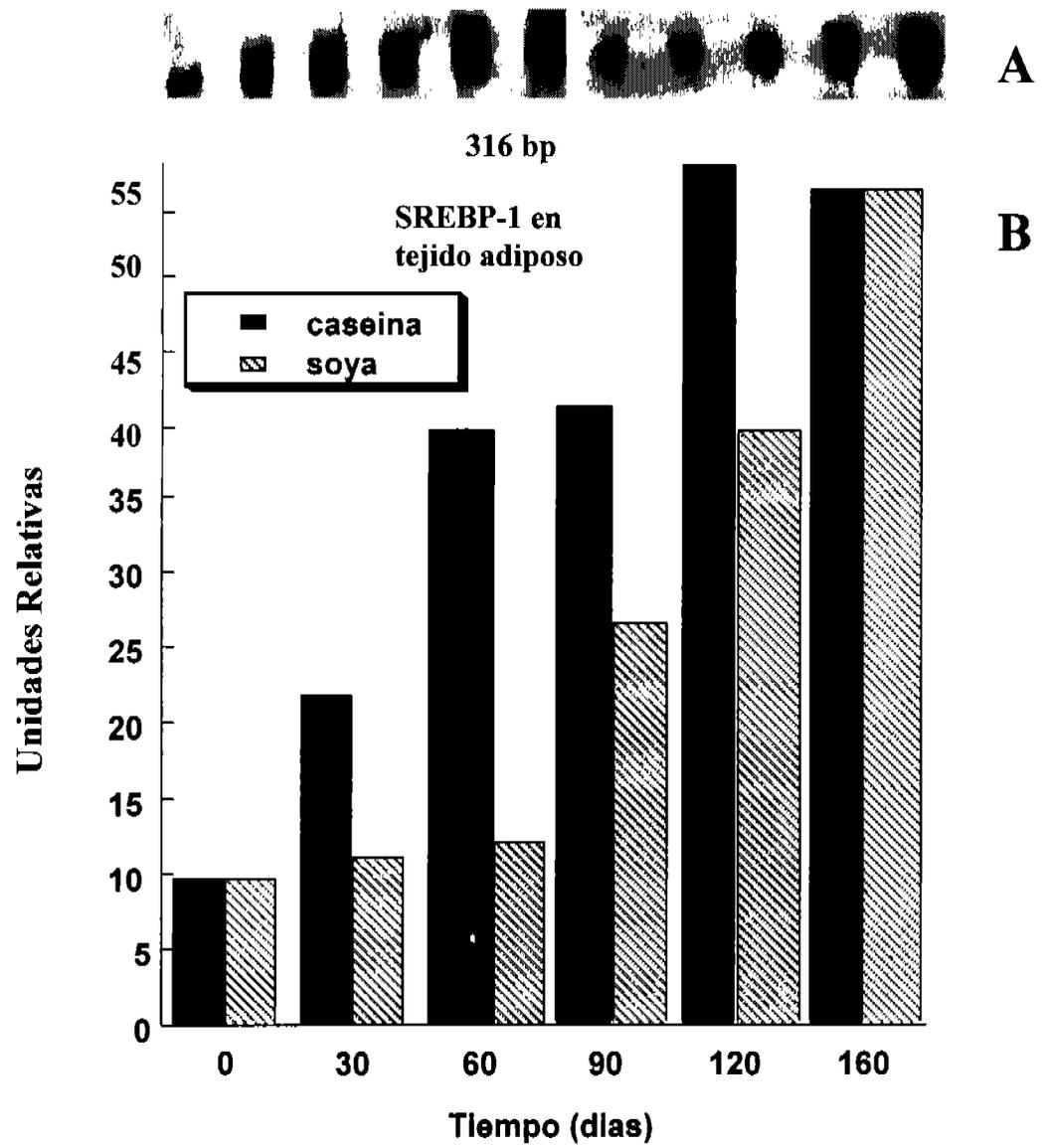


Figura 22 A) Expresión del RNAm de SREBP-1 y B) Unidades relativas de su abundancia en tejido adiposo de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

7.12.2.2 Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR- γ)

La expresión de PPAR γ en las ratas alimentadas con caseína mostró una expresión constante desde el día 0 hasta el día 90. A partir de este día su expresión se incrementó un 20% hasta el final del estudio.

En el grupo de ratas alimentadas con soya la expresión fue menor desde el día 30 (~ 50% menos con respecto al día 0) desde el inicio hasta el final del mismo, observándose una menor expresión el día 160 (~ 4 veces menos).

Finalmente, la expresión de PPAR γ en el grupo de animales alimentados con soya al 20% fue 2 veces menor que el grupo alimentado con caseína, a lo largo de todo el estudio (Figura 23).

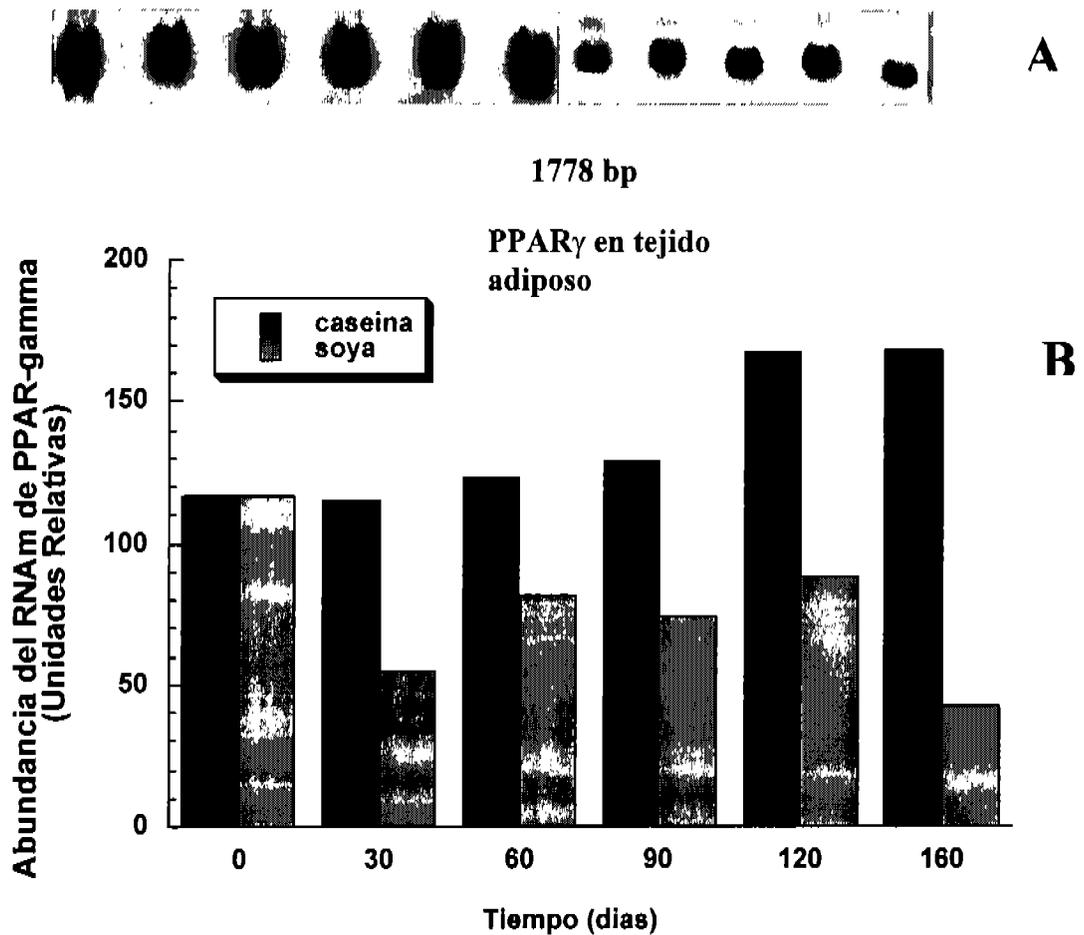


Figura 23 A) Expresión del RNAm de PPAR- γ y B) Unidades relativas de su abundancia en tejido adiposo de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20% (n=6)

7.12.3 Músculo

7.12.3.1 Proteína de Unión a Elementos Regulados por Esteroles (SREBP-1)

La expresión del RNAm de este factor transcripcional en este tejido muscular (Figura 24) fue mayor en las ratas obesas alimentadas con soya en comparación con las alimentadas con caseína (1.5 veces). Este comportamiento se observó en los días 90,120 y 160 . En los días 30 y 60 , el grupo de ratas alimentadas con caseína mostró una mayor expresión de SREBP-1 (~ 2 veces).

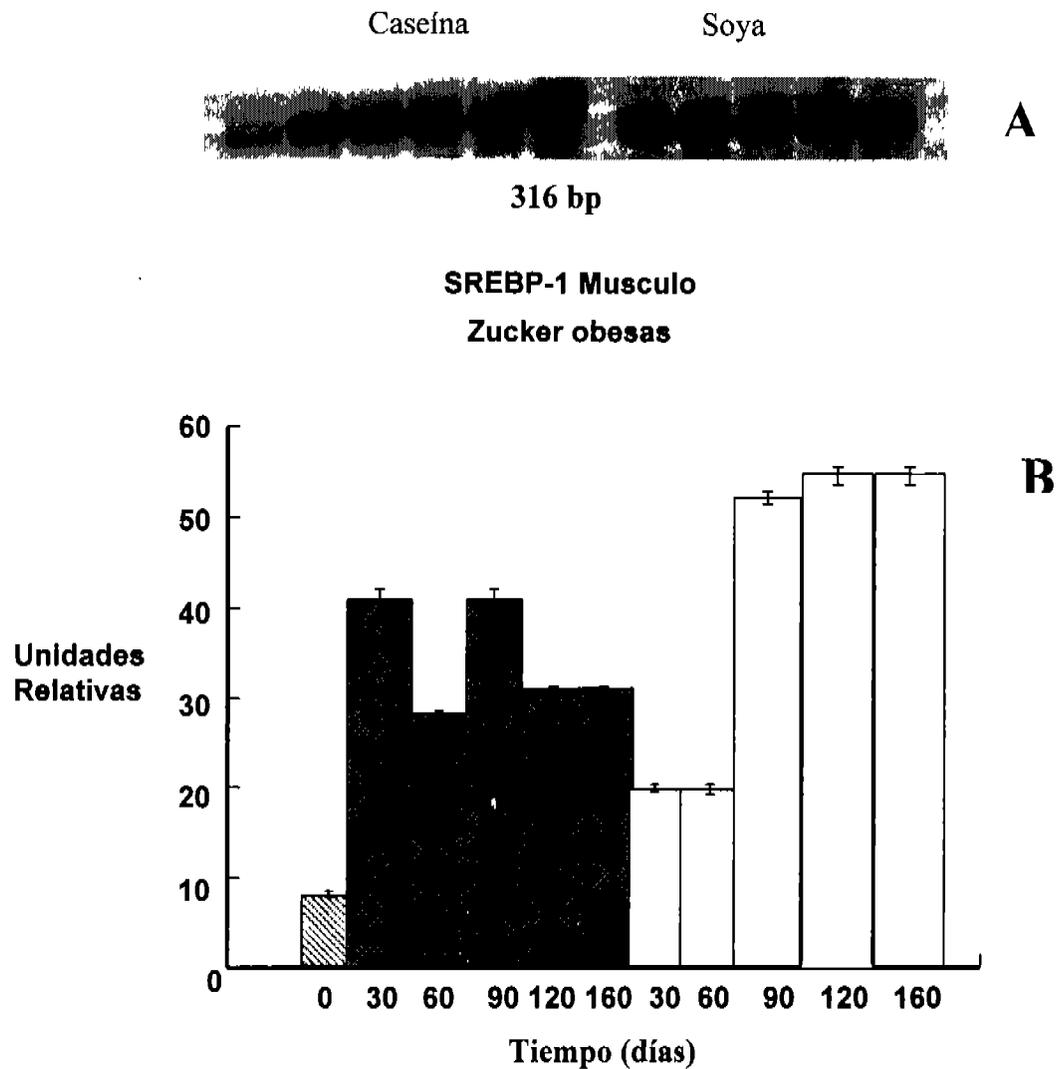


Figura 24 A) Expresión del RNAm de SREBP-1 y B) Unidades relativas de su abundancia en músculo de ratas Zucker obesas alimentadas con caseína o soya al 20%(n=6)

8. DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el consumo de una dieta a base de proteína de soya sobre la expresión de varios factores transcripcionales y proteínas involucradas en la obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. En recientes estudios se han proporcionado evidencia de que el consumo de soya mejora algunos de las alteraciones asociadas con la diabetes tipo 2.

La patogénesis de la diabetes tipo 2 es aún desconocida y es el resultado de la combinación de defectos genéticos, factores nutricionales y ambientales. Dentro de los principales factores de riesgo se encuentra la obesidad. En el sujeto obeso con diabetes tipo 2 se presenta hipertrigliceridemia donde sucede una hiperglicemia ligera acompañada de hiperinsulinemia. En estas condiciones ocurre un incremento en los ácidos grasos libres circulantes, particularmente en la fase posprandial, que en presencia de concentraciones altas de insulina y una sensibilidad hepática conservada hacia la misma, favorece el aumento de la síntesis y secreción de VLDL con la consecuente elevación de triacilgliceroles en plasma. El exceso de ácidos grasos en el plasma promueve la conversión de parte de ellos en colesterol y fosfolípidos. Estos dos últimos junto con el exceso de triacilgliceroles formados al mismo tiempo por el hígado se eliminan a la sangre en las lipoproteínas.

En la diabetes que cursa ya con un descontrol metabólico crónico, la hipertrigliceridemia se genera por un aumento en la producción hepática de las VLDL, con una disminución en su depuración, al igual que de los quilomicrones y de sus remanentes (Lerman, 1994).

En este trabajo se estudió el efecto de una dieta a base de proteína de soya al 20% sobre las alteraciones que se presentan en la diabetes tipo 2, utilizando a la rata obesa diabética Zucker (fa/fa). En este mismo modelo estudiamos el efecto que el consumo de esta proteína ejerce sobre la expresión de distintos genes que están involucrados en el metabolismo de lípidos así como en la resistencia a la insulina.

Partiendo de lo anterior, encontramos que el consumo de alimento entre los grupos de ratas obesas a quienes se les suministró las dietas a base de caseína o soya al 20% por un periodo de 160 días, no fue significativamente diferente entre ellos así como tampoco hubo diferencias en el aumento de peso de ambos grupos. Debido a esto, podemos afirmar que las diferencias observadas en los parámetros bioquímicos, hormonales y moleculares en el estudio no se deben a diferencias en la cantidad de alimento consumido por los animales en los dos tipos de dieta.

Es importante señalar que la rata obesa Zucker desarrolla hiperfagia severa debido a una mutación en el receptor de la leptina por lo que se hubiera esperado una mayor ingesta de alimento en este modelo con el consecuente aumento en el peso, sin embargo esto no sucedió así. Con respecto a lo anterior se ha reportado que la rata Zucker obesa puede desarrollar obesidad en ausencia de hiperfagia (Cleary, 1980).

Una observación importante fue que al final del tratamiento (a partir de los días 150 al 160) las ratas obesas alimentadas con caseína disminuyeron significativamente en comparación con las

alimentadas con soya esto se debe a que con la ingestión de proteína de origen animal, caseína, las ratas obesas se deterioraron más que las alimentadas con soya.

De acuerdo a las concentraciones de glucosa en suero, las ratas mostraron una hiperglicemia moderada sin diferencias significativas entre los dos tipos de dieta. De manera similar, aunque los animales mostraron una hiperinsulinemia severa, no se encontraron diferencias entre los dos grupos.

Efecto de la ingesta proteína de soya sobre las concentraciones de colesterol y triacilglicérol en suero y tejido hepático

La ingesta de proteína de soya redujo de manera significativa las concentraciones de colesterol en el suero de las ratas obesas. En este grupo la proteína de soya fue capaz de mantener los niveles de colesterol casi normales (ligeramente por arriba de los valores normales); no así, con el consumo de la dieta a base de caseína los niveles de colesterol fueron muy elevados. Por lo que la dieta a base de proteína de la soya tiene efecto hipocolesterolémico en comparación con la caseína, la cual mostró ser hipercolesterolémica. Nuestros resultados son compatibles con otros estudios (en diferentes modelos de animales y en humanos) en los cuales el consumo de dietas a base de caseína mostró ser más hipercolesterolémico que el consumo de dietas a base de proteína de soya. La proteína de soya también redujo los niveles de triacilglicérol en suero de las ratas obesas de manera significativa.

En este estudio se observó que el consumo de proteínas de distinto origen (animal y vegetal) tiene diferentes efectos sobre las concentraciones séricas de colesterol, lo cual puede ser explicado por la hipercolesterolemia severa que desarrolla el modelo obeso en comparación con las ratas delgadas, quienes no la desarrollan. Así, la disminución en las concentraciones séricas de colesterol cuando la proteína animal se sustituyó por proteína de la soya fue mayor en los animales hipercolesterolémicos que en los normocolesterolémicos, como ha sido reportado por otros (Carrol, 1995).

Durante el desarrollo y progresión de la obesidad y diabetes tipo 2 existe un gran incremento en el aporte de ácidos grasos del tejido adiposo (como resultado de un aumento en la lipólisis) al hígado, en donde se almacenan como triacilglicérol. A su vez estos ácidos grasos se utilizan también para sintetizar colesterol (y fosfolípidos) por lo que éste lípido también se acumula en este órgano.

Los efectos de los diferentes tipos de dieta se vieron reflejados también en el contenido de lípidos en el tejido hepático de las ratas obesas. El contenido de colesterol y triacilglicérol en hígado de las ratas obesas alimentadas con soya fue significativamente menor que el contenido de estos en las ratas alimentadas con caseína. Los lípidos representan el 5% del peso del hígado normal, cuando se supera esta cantidad, se acumulan en este tejido forma de vesículas grasas (principalmente triacilglicérol) y dan lugar a esteatosis saginativa (producida por una oferta aumentada de triacilglicérol). De ahí que el contenido de triacilglicérol en el grupo de ratas obesas sea diez veces mayor con respecto al contenido de colesterol en este mismo grupo.

Si bien, en el grupo de ratas que consumieron soya, la acumulación de lípidos hepáticos fue significativamente menor, significa que esta proteína ejerce sus efectos benéficos sobre las concentraciones plasmáticas de una cantidad importante de ácidos grasos libres, disminuyendo

de esta manera la acumulación de lípidos en el hígado de estas ratas. Esto no sucede con el grupo de ratas que consumieron caseína, las cuales mostraron gran acumulación de lípidos hepáticos.

Es importante mencionar que el efecto benéfico de la proteína de la soya sobre el contenido de lípidos en las ratas obesas fue mayor al inicio del tratamiento y disminuye paulatinamente hacia el final del mismo, por lo que podemos afirmar que este retarda la acumulación de lípidos en este tejido.

Efecto de la ingesta de la proteína de soya sobre la función renal

Aunado sus propiedades hipocolesterolémicas e hipotriglicéridémicas, la proteína de la soya también mostró un efecto protector sobre el daño renal que se presenta como una de las principales complicaciones de la diabetes tipo 2. Esto es demostrado por la reducción en la proteinuria en las ratas alimentadas con proteína de la soya en comparación con las alimentadas con caseína, estas últimas desarrollaron mayor esclerosis focal y segmentaria así como dilatación tubular.

Hay varias razones para proponer que la proteína de la soya ejerza efecto protector sobre la función renal. En primer lugar, a través de su contenido en fitoestrógenos (~ 2 mg de isoflavonas/gr) que a demostrado reducir los niveles de colesterol en suero al actuar de manera similar a los estrógenos (D'Amico et al. , 1992). En segundo lugar, su composición en aminoácidos, alto en arginina y glicina, pueden inducir una baja relación insulina/glucagon posprandial que ha sido asociada a niveles de colesterol bajos (Sánchez et al. , 1991). Finalmente, las propiedades antioxidantes de la daizeína y genisteína (principales isoflavonas de la proteína de la soya) pueden reducir el daño renal protegiendo a las lipoproteínas de densidad media (LDL) de la oxidación, aunque dicha capacidad es limitada (Barnes et al. , 2000).

De manera adicional, en este estudio las ratas alimentadas con proteína de la soya mostraron una mejor depuración de creatinina en comparación con las ratas alimentadas con caseína. Estos hallazgos no concuerdan con los reportados por otros en los que no se encontraron diferencias en la depuración de creatinina en ratas (Maddox et al, 2002) y en humanos con diabetes tipo II (Anderson et al. , 1998) que consumieron dietas a base de caseína o soya. Sin embargo sus resultados no fueron concluyentes.

En resumen, nuestro estudio indica que la progresión del daño renal es disminuída por el consumo de proteína de la soya en las ratas Zucker obesas, como es demostrado por la reducción en la proteinuria, una mejor depuración de creatinina y reducción en la esclerosis focal y segmentaria así como menor dilatación tubular. Lo anterior ocurrió a pesar de que ambos grupos (caseína y soya) tuvieron una ingesta y ganancia de peso similares. Además, como resultado de la reducción en el daño renal, las concentraciones de colesterol total y triacilglicérols en suero fueron también reducidas.

Efecto de la proteína de la soya sobre la expresión de los RNAm de SREBP-1, CYP7, FAS y ABCA1 en hígado

La conversión de colesterol a ácidos biliares en el hígado y su excreción a través de estos últimos para su eventual eliminación en las heces fecales son las dos principales rutas por medio de las cuales se elimina el exceso de colesterol del organismo. En estudios recientes, se ha demostrado que los ácidos biliares no únicamente sirven como los detergentes biológicos que facilitan la absorción, transporte y distribución de vitaminas liposolubles y grasas dietarias, sino que también funcionan como moléculas de señalización que activan receptores nucleares y regulan el metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares (Chiang, 1998; Lu, 2000). Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado, excretados hacia la vesícula biliar, reabsorbidos en el íleon y transportados de regreso al hígado por la circulación portal para inhibir la síntesis de ácidos biliares suprimiendo a la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7).

Uno de los receptores que participan en el metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares es el receptor hepático X (LXR α) quien es activado por los oxisteroles, derivados de las rutas biosintéticas del colesterol y los ácidos biliares y que funcionan como potentes ligandos para este receptor hepático. LXR α induce de esta manera genes involucrados en el transporte reverso del colesterol, entre los que se encuentra el transportador ABCA1 (Schroepfer, 2000), en el control de la lipogénesis y en la homeostasis de colesterol en hígado. Su activación in vivo induce la expresión de su gen blanco SREBP-1 e incrementa los niveles de triacilglicérols plasmáticos. Por otro lado, la expresión de FAS, enzima central en la ruta de lipogénesis de novo cataliza todos los pasos en la conversión de malonil-CoA a palmitato y es un gen blanco de SREBP-1, es también inducida por ligandos para LXR α . Finalmente, la activación de este receptor induce la expresión de la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa incrementando la excreción de ácidos biliares.

En este trabajo encontramos que el consumo de proteína de soya redujo la expresión en el hígado de las ratas obesas de FAS 37% en promedio, SREBP-1 62%, ABCA1 28% y CYP7 en 52 %.

Con respecto a la expresión del RNAm de SREBP-1 en este modelo, en recientes estudios se ha mostrado que su expresión en hígado de ratones ob/ob quienes desarrollan profunda resistencia a la insulina, no está alterada (Shimomura, 2000) como lo está en el tejido adiposo. Sin embargo, se sabe que la selectiva desregulación de SREBP-1 en este último tejido durante la obesidad puede promover la producción y liberación de ácidos grasos libres hacia otros tejidos como páncreas, músculo o hígado en donde a través de "lipotoxicidad" dañen la acción y/o secreción de insulina (Unger, 2000) alterando así la expresión de genes que dependen de insulina, como el SERBP-1.

A pasar de esto último, el hallazgo importante fue que la expresión de SREBP-1 en hígado de las ratas obesas que consumieron soya se redujo (62%) así como la expresión de la FAS (37%) en comparación con las que consumieron caseína, por lo que la soya está regulando a SREBP-1 y de manera indirecta a FAS, reduciendo la lipogénesis en este tejido. Esta reducción concuerda con el menor contenido de lípidos (colesterol y triacilglicérols) observado en el hígado de las ratas obesas que consumieron soya así como con la reducción en los niveles plasmáticos de triacilglicérols en este mismo grupo.

El papel central de ABCA1 en la formación de HDL's indican su efecto antiaterogénico especialmente en macrófagos (Aiello, 2002); en células cargadas de colesterol es inducida su expresión como resultado de la activación del heterodímero LXR/RXR. A su vez, con la activación de este heterodímero también se estimula la expresión de CYP7. Con respecto a esto, es importante señalar que como resultado de la reducción de la hipercolesterolemia también se presentó una disminución de las enzimas responsables de la síntesis de ácidos biliares (CYP7) y de transporte reverso de colesterol (ABCA1).

Efecto de la proteína de la soya sobre la expresión de los RNAm de SREBP-1 y PPAR- γ en tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido altamente especializado que tiene un papel importante en la homeostasis de energía. El papel principal de este tejido es almacenar triacilgliceroles en periodos de exceso de energía para luego liberarlos cuando se produce un déficit de la misma. La diferenciación de adipositos es un proceso complejo acompañado de cambios en la morfología celular, en la sensibilidad a hormonas y en la expresión de genes. Estas acciones resultan de la cooperación de las actividades de varios factores transcripcionales entre los que se encuentran PPAR- γ y SREBP-1, que son inducidos en estadios tempranos de la adipogénesis.

Se conoce que la expresión de SREBP-1 incrementa la actividad transcripcional de PPAR- γ e incrementa el porcentaje de células que sufren diferenciación (Spiegelman, 1996). La coexpresión de SREBP-1 con PPAR- γ promueven la producción endógena de ligandos para PPAR- γ vía transcripción a través de motivos E-box (Kim, 1998). Dichos ligandos pueden ser derivados de ácidos grasos de origen endógeno o de origen exógeno. Este último origen depende de la dieta, el estado fisiológico y de la tendencia genética a desarrollar obesidad y diabetes.

La expresión de SREBP-1 en el tejido adiposo de las ratas obesas mostró mayor expresión en las ratas alimentadas con caseína que las alimentadas con soya (40% menor.) Esta inducción en la expresión de SREBP-1 fue independiente de insulina ya que los dos grupos de animales desarrollaron hiperinsulinemia. Por lo tanto, este factor se ve regulado en hígado (figura 18) y en tejido adiposo (figura 22) pero no en músculo (Figura 24), indicando que su regulación es tejido específica.

Por otro lado, la expresión de PPAR- γ en el tejido adiposo es la encargada del mantenimiento de un adiposito maduro y funcional. Este trabajo, encontramos que la expresión de PPAR γ en el tejido adiposo de las ratas obesas alimentadas con caseína fue mucho mayor que su expresión en los animales alimentados con soya a lo largo del estudio.

Algunas investigaciones se han enfocado a estudio de las isoflavonas (principalmente la genisteína y la daizeína) de la soya como agentes hipolipemiantes debido a su actividad antioxidantes y estrogénicas. En algunos estudios se ha eliminado la fracción de isoflavonas que contiene la soya resultando en la pérdida de su actividad benéfica sobre los lípidos plasmáticos, sin embargo, recientes estudios han reportado efectos mínimos de las isoflavonas

aisladas de la soya sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos (Gardner, 2001; Simons, 200). Debido a la evidencia no concluyente, es posible que las isoflavonas ejerzan algunos de sus efectos benéficos principalmente cuando forman parte de la soya intacta.

Nosotros encontramos en este estudio que las ratas alimentadas con proteína de la soya la expresión de PPAR- γ en tejido adiposo fue menor 2 veces (~ 50% menor a su expresión en las ratas alimentadas con caseína) que las ratas alimentadas con caseína.

En hallazgos recientes se ha mostrado que la genisteína de la soya a bajas concentraciones ($\leq 1\mu\text{M}$) actúa como estrógeno, estimulando la osteogénesis e inhibiendo la adipogénesis, y a altas concentraciones ($> 1\mu\text{M}$) actúa como un ligando para PPAR- γ , conduciendo a un aumento en la adipogénesis y disminución de la osteogénesis (Dang, 2002). Por otro lado, expresión de PPAR- γ podría ser el resultado de su expresión compartida con otros tejidos involucrados en la resistencia a la insulina, como hígado y músculo, en los cuales su expresión es de 10-30 veces menor que en tejido adiposo.

Partiendo de que la concentración mínima de ligando necesario para activar a PPAR γ es de $\geq 1\mu\text{M}$ y tomando en cuenta que la concentración aproximada de isoflavonas en la dieta de soya proporcionada a los animales en este estudio fue de 2 mg/100gr, la reducción en la expresión de este factor en el grupo alimentado con soya podría ser el resultado de la acción conjunta de la proteína de la soya junto con este componente.

Una observación interesante en este estudio fue que el consumo de la dieta a base de la proteína de soya redujo la expresión del RNAm de SREBP-1 (40%) en tejido adiposo de las ratas obesas durante la mayor parte del tratamiento de manera paralela a la reducción en la expresión de PPAR- γ (50%).

Efecto de la proteína de la soya sobre la expresión de SREBP-1 en músculo

La expresión de SREBP-1 en músculo de ratas diabéticas está disminuída. Sin embargo, como en el hígado y en el tejido adiposo su expresión requiere de la presencia de la insulina (Guillet-Deniau, 2001). En nuestro estudio, nosotros encontramos un ligero incremento en la expresión de este factor de transcripción en el grupo de ratas alimentadas con soya. Sin embargo este no fue significativo. Además observamos una expresión menor en este tejido con respecto a su expresión en hígado.

El efecto de la proteína de la soya sobre SREBP-1 en músculo no parece tener algún efecto importante, aunque sería necesario evaluar la expresión de genes del metabolismo de lípidos y glucosa (FAS, hexocinasa II) y su regulación por parte de la proteína de la soya, para establecer el efecto de esta última sobre su expresión en este modelo.

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que el consumo de una dieta con 20% de proteína de soya ejerce un efecto benéfico en el metabolismo de los ácidos grasos y colesterol. Su efecto hipolipemiante es mediado por la interacción de diferentes factores transcripcionales involucrados en la síntesis de ácidos grasos, captura de colesterol y síntesis de ácidos biliares:

El consumo de soya al 20% reprime por un lado la biosíntesis de ácidos grasos mediada por la FAS, es de esta manera que disminuyen las concentraciones de triacilglicérols en hígado. Lo anterior ocasiona una reducción en las concentraciones de colesterol y triacilglicérols tanto en suero como en hígado (disminución en la esteatosis).

Al disminuir la hipercolesterolemia, disminuyen las enzimas responsables de la síntesis de ácidos biliares (CYP7) y del transporte reverso del colesterol (ABCA1).

En tejido adiposo, el consumo de proteína de soya disminuye la expresión de SREBP-1 reprimiendo la lipogénesis.

Finalmente, el efecto hipolipemiante de la proteína de la soya se vió reflejado en la disminución de la glomerulosclerosis y depósito de proteínas en los túbulos renales, mejorando la función renal mediada por la depuración de creatinina.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J.W., Blake, J.E., Turner, J., and Smith, B.M. (1998) Effects of soy protein on renal function and proteinuria in patients with type 2 diabetes. *Am J.Clin Nutr.* 68: 1347S-1353S.
- Anderson, J.W., Smith, B.M. and Washnock, C.S. (1999) cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am.J.Clin.Nutr.* 70:464S-474S.
- Anderson, R.L., and Wolf, W.J. (1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J.Nutr.* 125: 581S-588S.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes C. L., Morgan, T.M., Burke, G.L. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripuberal rhesus monkeys. *J. Nutr.* 126: 43-50.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Weddle, D.L., Wolfe, M.S. (1995) Effects of soy protein phytoestrogen on cardiovascular risk factors in rhesus monkeys. *J Nutr.* 125: 803S (asb).
- Arjamandi, B.H., Alekel, L., Hollis, B.W. et al (1996) Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J.Nutr.* 125: 161-167.
- Ascherio, A., and Willett, W.C. (1995) New directions in dietary studies of coronary heart disease. *J.Nutr.* 125: 647S-655S.
- Azzout-Marniche, D., Bécard, D., Guichard, C., Foretz, M et al. (2000) Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP 1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem.*350: 389-393.
- Bakhit, R.M., Klein, B.P., Essex-Sorlie, D., et al. (1994) Intake of 25 gr of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* 124:213-222.
- Barroso, I. et al. (1999) Dominant negative mutations in human PPAR-gamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus, and hypertension. *Nature* 402: 880-883.
- Berger, J., Bailey, P., Biswas, C., et al. (1996) Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor gamma: binding and activation correlated with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology.* 137:4189-4195.
- Beynen, A.C. (1990) Comparison of the mechanism proposed explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36:S87-S93.

Brown, MS and Goldstein, JL. (1997) The SERBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340.

Brown, MS; and Goldstein, JL. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci* 96:11041-11048.

Carol, J; Sinha, M; Kolaczinski, J; et al (1996) Leptin: details of an obesity gene. *Diabetes* 45; 1455-1462

Carroll, KK, Huk, MW, Roberts, DCK. (1979) Vegetable protein and lipid metabolism. In: *Soy protein and human nutrition*. pp.261-280. Academic Press, New York.

Carroll, K.K., Kurowska, E.M. (1995) Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *J. Nutr.* 125: 594S-597S.

Carroll, KA. (1991) Review of clinical studies on cholesterol lowering response to soy protein. *J Am Diet Assoc* 91:820-827.

Chawla, A., Boisvert, WA., Lee, C., Laffite, BA., Barak, Y., Joseph, SB et al. (2001) A PPAR-gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7:161-171.

Chirwin, JJ; Przybyla, AE, MacDonald, RJ, Rutter, WJ. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 18:5294-5299.

Dwyer, J. (1995) Overview: Dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *J.Nutr.* 125: 656S-665S.

Fan, W., Boston, BA et al (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 385: 165-168.

Fernández-Mejía, C. (1996) Biología molecular de la diabetes mellitus. *Revista de endocrinología y nutrición*. 4:55-62.

Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and 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* 96: 12737-12742.

Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P. et al (1999) ADD/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol Cell Biol* 19: 3760-3768.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P. (1995) 15-deoxy-d-12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR-gamma. *Cell* 83: 803-812.

- Forsythe, W.A. III (1995) Soy protein, thyroid regulation and cholesterol metabolism. *J.Nutr.* 125: 619S-623S.
- Forsythe, W.A. III (1990) Dietary protein, cholesterol and thyroxine: a proposed mechanism. *J Nutr. Sci. Vitaminol.* 36: 595S-598S.
- Forsythe, WA.(1995) Soy protein, thyroid regulation and cholesterol metabolism. *J Nutr.* 125:619S-623S.
- Friedman, JM (1998) Leptin, Leptin receptors and the control of body weight. *Nutr Rev.* 56:S38-S46.
- Fursinn, C et al (1997) Acute and chronic exposure to tumor necrosis factor alfa fails to affect insulin-stimulated glucose metabolism of isolated rat soleus muscle. *Endocrinology.* 138: 2674-2679.
- Glisin, V, Crkvenjakov, R, Byus, C. (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry.*13:2633-2637.
- Golbitz P. (1995) Traditional soyfoods: Processing and products. *J.Nutr.*125:570S-572S
- Goldberg, AC. (1995) Perspectives on soy protein as a nonpharmacological approach for lowering cholesterol. *J Nutr.*125: 675S-678S.
- Green, J. and Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5: 19-27.
- Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J et al (1996) Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters: a role of leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest.* 97: 2152-2157.
- Ham, J.O., Champan, K.M., Essex-Sorlie, D. et al (1993) Endocrinological response to soy protein and fiber in mildly hypercholesterolemic men. *Nutr. Res.*13: 873-884.
- Hamilton, R. M. G., and Carroll, K.K. (1976) Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, low cholesterol diets. Effects of dietary proteins, carbohydrates and fibre from different sources. *Atherosclerosis* 24: 47-62.
- Harris, PKW., Kleitzien, RF. (1994) Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 45:439-435.
- Hermansen, K., Sondergaard, M., Hoie, L. (2001) Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 24: 228-233.

Hofmann, C et al (1994) Altered gene expression for tumor necrosis factor alfa and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*. 134: 264-267.

Horton, JD., Bashmakov, Y., Shimomura, I and Shimano, H (1998) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refeed mice. *Proc Natl Acad Sci* 95: 5987-5992.

Hotamisligil, GS. (1999) The role of TNF-alfa and TNF-receptors in obesity and insulin resistance. *J Int Med* 245: 621-625

Hu, E., Kim, JB., Sarraf, P., Spiegelman, BM.(1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science*. 1996;274:2100-3.

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

Huff, M.W., Giovannetti, P.M., Wolfe B.M. (1984) Turnover of a very low-density-lipoprotein-apoprotein B is increased by substitution of soybean protein for meat and dairy protein in the diets of hypercholesterolemic men. *Am.J.Clin.Nutr.* 39:888-897.

Kahn, C.R., Vicent, D., Doris, A. (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *Annu.Rev.Med* 47: 529-531.

Kanazawa, T., Osanai, T., Zhang, X.S. et al (1995) Protective effects of soy protein on the peroxidability of lipoproteins in cerebrovascular diseases. *J.Nutr.* 125: 639S-646S.

Kim, D., Lee, K.T., Reiner, J.M. and Thomas, W.A. (1982) Increased steroid excretion in swine fed high-fat cholesterol diet with soy protein. *Exp.Mol.Pathol.* 33:25-35.

Kim, JB., Sarraf, P., Wright, M., Yao, KM., Mueller, E. et al (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD/SREBP1. *J Clin Inv* 101: 1-9.

Klein, S., Horowitz, JF., Landt, M., Goodrick, SJ et al (2000) Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 278: E280-E284.

Kontessis, P., Jones, S., Dodds, R. et al. (1990) Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kid. Intern.* 38:136-144.

Kritchevsky, D. (1993) Dietary protein and experimental atherosclerosis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 676:180-187.

Kritchevsky, D. (1995) Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. *J.Nutr.* 125: 589S-593S.

Lehmann, J., Moore, LB., Smith-Oliver, TA., Wilkison, WO., Willson, TM. et al. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 270: 12953-12956.

Mangelsdorf, DJ., Evans, RM.(1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841-50.

Matsuda, M., Korn, BS., Hammer, RE., Moon, Y et al (2001) SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes and development* 1306-1316.

Messina M. (1995) Modern applications for an ancient bean: Soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J.Nutr.* 125:567S-569S.

Messina M.(1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am.J.Clin.Nutr.* 70(3):439S-450S.

Messina, MJ., Persky, V., Setchell, KDR., Barnes, S. (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr cancer* 21: 113:131.

Miles, PDG et al (1997) TNF-alfa induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes.* 46:1678-1683

Miller, SG., DeVos, P., Guerre-Millo, M et al (1996) The adipocyte specific transcription factor C/EBP alpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 5507-5511.

Moller, DE (2000) Potential role of TNF-alfa in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trend in Endocrinology and Metabolism* 11: 212-217.

Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G.E., Paterniti, J.R. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR-gamma2 versus PPAR-gamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonist. *J. Biol. Chem.* 272: 8071-8076.

Nadler, S.T. and Attie, A.D. (2001) please pass the chip: Genomic insights into obesity and diabetes. 131: 2078-2081.

Nadler, ST and Attie, AL (2001) Please pass the chip: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 131: 2078-2081.

Nagata, Y., Ishiwaky, N., and Sugano, M. (1982) Studies on the mechanisms of the antihypercholesterolemia action of soy protein and soy protein type amino acid mixture in relation to their casein counterparts in rats. *J..Nutr.* 112: 1614-1625.

- Nilause, K., Meinertz, H. (1999) Lipoprotein (a) and dietary proteins: casein lowers lipoprotein (a) concentrations as compared with soy protein. *Am.J.Clin.Nutr.* 69: 419-425.
- Nohturfft, A., DeBose-Boyd, RA., Scheek, S., Goldstein, JL et al. (1999) Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 11235-11240.
- Nolan, JJ., Ludvik, B., Beerdensen, P., Joyce, M. et al (1994) Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331:1188-1193.
- Nolte, LA et al (1998) Short-term exposure to tumor necrosis factor alpha does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes.* 47: 515-522.
- Okuno, A. et al. (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the changes of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361.
- Pineda Torra, I., Chinetti, G., Duval, C. et al. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* 12: 245-254.
- Potter, S.M. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J.Nutr.* 125: 606S-611S.
- Raguso, C and McCullough AJ (2000) Leptin and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 16:160-165.
- Raines, E.W., and Ross, R. (1995) Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J.Nutr.* 125: 624S-630S.
- Ren, B., Thelen, A., Jump, D.B. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.* 271: 17167-17173.
- Ryden, M., Dicker, A et al (2001) Mapping of early signalling events in TNF-alpha mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* (submitted)
- Sarwar, G, Peace, RW, Botting, HG. 1985 Corrected relative net protein ratio (CRNPR) method based on differences in rat and human requirements for sulfur aminoacids. *J Am Oil Chem Soc* 68: 689-693.
- Seufert, J., Kieffer, TJ and Habener, JF (1999) Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci.* 96: 674-679.
- Shalev, A., Siegrist-Kaiser, C.A., Yen, P.M. et al. (1996) The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 137: 4499-44502.

- Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M et al (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcriptional factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274: 35832-35839.
- Sirtori, C.R., Agradi, E., Conti, F., Mantero, O., and Gatti, E. (1977) Soy bean protein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1: 275: 277.
- Sirtori, C.R., Even, R., and Lovati, M.R. (1993) Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 676: 188-201.
- Sirtori, C.R., Lovati, M.R., Manzoni, C. Monetti, M. (1995) Soy and cholesterol reduction. Clinical experience. *J. Nutr.* 125:598S-605S
- Stampfer, M.J., Willett, W.C., Colditz, G.A., Rosner, B., Speizer, F.E. (1985) A prospective study of menopause estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl. J. Med.* 313: 1044-1049.
- Steinke, F.H. (1979) Measuring protein quality of foods. In. *Soy protein and human nutrition.* Academic Press, New York.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bath, S., Brown, E.J et al (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312.
- Stehens, J.M and Pekala, P.H (1991) transcriptional repression of the GLUT4 and c/EBP genes in 3T3 cells by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem.* 266: 21839-21845.
- Sugano, M. and Koba, K. (1993) Dietary protein and lipid metabolism: a multifunctional effect. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 679: 215-222.
- Szalkowski, D et al (1995) Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor α on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 136: 1474-1481
- Terpstra, A.H.M., Woodward, C.J.H., West, C.E. and Van Boven, J.G. (1982) A longitudinal cross-over study of serum cholesterol in lipoproteins in rabbits fed on semipurified diets containing either casein or soya-bean protein. *Br.J.Nutr.* 47: 213-219.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2002). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 25 (1):S5-S20.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G.A., Thomazy, V.A. (1998) PPAR- γ promote monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252.

- Torres y Torres, N., Bourges, H., Tovar, AR (1996) Regulación de la expresión génica por nutrimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 46: 89-96
- Torti, FM et al (1985) A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. Science 229: 867-869.
- Tovar-Palacio, C., Potter, S.M., Hafermann, J.C., and 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.
- Van der Meer, R., and Beynen, A.C. (1987) Species-dependent responsiveness of serum cholesterol to dietary proteins. J. Am. Oil. Chem. Soc. 64: 1172-1177.
- Wahli, W., Martínez, E. (1991) Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. FASEB J 5: 2243-2249.
- Werman, A., Hoolenberg, A., Solanes, G., Borbaek, C., et al. (1997) Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor γ . J Biol Chem. 1997; 272: 20230-5.
- Wilcox, J.N., and Blumenthal, B.F. (1995) Trombotic mechanisms in atherosclerosis: potencial impact of soy proteins. J.Nutr. 125: 631S-638S
- Young, VR. (1999) Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. J Am Diet Assoc 91:828-835.
- Zakrzewska, KE., Cusin, I., Sainsbury, A et al (1997) Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin toward an understanding of leptin resistance. Diabetes.46: 717-719.
- Zhang, B et al (1996) Negative regulation of peroxisome proliferator- activated receptor-gamma gene expression contributes to the anti-adipogenic effects of tumor necrosis factor alfa. Mol Endocrinol 10: 1457-1466.

Anexo I. Reactivos para Transcripción reversa

Buffer de la transcriptasa reversa 5X
(5X First Strand Buffer de GIBCO BRL)
Tris-HCl 250 mM pH 8.3
Cloruro de potasio 375 mM
Cloruro de magnesio 15 mM

Mezcla de dNTP's
(2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato de GIBCO BRL)
La mezcla contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Oligo dT
(Oligo dT 12-18 primer, GIBCO BRL)
Se utiliza como un oligonucleótido para la síntesis de la primera cadena de DNA complementario con la transcriptasa reversa. Su función es hibridar a la cola Poli A del RNA mensajero y se almacena en agua-DEPC.

DTT 0.1 M de GIBCO BRL

Enzima transcriptasa reversa
(Reverse Transcriptase, Moloney Murine Leukemia Virus-M-MLV, GIBCO BRL)
Es una DNA polimerasa que sintetiza una cadena de DNA complementaria a partir de una cadena simple de RNA.

Inhibidor de ribonucleasas.
(RNAsa inhibitor, cloned GIBCO BRL)
Es un potente inhibidor no competitivo de ribonucleasas, que se utiliza en la transcripción reversa del RNA mensajero y es obtenido de una cepa recombinante de E. Coli.

Anexo II. Reactivos para PCR

Buffer de PCR 10X con 15 mM de cloruro de magnesio
(10X PCR Buffer GIBCO BRL)

Tris-HCl 200mM, pH8.4

Cloruro de potasio 500 mM

Cloruro de magnesio 50mM

Mezcla de dNTP's (ver anexo de reactivos para RT)

Oligonucleótido sentido 20 μ M

Oligonucleótido antisentido 20 μ M

Enzima Taq DNA polimerasa
(Taq DNA polymerase, GIBCO)

Esta enzima aislada de *Thermus aquaticus* YF1, es un polipéptido simple con un peso molecular de 94 kDa, estable al calor, capaz de sintetizar DNA a temperaturas elevadas a partir de un templete simple de cDNA en presencia de Oligonucleótidos iniciadores.

Anexo III. Reactivos para electroforesis de DNA

Tris base	60.5 g
Ácido acético glacial	14.27 ml
Na ₂ EDTA* 2H ₂ O	9.3 g
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml

Buffer TAE 50X

Buffer TAE 1X

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

Bromuro de etidio 2 mg/ml. Ver anexo de reactivos para electroforesis de RNA

Buffer de carga. Ver anexo de reactivos para electroforesis de RNA

Marcador de peso molecular. Se utilizó una escalera de DNA de 100 bp en 100 bp hasta llegar a 2000 bp de Boehringer Mannheim.

Anexo IV. Reactivos para extracción de RNA por cloruro de cesio

Agua DEPC al 0.1%

Dietil pirocarbonato	3 ml
Agua desionizada	3000 ml

Agitar por 4 horas, condiciones de autoclave: 15min , 15lbs/pulg²

Solución de tiocianato de guanidina 4M

Para disolver calentar a baño maría a 40 °C y esterilizar con membrana de nylon 0.22 µm, almacenar 4 °C

Solución de cloruro de cesio

Esterilizar con membrana de nylon 0.22 µm, almacenar a temperatura ambiente

Solución de N- Laurilsarcosil al 10%

Anexo V. Reactivos para cuantificación espectrofotométrica de RNA

EDTA 0.4 M pH 8.0: Ajustar el pH con NaOH

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

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

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

Formamida

Anexo VI. Reactivos para electroforesis de RNA

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

Buffer de corrimiento 1X

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

Formaldehído 36.7%

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

Buffer de carga: Disolver el EDTA, azul de bromofenol y el xylene cyanol en los 10 ml de glicerol al 50%. Filtrar con filtro miles y guardar a 4°C.

Glicerol al 50%	10 ml
EDTA 1mM pH 8.0	200 µl
Azul de bromofenol 0.25%	250 mg
Cianol xileno 0.25%	250 ml

Bromuro de etidio 2 mg/ml

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

Formamida

Anexo VII. Reactivos para transferencia de RNA a membrana de Nylon N⁺

Solución SSC20X

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

Agua desionizada.

Anexo VIII. Reactivos para hibridación de RNA con sonda marcada

Buffer de prehibridación. Rapid Hyb. (Amersham Pharmacia Biotech, cat. No. 1636)

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

Buffer TE

Tris HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

³²P dCTP (Amersham Pharmacia Biotech. 3000 Ci/mmol, cat. AA0005)

EDTA 0.2 M

Solución 2X SSC/0.1 SDS

Solución 0.01X SSC/0.1 SDS