



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

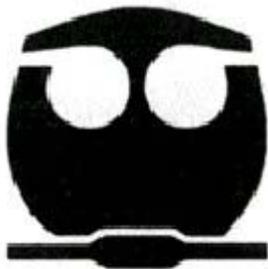
EFECTO DE LA PROTEINA DE SOYA
SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS
ADIPOCITOS

T E S I S

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

P R E S E N T A :

**MARIA EUGENIA FRIGOLET
VAZQUEZ VELA**



Tutor: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

MÉXICO, D. F.

Septiembre 2006



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.

EFEECTO DE LA PROTEINA DE SOYA SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS ADIPOCITOS

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Tovar Palacio en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición, en el Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán”.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio	Depto. Fisiología de la Nutrición, INNSZ
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Depto. Bioquímica, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la M en C. Lilia Noriega López.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Calcagno Montans	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dra. Gloria Saab Rincón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Andrés Hernández Arana	U. A. Metropolitana-Iztapalapa
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

Nunca están los hombres más cerca de la estupidez que cuando se creen sabios.

Mary Wortley

Para mis padres

Gracias a Luis y a “Fisiología de la Nutrición” por su enseñanza y por compartir cada paso de este trabajo.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
Resumen	1
Introducción y antecedentes	3
El tejido adiposo	3
Factores de transcripción	8
Adipocinas	11
Hormonas	13
Proteína de soya	17
Planteamiento del problema	20
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Metodología	23
Material y métodos	24
Alimentación de las ratas	24
Obtención de muestras y tejidos	25
Determinación de parámetros bioquímicos en suero	25
Extracción de RNA total	25
Determinación de expresión génica por RT-PCR (tiempo real)	26
Análisis histológico	26
Cultivo de adipocitos	27
Medición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol	27
Medición de la concentración de citocinas en suero o liberadas al medio de cultivo	28
Análisis estadístico	29
Resultados	30
Cultivo de adipocitos	30
Alimentación de las ratas	30
Medición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol	33
Determinación de parámetros bioquímicos en suero	39
Medición de la concentración de hormonas y citocinas liberadas	40

Determinación de la expresión génica por RT-PCR cuantitativo (tiempo real)	50
Análisis histológico	57
Resumen de resultados	60
Discusión	61
Conclusiones	68
Perspectivas	69
Bibliografía	70
Anexos	77

INDICE DE TABLAS, GRAFICAS Y FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Lipotoxicidad	10
Tabla 1. Hormonas y adipocitocinas secretadas por el tejido adiposo, función y sitio de actividad	13
Figura 2. Metabolismo del tejido adiposo	17
Gráfica 1. Ganancia de peso	31
Gráfica 2. Consumo de alimento	32
Gráfica 3. Consumo de energía	32
Gráfica 4. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h	33
Gráfica 5. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h	34
Gráfica 6. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h	35
Gráfica 7. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h	35
Gráfica 8. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h	36
Gráfica 9. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h	36
Gráfica 10. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h	37
Gráfica 11. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴ C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h	37
Gráfica 12. Diferencia entre la síntesis de ácidos grasos en adipocitos abdominales cultivados por 3 o 6 horas	38
Gráfica 13. Concentración de triacilglicéridos en suero	39
Gráfica 14. Concentración de colesterol en suero	40

Gráfica 15. Concentración de leptina en suero	41
Gráfica 16. Liberación de leptina por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h	42
Gráfica 17. Liberación de leptina por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h	42
Gráfica 18. Concentración de adiponectina en suero	43
Gráfica 19. Relación adiponectina/leptina en suero	44
Gráfica 20. Liberación de adiponectina por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h	45
Gráfica 21. Liberación de adiponectina por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h	45
Gráfica 22. Liberación de adiponectina por adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h	46
Gráfica 23. Liberación de adiponectina por adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h	46
Gráfica 24. Concentración de TNF- α en suero	47
Gráfica 25. Liberación de TNF- α por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h	48
Gráfica 26. Liberación de TNF- α por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h	49
Gráfica 27. Liberación de TNF- α por adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h	49
Gráfica 28. Liberación de TNF- α por adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h	50
Gráfica 29. Abundancia relativa de mRNA de PPAR γ en tejido adiposo abdominal	51
Gráfica 30. Abundancia relativa de mRNA de PPAR γ en tejido adiposo epididimal	51
Gráfica 31. Abundancia relativa de mRNA de perilipinas en tejido adiposo abdominal	52

Gráfica 32. Abundancia relativa de mRNA de perilipinas en tejido adiposo epididimal	52
Gráfica 33. Abundancia relativa de mRNA de PPAR α en tejido adiposo abdominal	53
Gráfica 34. Abundancia relativa de mRNA de PPAR α en tejido adiposo abdominal	53
Gráfica 35. Abundancia relativa de mRNA de SREBP-1 en tejido adiposo abdominal	54
Gráfica 36. Abundancia relativa de mRNA de SREBP-1 en tejido adiposo epididimal	54
Gráfica 37. Abundancia relativa de mRNA de TNF- α en tejido adiposo abdominal	55
Gráfica 38. Abundancia relativa de mRNA de TNF- α en tejido adiposo epididimal	55
Gráfica 39. Abundancia relativa de mRNA de CPT-1 en tejido adiposo abdominal	56
Gráfica 40. Abundancia relativa de mRNA de CPT-1 en tejido adiposo epididimal	56
Figura 3. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con caseína	57
Figura 4. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con caseína y grasa	57
Figura 5. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con soya	57
Figura 6. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con soya y grasa	57
Gráfica 41. Promedio del área de adipocitos abdominales	58
Gráfica 42. Promedio del área de adipocitos epididimales	59
Figura 7. Modelo integrativo de los efectos de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo	68

INDICE DE ANEXOS

Contenido	Página
Anexo 1.1 Composición del aislado de proteína de soya y aislado de caseína (aminoácidos)	77
Anexo 1.2 Composición del aislado de proteína de soya (isoflavonas)	77
Anexo 2. Alimentación de las ratas	78
Anexo 3. Gel de agarosa para comprobar integridad de RNA	79
Anexo 4.1 Rango dinámico de un gen ejemplo	80
Anexo 4.2 Curva de amplificación de actina como gen control	80

TABLA DE ABREVIATURAS

AlgCl: Algoritmo de Clustering
BCL: Base de Conocimiento Léxico
CA: Corpus de Análisis
CP: Corpus Prueba
CxG: Construction GRammar
DEBO: Diccionario Electrónico de Búsquedas Onomasiológicas
GIL: Grupo de Ingeniería Lingüística
SRI: Sistema de Recuperación de Información
SW: Sperber y Wilson
TR: Teoría de la Relevancia

Resumen

El tejido adiposo funciona almacenando energía con el objeto de tener acceso a ella en caso de haber una demanda de la misma. Sin embargo, ahora se sabe que ésta no es la única función del tejido adiposo. El tejido adiposo participa, en gran medida, manteniendo el equilibrio energético a través de la liberación de hormonas (leptina) y adipocinas (adiponectina y TNF- α). Cuando existe desregulación de la secreción de hormonas y adipocinas o desequilibrio entre la síntesis y oxidación de los lípidos, el tejido adiposo pierde su funcionalidad. La pérdida de la funcionalidad del tejido adiposo puede culminar en la falla de los órganos no adiposos, los cuales se cargan de lípidos, generando muerte celular. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la proteína de soya (PS) en la dieta genera cambios metabólicos favorables en el páncreas, hígado y músculo. El consumo de PS también reduce el riesgo a desarrollar obesidad. Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo epididimal y abdominal. Para lograr esto, se alimentaron ratas con 30% de proteína de soya o caseína y se determinó la concentración en suero de leptina, adiponectina y triacilglicéridos. Además, se midió en el tejido adiposo epididimal y abdominal, la expresión de proteínas o factores de transcripción involucrados en la síntesis y oxidación de lípidos (perilipinas o receptores activados por proliferadores de peroxisomas γ y α o PPAR γ y PPAR α ,). También, se prepararon cultivos de adipocitos abdominales y epididimales para conocer la liberación de TNF- α , así como la incorporación de acetato radiactivo en ácidos grasos. Los resultados del presente trabajo muestran una reducción importante en la concentración de triacilglicéridos y leptina circulantes en el grupo alimentado con PS. La relación adiponectina/leptina sérica se calculó utilizando a la leptina como un indicador de adiposidad, y resultó mayor para los animales que consumieron PS. Estos eventos son deseables, ya que la hiperleptinemia se asocia al desarrollo de resistencia a la leptina y consecuente obesidad. Asimismo, la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye el riesgo de aterogénesis. En el tejido adiposo abdominal de animales que consumieron PS se observó una adecuada relación entre síntesis y oxidación de lípidos medida por la formación de ácidos grasos en cultivo y por la expresión de PPAR γ y de PPAR α . En el tejido adiposo epididimal, el consumo de PS redujo la expresión y

liberación de TNF- α al medio de cultivo. En este tejido también se vio disminuida la expresión de perilipinas al consumir PS. Las perilipinas son proteínas que impiden la utilización de los lípidos contenidos en la vacuola lipídica del adipocito. Esto sugiere que la PS en el tejido adiposo epididimal evitó la lipólisis acelerada y riesgo de lipotoxicidad mediada por TNF- α y perilipinas. Entonces, se concluye que la PS mantiene la funcionalidad del tejido adiposo abdominal y epididimal a través de distintos mecanismos en cada tejido.

Introducción y Antecedentes

La obesidad es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia en los países desarrollados, así como en países en desarrollo como el nuestro. El progreso de la obesidad se asocia con un incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas como son enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hiperlipidemias, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, lo que en conjunto forma el denominado síndrome X o síndrome metabólico. La obesidad se define como un incremento excesivo del tejido adiposo.

El tejido adiposo

Los adipocitos son las células que conforman al tejido adiposo. Estas células varían mucho en tamaño (20-200 μm de diámetro) y se encuentran embebidas en el tejido conectivo compuesto por la matriz extracelular (1). En los últimos años se ha entendido al tejido adiposo no sólo como el recurso principal para el almacén de lípidos y depósito de energía, sino como un conjunto de células con actividad endócrina (2) de forma que el número de adipocitos funcionales contribuye en forma muy importante a determinar la homeostasis de energía. La funcionalidad de estas células dependerá de su capacidad de diferenciación y del equilibrio que establezcan entre la vía lipolítica y la lipogénica. Se ha propuesto, también, que en condiciones patológicas, el tejido adiposo puede dejar de ser sensible y responder deficientemente a las señales del medio dejando de censar el exceso de glucosa y/o lípidos circulantes (3).

La pérdida de la funcionalidad de los adipocitos se relaciona con una inadecuada expresión génica de sus factores de transcripción que controlan la expresión de genes lipogénicos, así como también a la falla en la síntesis de adipocinas y hormonas secretadas por los adipocitos, y a la regulación anormal de los procesos de diferenciación de los adipocitos. Estos mecanismos se describirán a continuación.

El tejido adiposo metabólicamente activo se caracteriza por conformarse de muchas células pequeñas ampliamente vascularizadas en las que incluye tanto a preadipocitos como

adipocitos. Los preadipocitos se definen como células ausentes de lípidos en el citoplasma. Los adipocitos inmaduros se caracterizan por tener pequeñas gotas de grasa contenidas en el citoplasma, mientras que los adipocitos maduros contienen gotas de grasa grandes y bien definidas (4).

Cuando hay crecimiento del tejido adiposo se dan dos fenómenos, el de hiperplasia, en donde los preadipocitos se transforman en adipocitos, lo que incrementa su número, y el de hipertrofia, en el cual los adipocitos formados incrementan su contenido de lípidos, en especial, en forma de triglicéridos aumentando su volumen de forma significativa. La hiperplasia se acompaña de vascularización temporal, pero no la hipertrofia. Cuando en un adipocito funcional hay necesidad de cubrir los requerimientos energéticos del organismo, se liberan ácidos grasos que puedan ser utilizados por los tejidos como el músculo esquelético, el corazón, y el hígado entre otros. En consecuencia, durante la hipertrofia, la movilización de ácidos grasos se ve alterada cuando no hay provisión de capilares para transportarlos (5, 6). Por esto se considera deseable que el tejido adiposo esté formado por una gran cantidad de adipocitos pequeños funcionales. De esta manera, se ha relacionado al mayor tamaño de las células adiposas o hipertrofia con una falta de sensibilidad a las señales del medio, y por tanto, alterada funcionalidad.

En la obesidad inducida por dieta se comienza con hipertrofia de los adipocitos preexistentes y se sigue con la expansión celular en donde nuevos adipocitos son reclutados de la población de preadipocitos. Sin embargo, cuando la obesidad es una alteración ya establecida, la expresión de genes refleja la existencia de hipertrofia de adipocitos. Estos genes se relacionan con lipogénesis y otros parecidos estructuralmente a la citocina TNF- α (7).

El ambiente hormonal y los factores de transcripción presentes en el animal determinan la diferenciación hacia cada tipo celular. En el humano, los preadipocitos inician su etapa de diferenciación hasta células adiposas en la etapa embrionaria tardía, aunque la mayor parte ocurre poco tiempo después del nacimiento (8). En la rata y el ratón, los preadipocitos inician su conversión después del nacimiento (9). Todas las especies tienen la capacidad de diferenciar sus preadipocitos a lo largo de la vida en respuesta a las

demandas corporales de almacenamiento de lípidos.

El desarrollo del tejido adiposo se ha estudiado *in vitro* en líneas celulares de dos clases principales, que incluyen células de fibroblastos pluripotenciales, que pueden comprometerse hacia linajes de adipocitos, miocitos o condrocitos y líneas celulares unipotenciales de preadipocitos que solamente pueden dar origen a la línea de adipocitos. Mediante el estudio de la línea celular unipotencial 3T3-L1 se ha logrado comprender la conversión de preadipocitos en adipocitos maduros. Antes de diferenciarse, las células 3T3-L1 se mantienen en estado de preadipocito por el factor transcripcional Pref-1, el cual funciona como un inhibidor del proceso de diferenciación (10). Al iniciar el programa de diferenciación, se eleva transitoriamente la expresión de los factores de transcripción conocidos como proteínas de unión al facilitador CCAAT β y δ (C/EBP- β/δ). Esto es seguido de un incremento en los niveles de expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ), factor crítico para mantener el fenotipo del adipocito maduro (11, 12). Además, la expresión de las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides-1 (SREBP-1) también aumenta durante la diferenciación del adipocito.

Aproximadamente en 5 a 7 días después de la inducción de la diferenciación, las células contienen toda la maquinaria de enzimas relacionadas con los procesos de lipogénesis y lipólisis, así como otras proteínas responsables de modular el fenotipo del adipocito maduro. Las células adquieren un aspecto redondeado y son capaces de acumular lípidos. En los periodos de crecimiento del animal prevalece la hiperplasia celular, mientras que en el adulto el número de células tiende a mantenerse constante, por lo que se incrementa el tamaño del adipocito. La capacidad del tejido adiposo para almacenar cantidades importantes de energía depende de la formación de nuevos adipocitos. Ciertos factores parácrinos (como los ácidos grasos) liberados por los adipocitos hipertróficos inducen la diferenciación y el crecimiento de los preadipocitos circunvecinos, por lo que aumenta la capacidad de almacenamiento del tejido (13). Por el contrario, la deficiencia de energía estimula la liberación de ácidos grasos por aumento de la lipólisis, generando adipocitos de tamaño más pequeño. Asimismo, la masa adiposa puede reducirse por la pérdida de células a través del proceso de apoptosis (14).

Siendo que el tejido adiposo se encuentra ampliamente distribuido es necesario definir los tipos de tejido adiposo por las zonas o regiones en donde se localizan. Así, el tejido adiposo visceral es el que incluye al tejido adiposo intraabdominal, retroperitoneal, epididimal, mesentérico u omental. El tejido adiposo subcutáneo es el que se encuentra por debajo de la dermis e incluye al tejido adiposo abdominal subcutáneo entre otros. (15)

El interés de este estudio fue analizar el metabolismo de adipocitos provenientes del tejido adiposo epididimal e intraabdominal como tejidos adiposos de tipo visceral, pues se ha explorado poco sobre las diferencias metabólicas de los dos depósitos de grasa mencionados. Se ha determinado que el tejido adiposo visceral constituye el 27% del volumen total de masa grasa en humanos obesos, por lo tanto, el estudio de los mecanismos de regulación a los que está sujeto es de suma importancia (16).

El comportamiento de las células adiposas varía según su localización y ambiente afectando el patrón de expresión génica de los distintos depósitos de grasa. Así, el incremento en el tejido adiposo intraabdominal se ha relacionado con alteraciones como resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión arterial y dislipidemias. (17) Al respecto, se ha visto que al remover la masa grasa visceral, pero no la subcutánea, hay un aumento en la sensibilidad a la insulina (16).

Por otro lado, el fenómeno de hipertrofia en los adipocitos está relacionado con una mayor síntesis de citocinas como TNF- α e IL-6. Estas proteínas y otras secretadas por los adipocitos tienen consecuencias importantes en la expresión de leptina, sensibilidad a la insulina y metabolismo de los adipocitos.

Además, el tamaño de los adipocitos puede ser factor único de influencia en la concentración de RNA mensajero de leptina, pues la síntesis de novo de ácidos grasos correlaciona positivamente con el tamaño de los adipocitos (18). En este trabajo hemos explorado estos procesos en el tejido adiposo visceral epididimal e intraabdominal con el fin de conocer si son diferentes en tales depósitos de grasa.

Se ha establecido que las catecolaminas tienen un mayor efecto lipolítico sobre el tejido adiposo visceral que sobre el tejido adiposo subcutáneo abdominal. Esto puede suceder a nivel de los receptores adrenérgicos, los cuales se encuentran en mayor abundancia en el tejido adiposo visceral (17), activación de la enzima adenilato ciclasa y función acelerada de la lipasa sensible a hormonas por medio de la acción de AMP cíclico (19). Si existe mayor actividad lipolítica en el tejido adiposo visceral, entonces existe una mayor liberación de ácidos grasos libres por parte de este tejido. Se sabe que sólo el tejido adiposo visceral drena vía vena porta directamente hacia hígado, por lo que la movilización de ácidos grasos libres hacia la circulación, es más rápida en tejido adiposo visceral que en subcutáneo. Si bien, la incrementada capacidad lipolítica del tejido adiposo visceral puede atribuirse a la regulación lipolítica mediada por catecolaminas como anteriormente se explicó, también podría deberse a una menor capacidad antilipolítica causada por una menor sensibilidad a insulina en el tejido mencionado. (20, 21).

Otro fenómeno que explica las diferencias metabólicas entre los depósitos de grasa es aquel en el que participan las proteínas desacopladoras o UCP's (Uncoupling proteins). Las proteínas desacopladoras o UCP's están involucradas en el control del acoplamiento entre el transporte de electrones y el bombeo de protones para formar el gradiente electroquímico que se emplea en la síntesis de ATP. De esta manera, modulan el metabolismo de energía y son reguladas por la presencia de catecolaminas, insulina y triyodotironina. Al regular el desacoplamiento de la síntesis de ATP de la cadena respiratoria mitocondrial, las UCP's son responsables de la producción de calor por parte tejido adiposo pardo (22, 20). Recientemente, se ha descrito que el tejido adiposo blanco también puede adoptar esta función al expresar UCP's. En un estudio se demostró por medio de análisis por Northern blot y/o PCR que el tejido graso retroperitoneal, y en menor grado, el tejido adiposo epididimal, mesentérico e inguinal expresan esta familia de proteínas. Todos los depósitos de grasa anteriores representan al tejido adiposo visceral, por lo que se concluye que el tejido adiposo que mayormente expresa UCP's es el visceral. Las implicaciones bioquímicas de las células que expresan UCP's tienen que ver con adipocitos con gotas de grasa multiloculares y mayor densidad de crestas mitocondriales. Asimismo,

las células adiposas tratadas con agonistas de receptores β -adrenérgicos o expuestas a bajas temperaturas se convierten en células con morfología similar a la del adipocito de tejido adiposo pardo (23).

La reducción observada en las concentraciones de RNA mensajero de las proteínas UCP-1 y UCP-2 dentro del tejido adiposo visceral es compatible con una menor capacidad de gasto energético en individuos con obesidad central (20, 22).

A pesar de que es aceptado que existen diferencias metabólicas entre los diferentes depósitos de grasa, los mecanismos por los cuales esto sucede no quedan completamente entendidos a la fecha. (24)

Factores de transcripción

Como se indicó, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son una familia de factores de transcripción nucleares que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares que unen metabolitos lipídicos; éstos juegan un papel importante en la diferenciación de adipocitos. Como los demás receptores nucleares, los PPARs son reguladores de la expresión de genes cuya actividad trascricional es dependiente de un ligando. Los ligandos para los PPARs son ácidos grasos poliinsaturados, fibratos, genisteína y tiazolidinedionas. Las regiones aminoterminal de los receptores muestran la secuencia menos conservada. La región carboxilterminal es la responsable de unir a su ligando, además contiene los motivos responsables de la dimerización; la región consta de trece regiones α hélice y cuatro regiones tipo láminas β . La dimerización de PPAR se da por medio de la unión a RXR o receptor de ácido retinóico. Al igual que los receptores esteroideos, los PPARs forman dedos de zinc, los cuales contienen una secuencia específica para la unión al DNA. Las zonas de unión de los PPARs en el DNA se llaman elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales o PPREs, éstas son secuencias repetidas directas compuestas por dos hexanucleótidos con secuencias consenso AGGTCA separadas solamente por un nucleótido. Esta secuencia o variantes de la misma se han encontrado en regiones promotoras de múltiples genes que se inducen por PPARs como acil CoA oxidasa. Cuando el ligando se une al receptor, la proteína se convierte en

una forma activa con mayor afinidad por el DNA. Esta unión permite que el promotor del gen potencie su transcripción (24, 25, 26).

Existen tres formas de los PPARs: PPAR α , δ y γ . El PPAR α es la forma más abundante en el hígado; el PPAR δ se expresa principalmente en músculo esquelético (27). La expresión de PPAR α está relacionada con la expresión de enzimas y transportadores asociados con la oxidación de ácidos grasos, mientras que PPAR γ se localiza principalmente en el tejido adiposo y su función, entre otras, es la de inducir la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis. Además, PPAR γ aumenta la sensibilidad a la insulina, la expresión del transportador Glut 4 y la expresión de UCP-2 y 3 en tejido adiposo. También, es responsable de la disminución en la expresión de leptina y de TNF- α (27). Específicamente, la expresión de PPAR γ en preadipocitos que componen el tejido adiposo subcutáneo abdominal es mayor que en preadipocitos de tejido adiposo omental (22).

Al igual que los demás receptores nucleares, la actividad transcripcional es dependiente de su ligando, ya que esto les permite interactuar con coactivadores o correpresores que median su efecto transcripcional, lo que explica que al mismo tiempo puedan encender la expresión de algunos genes (mediante su interacción con coactivadores) y reprimir la expresión de otros (mediante su interacción con correpresores).

Debe de existir un equilibrio entre las diferentes formas de PPARs para mantener un balance entre la síntesis y oxidación de los ácidos grasos, pues cuando este equilibrio se pierde, hay peligro de desarrollar obesidad y resistencia a la insulina (28, 29).

Por ejemplo, existe un desequilibrio en la actividad de los PPARs debido a un aumento en la ingesta continua de energía. Bajo estas condiciones hay una síntesis acelerada de lípidos en los adipocitos y estos pierden, con el tiempo, la capacidad de almacenar ácidos grasos por lo que entonces los ácidos grasos son redirigidos a órganos como hígado, en donde se genera esteatosis o hígado graso, o al páncreas, miocardio y músculo esquelético. Los ácidos grasos en estos tejidos son oxidados, sin embargo, el exceso de ácidos grasos que se dirige a estos tejidos es utilizado por vías no oxidativas

formando ceramidas que contribuyen al proceso de lipotoxicidad, que se traduce en alteración en la función de estos órganos y finalmente a la muerte celular o apoptosis (30).

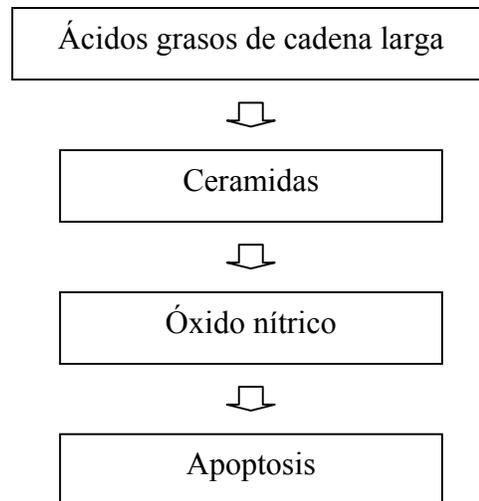


Figura 1. Lipotoxicidad. Muerte celular provocada por la presencia excesiva de ácidos grasos en órganos no adiposos.

Una de las funciones mas importantes de PPAR γ , es la de estimular la lipogénesis en los adipocitos. Este cambio ocurre a través del incremento de la expresión de los factores de transcripción SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) o proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides que son una familia de factores que regulan la síntesis de lípidos. Los SREBPs son factores transcripcionales de la familia hélice-asa-hélice. La región aminoterminal de los SREBP's contienen un motivo de 40 a 50 aminoácidos que forman dos α hélices anfipáticas unidas por un asa o loop de longitud variable. Los SREBPs forman homo o heterodímeros por la interacción entre residuos hidrofóbicos en las caras correspondientes de las dos hélices, además contienen una región básica adyacente a la zona hélice-asa-hélice, la cual se necesita para la unión al DNA. Generalmente la secuencia básica consta de quince aminoácidos, de los cuales seis son altamente conservados (24,31). Los SREBP's se sintetizan como una proteína precursora unida al retículo endoplásmico. Ésta es transportada por SCAP (por sus siglas en inglés: SREBP cleavage activating protein o proteína que activa el rompimiento de SREBP) hacia el aparato de Golgi. Ahí, el SREBP es liberado de la membrana del aparato de Golgi por

medio de la acción de dos proteasas: S1 y S2. Posteriormente, la porción aminoterminal que resulta del corte proteolítico es translocada al núcleo con el fin de activar ciertos genes (32, 33). Los genes que se transcriban en respuesta al proceso descrito dependerán de la isoforma del factor de transcripción.

Las isoformas de los SREBPs incluyen al SREBP-1a, al SREBP-1c y al SREBP-2. El SREBP-1c es mucho más abundante en tejidos animales, incluyendo al hígado y al tejido adiposo, sin embargo, el SREBP-1a, es el que se encuentra en mayor proporción en células cultivadas. El SREBP-2 se encarga de activar los genes necesarios para la síntesis de colesterol, mientras que el SREBP-1 se encarga de la inducción de los genes que codifican para enzimas encargadas de la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos (34). El SREBP-1 se regula de forma importante por la insulina, pues ésta aumenta su expresión, incrementando, por tanto, la actividad lipogénica. Además, se ha propuesto que los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de suprimir la expresión de SREBP-1 (17).

Adipocinas

Uno de los cambios más importantes en la manera en que se entiende el funcionamiento del tejido adiposo es el reconocimiento de su función endócrina. El establecimiento de la condición de adipocito por los factores de transcripción PPAR γ y SREBP-1, entre otros, permitirá que el tejido adiposo funcione como un órgano endocrino. El tejido adiposo secreta adipocinas (hormonas y citocinas) que incluyen a la leptina, la resistina, la adiponectina, la interleucina-6, el TNF α , la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y el inhibidor de activador de plasminogeno-1 (PAI-1). La secreción de estas hormonas y citocinas dependerá de la funcionalidad de los adipocitos, que a su vez depende del desarrollo de la obesidad, de la alimentación (tipo y distribución de nutrimentos) o de las condiciones de actividad física.

El TNF- α es una citocina que se sintetiza durante la respuesta inflamatoria. Últimamente se ha evidenciado la relación entre la inflamación y la resistencia a la insulina. Se ha encontrado que el TNF- α regula la resistencia a la insulina como consecuencia de la

obesidad, pues esta citocina se produce abundantemente en el tejido adiposo al cursar con obesidad de tipo visceral inhibiendo la señalización de insulina. (35).

Se ha propuesto, también, que el TNF- α en el adipocito desencadena una serie de reacciones en donde participan las cinasas ERK haciendo que se aumente el AMP cíclico y se inhiba la fosfodiesterasa 3B, lo que produce una disminución de actividad y expresión de perilipinas. Las perilipinas son proteínas que tienen la función de impedir la utilización de los triglicéridos contenidos en las gotas de grasa del adipocito. Además el TNF- α también tiene efecto directo sobre la lipasa sensible a hormonas (HSL). Estas acciones conducen a un aumento de la lipólisis y por lo tanto una elevación de ácidos grasos en sangre que se dirigen a órganos no adiposos, aumentando el riesgo de desarrollar lipotoxicidad (36).

Al contrario que el TNF- α , la adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina. Esta adipocina, a la cual también se le ha denominado Acrp30 o AdipoQ, se produce exclusivamente en el tejido adiposo. Ésta es capaz de aumentar la expresión de UCP-2 y acil CoA oxidasa, enzima involucrada en el catabolismo de ácidos grasos. Por esta razón, la adiponectina es capaz de reducir la concentración de triacilglicéridos en el músculo y, por tanto, disminuir el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina. Específicamente, se ha demostrado que la adiponectina aumenta la fosforilación del receptor de insulina y el sustrato del receptor de la insulina, proceso necesario para que se lleve a cabo la translocación del transportador de glucosa Glut 4 en células adiposas, de músculo e hígado (37).

Otras funciones de la adiponectina son suprimir los efectos del TNF- α y, por lo tanto, inhibir la adhesión de monocitos y suprimir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares (38). Asimismo, la adiponectina aumenta la expresión “in vivo” de PPAR γ y este factor aumenta, a su vez, la expresión de dicha adipocina (37). La concentración de adiponectina aumenta en animales sometidos a dietas hipoenergéticas (39, 40).

Tabla 1. Hormonas y adipocitocinas secretadas por el tejido adiposo, función y sitio de actividad

Molécula	Función	Actividad
Leptina	Informa al cerebro sobre las reservas de masa grasa Regula el proceso hambre/saciedad Induce lipólisis en el tejido adiposo	Autócrina, Parácrina, Endócrina
Adiponectina	Implicada en el proceso contra la hiperlipidemia y resistencia a la insulina	Sobre hepatocitos, miocitos e islotes pancreáticos
Resistina	Induce resistencia a la insulina e inflamación	Sobre células endoteliales y miocitos
TNF- α	Interfiere con la señalización del receptor de insulina	Sobre el adipocito y otras células
IL-6	Involucrado en el metabolismo de glucosa y lípidos	Sobre el adipocito y otras células
PAI-1	Inhibe al sistema fibrinolítico	Sobre hepatocitos
Angiotensinógeno	Participa en el flujo sanguíneo del tejido adiposo y reesterificación de los ácidos grasos	Sobre el adipocito y otras células

Hormonas

La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo, la cual funciona regulando la saciedad y el metabolismo de lípidos. La ausencia de leptina en humanos y ratas provoca obesidad mórbida y depósito de triglicéridos en tejidos no adiposos. Así, se ha encontrado que la secreción de leptina incrementa al aumentar la masa grasa (41). A pesar de que las concentraciones de leptina en plasma son mayores en sujetos obesos que en no obesos, las concentraciones de leptina en plasma por unidad de masa grasa es menor en humanos de edad avanzada y obesos comparados con individuos normales. Es así como las altas concentraciones de leptina por unidad de masa grasa se asocia con un fenotipo magro y resistencia a la obesidad inducida por dieta en ratas (18).

Se ha visto que el RNA mensajero de leptina es mayor en adipocitos de tejido adiposo subcutáneo que en adipocitos provenientes de tejido adiposo omental. Esto puede explicarse por el hecho de que los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo son más grandes que los adipocitos del tejido adiposo omental en donde la mayor concentración del mensajero está dada por el tamaño de las células. Sin embargo, se ha visto que la secreción

de leptina en sujetos obesos y no obesos es dos o tres veces mayor en tejido adiposo subcutáneo que en tejidos adiposo visceral (20).

La hiperleptinemia puede convertir a los adipocitos en células con gran cantidad de mitocondrias capaces de oxidar lípidos. Éstos sufren depleción de lípidos hasta en un 95% (41, 42, 43). Sin embargo, la hiperleptinemia que acompaña a la obesidad no tiene este efecto por la presencia de resistencia a la leptina, en donde se da la inhibición de la oxidación y mantenimiento de la función de almacén. La resistencia a la leptina se ha propuesto como una causa importante del síndrome metabólico al promover la falla de los órganos cargados de lípidos (44). La acumulación de grasa en presencia de concentraciones de leptina que, normalmente, depletarían de lípidos a los adipocitos, da evidencia del bloqueo de la acción de esta hormona. Por ejemplo, los adipocitos de organismos con hiperleptinemia son hipertróficos. El bloqueo en la actividad de la leptina, durante la obesidad inducida por dieta, se debe, en parte, a la ausencia de su receptor. También, se debe a una mayor expresión de moléculas que impiden la fosforilación de la cinasa Janus-2 o Jak-2. Esta molécula forma parte de la vía de la señalización de la leptina y es necesaria para que se de la transcripción de algunos genes, transcripción que está asociada a la unión de la leptina con su receptor. Un gen que se induce por la unión de la leptina a su receptor, es la carnitina palmitoil transferasa-1 o CPT-1. Esta enzima participa en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria para ser oxidados (45).

En resumen, la resistencia a la leptina se asocia la disminución en el número de receptores o falla del receptor de la leptina, pero también con una desregulación de la vía de la señalización de la leptina.

Otra hormona encargada de regular el equilibrio energético es la insulina, pues el control del almacenamiento y liberación de lípidos se da, en parte, por medio de dicha hormona. Las bajas concentraciones de insulina facilitan la liberación de ácidos grasos a la circulación por función de la lipasa sensible a hormonas (HSL). Por el contrario, las altas concentraciones de insulina limitan la acción de la HSL con lo que se promueve la

lipogénesis. La insulina también induce la captación de glucosa en el adipocito a través de la translocación del transportador Glut 4 (46).

La liberación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, entonces, se suprime por la insulina. Lo anterior sucede en individuos obesos y no obesos. Sin embargo, debido al aumento en la masa grasa, la concentración de ácidos grasos en sangre se incrementa en presencia de obesidad. El aumento en la concentración de ácidos grasos en circulación potencia la secreción de insulina. Lo anterior se acompaña de un efecto a largo plazo denominado lipotoxicidad como se explicó antes. Este evento es causado por los ácidos grasos presentes en células β del páncreas, lo cual determina la relación entre obesidad, resistencia a la insulina y desarrollo de diabetes tipo 2.

Esto confirma que el tejido adiposo es altamente activo y finamente regulado al ser el responsable del amortiguamiento del flujo de los ácidos grasos en la circulación dependiente de los ácidos grasos dietarios. Cuando la capacidad de amortiguamiento se sobrepasa por un constante consumo de lípidos que rebasa la oxidación de los mismos, éstos tienen que depositarse en otros tejidos generando resistencia a la insulina entre otras complicaciones (47).

La insulina y la leptina inhiben la función de algunas neuronas hipotalámicas, las cuales se encargan de sintetizar al neuropéptido Y. Este neuropéptido estimula el consumo de alimento y reduce el gasto energético promoviendo ganancia de peso. La administración central del neuropéptido Y causa resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa aun cuando se previenen sus efectos sobre la ingestión de alimento. También se ha visto que en condiciones de una señalización disminuida tanto de insulina y/o leptina a nivel del hipotálamo existe mayor secreción de neuropéptido Y, el cual contribuye a hiperfagia e intolerancia a la glucosa. (48)

Otras hormonas que participan en el metabolismo del tejido adiposo son las catecolaminas y los glucocorticoides. En el establecimiento del síndrome metabólico existen concentraciones elevadas de glucocorticoides en sangre, pues este incremento se

relaciona con hipertensión, resistencia a la insulina y dislipidemia (49). Por otro lado, los agonistas de PPAR γ reducen la activación de los corticosteroides inhibiendo el riesgo para el desarrollo de obesidad visceral, hiperlipidemia y resistencia a la insulina (50). Además, como se describe anteriormente, las catecolaminas son potentes activadores de la lipólisis en el tejido adiposo por medio de los adrenorreceptores β_1 , β_2 y β_3 , los cuales causan la activación de HSL (19).

Es, por lo tanto, importante en la investigación actual sobre el desarrollo de la obesidad buscar medios por los cuales se pueda mantener adipocitos funcionales capaces de mantener el equilibrio de las concentraciones de lípidos, en especial, de triglicéridos, y de esta manera reducir o evitar el fenómeno de lipotoxicidad.

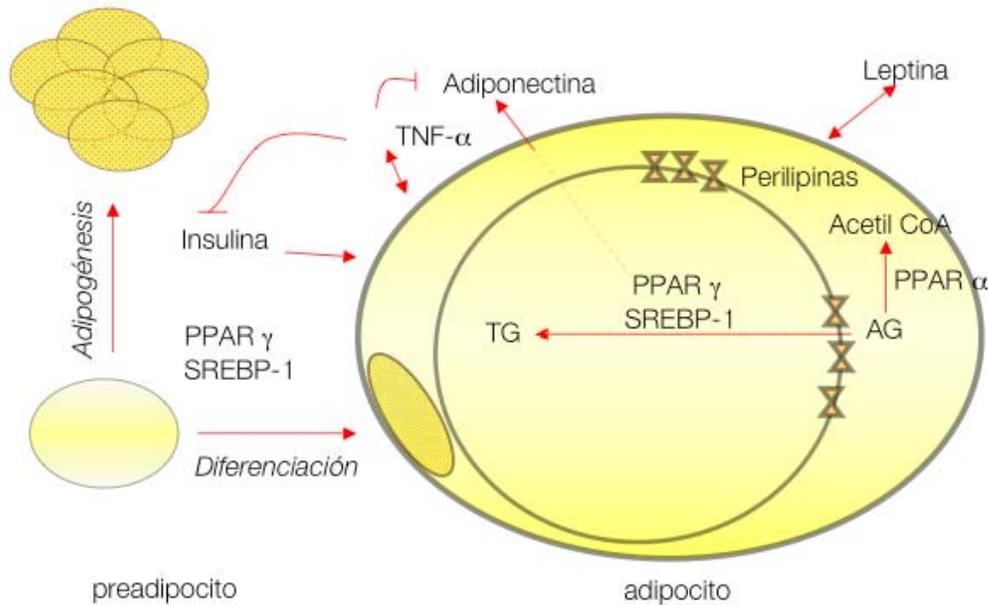


Figura 2. Metabolismo del tejido adiposo. Los factores de transcripción PPAR γ y SREBP-1 inducen la diferenciación de preadipocitos. Estos mismos factores son responsables de la transcripción de genes de enzimas lipogénicas. El PPAR α induce la expresión de genes de la vía lipolítica. El adipocito maduro tiene la capacidad de almacenar energía en la vacuola lipídica (rodeada por perilipinas) y secreta leptina, adiponectina y TNF- α y es órgano blanco de la insulina. Cuando se aumenta la liberación de TNF- α , se pierde sensibilidad a la insulina
Triglicéridos (TA); ácidos grasos libres (AG).

Proteína de soya

Desde el punto de vista de nutrición se reconoce que la ingestión de proteína vegetal sobre la proteína animal reduce el riesgo de desarrollo de enfermedades coronarias. Muchos estudios han demostrado que el consumo de la proteína de soya tiene beneficios en la salud reduciendo las concentraciones de colesterol y triglicéridos séricos (40).

El frijol de soya ha tomado importancia por su contenido de hidratos de carbono complejos, proteína, fibra soluble, fitoestrógenos y nutrientes inorgánicos. El contenido de proteína en esta leguminosa es aproximadamente 35-40% (51). La proteína de soya se

considera como un tipo de proteína completa, pues el patrón de aminoácidos es el adecuado y comparable con el estándar de oro, ovoalbúmina. El frijol de soya tiene un porcentaje de lípidos de 18 a 20% y un balance de ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados deseable (58, 23 y 15%, respectivamente) (52).

En este trabajo se utilizó un aislado de proteína de soya, el cual contiene 86% de proteína y referiremos a este aislado como “proteína de soya” (Anexo 1). Al respecto, se sabe que los aislados de proteína de soya están compuestos en un 90% por dos tipos de proteínas: la β -conglucina o globulina 7S y la glicina o 11S globulina. Éstos péptidos inducen una menor expresión de genes lipogénicos y mayor expresión de genes de enzimas relacionadas con oxidación de lípidos (53, 54, 55), aunque a la fecha se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta respuesta.

En ensayos con diferentes modelos experimentales que incluyen al síndrome nefrótico experimental, al de las ratas Zucker que tienen un defecto en el receptor de leptina, o en el de obesidad inducida por dieta, se ha observado que el consumo de proteína de soya reduce significativamente las concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero (56). Además, se ha observado en estos modelos que también se reduce la acumulación de triglicéridos y colesterol en el hígado, lo cual indica que tiene la capacidad de reducir la lipotoxicidad. Estos cambios en el hígado se han visto asociados a una menor expresión del factor de transcripción SREBP-1 y de uno de los genes blanco regulados por este factor que es la sintasa de los ácidos grasos (57). Esta disminución en la síntesis de ácidos grasos en hígado se ha visto acompañada de una disminución de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Asimismo, se ha visto que la proteína de soya en la dieta aumenta la expresión y concentración plasmática de adiponectina (39). Interesantemente, en todos estos modelos experimentales se ha observado que la ganancia de peso de estos animales alimentados con dieta que contiene proteína de soya es igual a la que tienen los animales alimentados con caseína durante la etapa de crecimiento lineal. Sin embargo, en la vida adulta los animales alimentados con caseína desarrollan obesidad. Se ha podido demostrar también que la dieta conteniendo aislado de proteína de soya disminuye el peso del tejido adiposo, además de triglicéridos, ácidos grasos libres y glucosa en plasma (40). Esta evidencia implica que

existe una diferencia en el balance del anabolismo y catabolismo lipídico y, posiblemente, en la funcionalidad de los adipocitos de animales alimentados con proteína de soya en comparación con aquellos alimentados con caseína. Sin embargo, en la actualidad existe poca información sobre los mecanismos que pudieran realizar estos cambios.

La presencia de las isoflavonas en la proteína de soya es importante, pues estos compuestos presentan una estructura química parecida a los esteroides y tienen efectos biológicos como antioxidantes y antiinflamatorios. En un estudio en donde se estimuló a los adipocitos *in vitro* con genisteína, que es la principal isoflavona junto con la daidzeína, se pudo observar una liberación significativa de glicerol, lo que da evidencia de una lipólisis acelerada a causa de la adición de genisteína (58). La genisteína también ha resultado ser un potente inhibidor genérico de cinasas de residuos de tirosinas, con lo que puede afectar a una gran variedad de procesos de transducción.

Algunos estudios previos en nuestro grupo han mostrado que la proteína de soya como un aislado que contiene proteína de soya e isoflavonas tiene su actividad protectora por medio de la probable interacción entre los dos componentes, pues la proteína de soya libre de isoflavonas pierde su acción sobre el metabolismo de los animales tratados.

Así, la proteína de soya puede tener influencia sobre la funcionalidad del tejido adiposo y el metabolismo de lípidos, por lo que probar su efecto comparado con la caseína se vuelve relevante y es el objetivo del presente protocolo de investigación.

Planteamiento del problema

La disfunción del tejido adiposo puede tener consecuencias en el metabolismo de lípidos y energético que se reflejen en el mal funcionamiento de algunos órganos como hígado y páncreas, los cuales se sabe que sufrirán daño y muerte celular por lipotoxicidad. Lo anterior puede llevar a un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Esto sucede cuando el tejido adiposo altera su capacidad de síntesis de hormonas, expresión génica y almacenaje de lípidos contribuyendo a la presencia patológica de lípidos en los órganos mencionados desarrollando lipotoxicidad.

Es posible que la dieta con proteína de soya tenga influencia en la función adecuada del tejido adiposo. En estudios anteriores se ha demostrado que la dieta administrada a ratas conteniendo proteína de soya es responsable de una mejora en el metabolismo de lípidos al compararla con la dieta con caseína. Así, la dieta con proteína de soya podría tener efecto en el tejido adiposo disminuyendo la acumulación de grasa visceral, protegiendo de manera indirecta a otros tejidos.

Justificación

La obesidad representa, en la actualidad, un problema de salud pública. Se estima que el 60% de la población mexicana sufre de sobrepeso y el 40% ha desarrollado obesidad. Como enfermedad crónica, la obesidad forma parte del síndrome metabólico, en el cual se incluye también resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares e hipertensión.

La proteína de soya se ha descrito como un potente hipolipemiante. El efecto hipolipemiante se ha visto asociado a su influencia sobre el metabolismo de lípidos. La intención de la presente investigación es la de obtener conocimiento del efecto de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo manifestada a través del estudio de la capacidad lipogénica, la expresión de genes asociados con la lipogénesis y la producción de algunas adipocinas.

El mejor conocimiento de los mecanismos por los que el tejido adiposo regula el metabolismo de lípidos y cómo las células adiposas mantienen su función es importante para desarrollar nuevas formas de prevención y tratamiento de la obesidad.

Hipótesis

En un modelo de obesidad inducida por dieta el consumo de proteína de soya tendrá influencia sobre el tejido adiposo dando lugar a un menor tamaño de los adipocitos y mayor capacidad funcional de las mismas células.

Objetivo general

Evaluar, en un modelo de obesidad inducida por dieta, el efecto de la proteína de soya sobre la funcionalidad de los adipocitos del tejido adiposo epididimal e intraabdominal a través de la determinación de la actividad lipogénica, expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y secreción de adipocinas.

Objetivos específicos

Estudiar las características morfológicas de los adipocitos del tejido adiposo epididimal e intraabdominal provenientes de ratas alimentadas con proteína de soya o caseína.

Determinar la concentración de colesterol y triglicéridos en suero de ratas pertenecientes a los diferentes grupos de estudio.

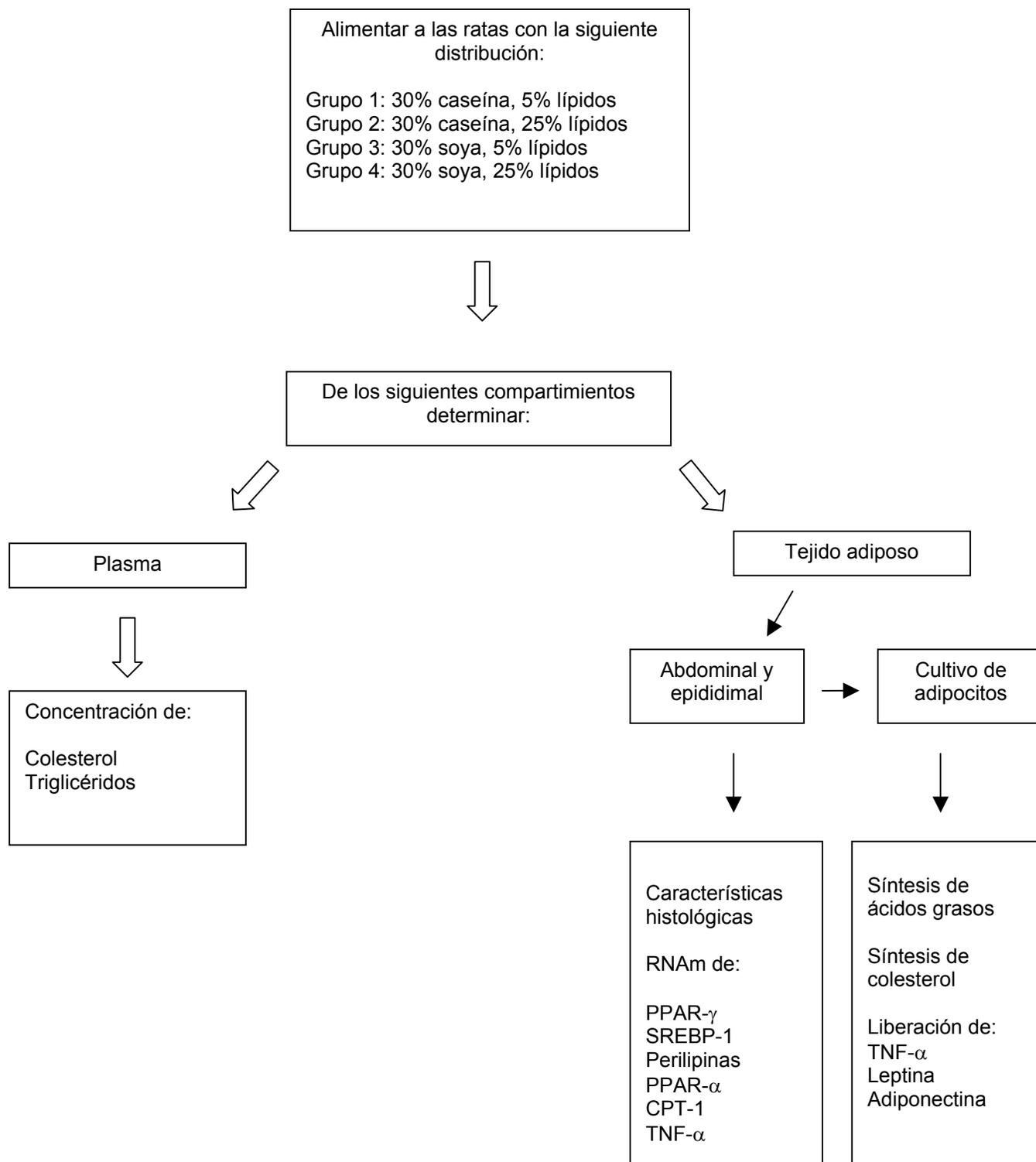
Determinar la expresión de PPAR- γ , de SREBP-1, de TNF- α , de CPT-1, de PPAR- α y de perilipinas en tejido adiposo epididimal e intraabdominal de ratas alimentadas según el grupo de estudio al que pertenecen.

Conocer la tasa de síntesis de ácidos grasos y colesterol en los adipocitos provenientes de tejido adiposo epididimal e intraabdominal de ratas según su alimentación.

Medir la liberación de hormonas o citocinas como leptina, adiponectina y TNF- α al medio de cultivo de adipocitos de tejido adiposo epididimal e intraabdominal de ratas alimentadas con proteína de soya y caseína.

Metodología

Diagrama de bloques



Material y Métodos

Alimentación de las ratas

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho con peso inicial de 180 g provenientes del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (DIEB-INCMNSZ), donde se llevó a cabo el estudio, el cual duró 160 días. El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética para uso de animales de experimentación del INCMNSZ. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con ciclos de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y al agua. Se registró diariamente el consumo de alimento y el consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en cada dieta. La composición de las dietas que se administraron a los animales se explica en el Anexo 2. Todos los componentes de la dieta se obtuvieron de Harlan Teklad, excepto el aislado de proteína de soya, el cual se obtuvo de Protein Technologies.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

Grupo 1 (Cas). Es el grupo control, el cual se alimentó con 30% de caseína como fuente de proteína y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (4 kcal/g).

Grupo 2 (Cas HF). Es uno de los grupos experimentales, el cual fue alimentado con 30% de caseína, 20% de lípidos en forma de manteca y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (5 kcal/g)

Grupo 3 (Soy). Es un grupo experimental, también, al cual se le trató con una dieta que contenía 30% de proteína de soya y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (4 kcal/g).

Grupo 4 (Soy HF). Es otro de los grupos experimentales, éste fue alimentado con 30% de proteína de soya, 20% de lípidos en forma de manteca y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (5 kcal/g).

Con base en lo anterior, se tienen dos variables de estudio, las cuales son: tipo de proteína y concentración de lípidos en la dieta. Estas dos fueron determinantes en los resultados obtenidos de acuerdo con el objetivo del trabajo, el cual señala, que en un modelo de

obesidad inducida por dieta se evaluará la influencia de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo.

Obtención de Muestras y Tejidos

Los animales se decapitaron o fueron anestesiados con pentobarbital (Pfizer, 12.6 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Para los primeros se recolectó la sangre en tubos con gel separador y activador de coagulación para la determinación de parámetros bioquímicos (triglicéridos y colesterol). De los mismos animales se tomaron, también, muestras de tejido adiposo visceral intraabdominal y epididimal para la extracción del RNA total y cortes histológicos. Para la obtención de RNA, los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C . Para el análisis histológico el tejido se mantuvo en formalina hasta su inclusión en parafina como se describirá. Los animales a los que se les anestesió se les extrajo el tejido adiposo con el fin de obtener cultivo de adipocitos y, posteriormente, medir la síntesis de ácidos grasos y colesterol en el mismo cultivo. Además, el medio de cultivo se utilizó para medir liberación de citocinas como se explicará más adelante.

Determinación de parámetros bioquímicos en suero

Con el fin de medir la concentración de triglicéridos y colesterol en suero en los distintos grupos de estudio, se obtuvo el suero de las ratas que fueron decapitadas después de 160 días de alimentación. Estos parámetros se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos a través de reactivos de diagnóstico *in vitro* (Sera-Pak, Bayer Corporation). También, en suero, se determinaron las concentraciones de leptina, adiponectina y TNF- α como más adelante se describirá.

Extracción de RNA total

El RNA total de los distintos tejidos adiposos viscerales (intraabdominal y epididimal) se aisló por el método de Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987). Posteriormente, las muestras (5 μg de RNA) se sometieron a electroforesis en un gel desnaturizante de formaldehído-agarosa al 1.5% para comprobar su integridad (Anexo 3). La concentración de RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm; a esta longitud de onda 1 densidad óptica equivale a 40 mg/ml, la pureza se determinó como óptima cuando la relación de la absorbancia a 260/280 nm era mayor a 1.8.

Determinación de expresión génica por rt-PCR cuantitativo (tiempo real)

Para determinar si la proteína de soya en la dieta tiene efecto sobre la expresión génica y, por tanto, en la funcionalidad del tejido adiposo, se cuantificó la expresión génica de factores de transcripción relacionados con el metabolismo de lípidos (PPAR α , PPAR γ , SREBP-1c, Applied Biosystems, Rn00566193_m1, Rn00440945_m1, ATOVARPE1_PE1), perilipinas (Applied Biosystems, Rn00558672_m1), CPT-1 y TNF- α (Applied Biosystems, Rn00562055_m1) usando un equipo de PCR tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). La técnica consiste en la obtención de DNA complementario a partir de RNA por medio de la acción de la transcriptasa reversa. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de los genes mencionados utilizando el DNA complementario, la mezcla maestra (Applied Biosystems, 4304437) y los oligonucleótidos correspondientes. La mezcla se colocó en la placa termocicladora del sistema de detección mencionado. La detección se realizó utilizando sondas TaqMan para cada gen y para actina (Applied Biosystems Rn00667869_m1) como control endógeno para normalizar los valores de expresión. Anteriormente, se realizó el rango dinámico de cada gen con el fin de conocer la concentración ideal de amplificación de los mismos (Anexo 4).

Análisis histológico

Para evaluar las características morfológicas de los adipocitos provenientes del tejido adiposo intraabdominal y epididimal de ratas alimentadas según se explicó, se hizo un análisis histológico. Las muestras que habían sido almacenadas en formalina se trataron con solventes orgánicos para posteriormente ser embebidas en parafina. Los bloques se cortaron en secciones de cuatro micras de espesor utilizando un microtomo. Los mismos se posicionaron en un portaobjetos en donde la muestra fue desparafinada. La muestra fue, entonces, teñida con hematoxilina y eosina (colorantes catiónico y aniónico respectivamente) con el fin de evidenciar DNA y proteínas. Después, se determinó el área de los adipocitos usando un programa de análisis de imagen (Leica Q500-IW) adaptado a un microscopio (LeicaDMLS) (45).

Cultivo de adipocitos

Con el objeto de conocer la síntesis de ácidos grasos y colesterol y medir la liberación de hormonas y citocinas por adipocitos abdominales y epididimales de ratas utilizadas en el estudio se prepararon cultivos de adipocitos. Algunas de las ratas alimentadas con las dietas anteriormente mencionadas se anestesiaron para obtener aproximadamente 1g de tejido adiposo abdominal y epididimal. Para el aislamiento de las células se valió del método de Rodbell (Rodbell, 1968) con algunas modificaciones como se describe a continuación. El tejido adiposo se picó en amortiguador Krebs Ringer HEPES con adición del 2% albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (Roche, 10775835001). Se eliminó el amortiguador para posteriormente añadir 10 ml del mismo amortiguador complementado con 1.25 mg/ml de colagenasa tipo II (Roche) a 37° C con agitación a 100 ciclos/min durante 45 min.

La suspensión se diluyó en 13 ml del amortiguador frío y los adipocitos se separaron de otras células por medio de filtración con cuatro capas de gasa. A la mezcla se le añadieron 50 ml del amortiguador frío y se centrifugó a 400 x g por 5 min. Este paso se repitió tres veces suponiendo que las células del estroma y otras fueron eliminadas al vaciar la solución por aspiración, pues las células flotantes corresponden a los adipocitos a estudiar. Por último, las células se enjuagaron con 13 ml de medio de cultivo D'MEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco, 12100-046) con 10% de suero fetal bovino (Gibco, 16000-044) y se repitió la centrifugación.

Las células que quedaron en el paquete flotante se colectaron como adipocitos primarios, se contaron en un hematocitómetro y se sembraron 10^5 células en cajas de Petri conteniendo 2 ml de medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062).

Anteriormente, se determinó el porcentaje de viabilidad de las mismas utilizando azul de Tripán. Este porcentaje resultó 90% o mayor para todos los ensayos.

Medición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol

Al medio de cultivo en donde se incubaron las células se le adicionó acetato de sodio marcado radiactivamente [$1-^{14}\text{C}$] (CFA13, Amersham Biosciences) a una actividad específica de 18-21 dpm/pmol y una concentración final de 0.5 mM durante 3 y 6 h. El medio de cultivo en cada caja se transfirió a un tubo de vidrio y la monocapa de células,

después de ser lavada tres veces consecutivas, se disolvió en 1 ml de NaOH 0.1 N. Las células y el medio se pusieron en contacto de nuevo y se tomó una alícuota para el cálculo de la concentración de proteína total. A la suspensión de células y medio de cultivo se le agregaron 2 ml de etanol, 1 ml de KOH al 75% y 10 μ l de solución acarreadora de colesterol [1,2 3 H] (50 Ci/mmol), (TRK330, Amersham Biosciences) y 10 μ l de solución acarreadora de ácido oléico [9, 10(n)- 3 H] (8 Ci/mmol), (TRK140, Amersham Biosciences). La suspensión se sometió a Baño María a una temperatura de 75°C durante 1 h. Después de que se dejó enfriar toda la noche, la fase orgánica (colesterol) se extrajo con éter de petróleo (JT Baker) y se evaporó con gas de nitrógeno. La fase acuosa restante se trató con hexano (JT Baker) con el fin de extraer la fase superior u orgánica y, con ella, los ácidos grasos. Esta segunda extracción orgánica también se evaporó a sequedad. Los residuos fueron, entonces, transferidos a una placa de cromatografía en capa fina (Sigma-Aldrich, Z122777-25EA) para medir la incorporación del acetato en lípidos. El corrimiento de los residuos que contenían colesterol se llevó a cabo con cloroformo, y el corrimiento de los residuos de ácidos grasos se hizo a partir de una solución con heptano, ácido acético y éter de petróleo. El revelado de las placas con yodo sublimado (JT Baker) permitió obtener las manchas en donde se rastrearon los ácidos grasos y colesterol formados a partir de acetato de sodio. Además, éstas contenían colesterol o ácidos grasos tritizados como moléculas acarreadoras. Las manchas de lípidos sobre la sílica gel fueron raspadas e incluídas en un frasco de centelleo conteniendo 4 ml de líquido de centelleo a base de xileno. Las emisiones beta del 14 C y del 3 H se determinaron, finalmente, en un contador de centelleo (Wallac 1411, Liquid Scintillation Counter) (59-64). La incorporación de acetato marcado a colesterol o a ácidos grasos se expresó como pmoles/h x mg de proteína.

Medición de la concentración de citocinas en suero o liberadas al medio de cultivo

Para el cumplimiento del objetivo que propone medir la liberación de adipocinas por adipocitos de ratas alimentadas según el grupo de estudio se utilizaron dos técnicas. La liberación o concentración sérica de leptina y adiponectina se determinó por medio de un radioinmunoanálisis comercial que contiene un antígeno marcado radiactivamente (Linco Diagnostics, RL-83K, MADP-60HK). La concentración en suero de TNF- α y la cantidad de TNF- α liberada al medio de cultivo se midió por ensayos de ELISA basados en

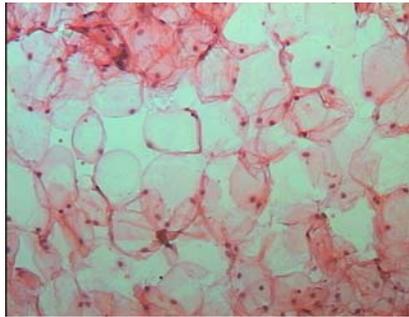
inmunoensayos tipo sandwich usando anticuerpos específicos (Alpco Diagnostics, 45-UTNFAR-3014) (65-68).

Análisis estadístico

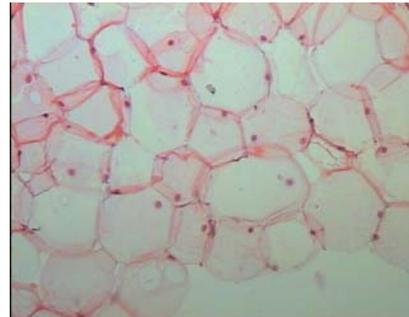
Los resultados se encuentran expresados como la media de cada grupo más/menos el error estándar de la media. Las diferencias entre los valores obtenidos por las técnicas descritas se evaluaron por un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Las diferencias significativas entre el grupo control y los experimentales se determinaron por medio de la prueba de Fisher usando el programa StatView para Macintosh. Se señalan las diferencias entre los valores con letras distintas indicando diferencias estadísticamente significativas ($a > b > c > d$, $p < 0.05$).

Resultados

1. Cultivo de adipocitos. Se aislaron exitosamente adipocitos provenientes del tejido adiposo a estudiar (intraabdominal y epididimal). Durante la estandarización de la técnica se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular correspondiente a 90% o mayor en el cultivo celular. Además, durante la obtención de las células, y en cada paso de lavado, se fijaron células con el objeto de observarlas y verificar la presencia de adipocitos. Por medio de este ensayo se demostró que las células cultivadas corresponden a células con características morfológicas de células adiposas como a continuación se muestra.



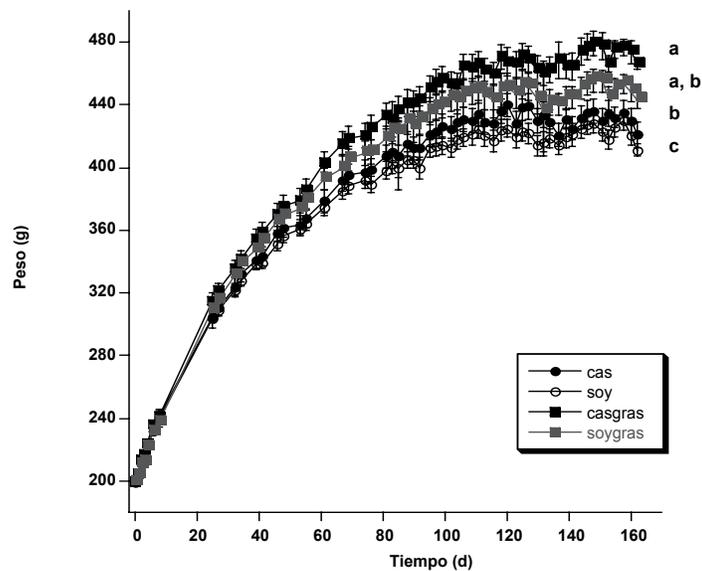
Tejido adiposo intraabdominal



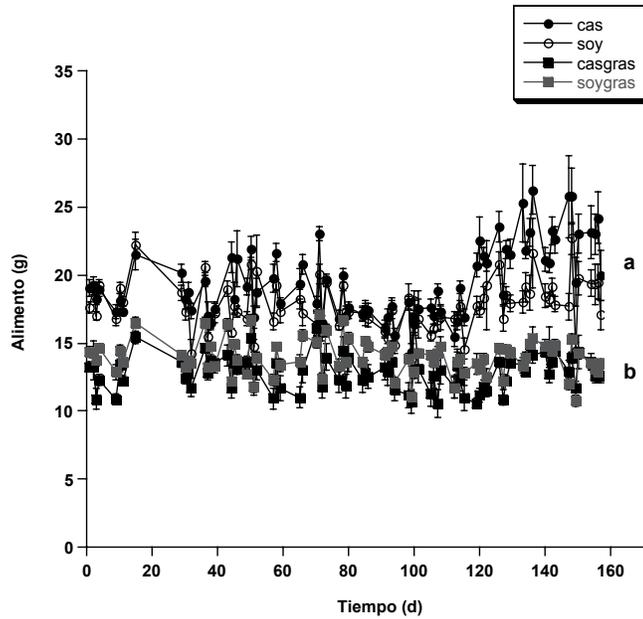
Tejido adiposo epididimal

2. Alimentación de las ratas. A continuación se muestran las gráficas de ganancia de peso y consumo de alimentos de los animales que fueron utilizados para el presente estudio. Los resultados revelan una ganancia de peso mayor para los animales que fueron alimentados con caseína y 25% de lípidos, como se esperaba. A pesar de que el mismo porcentaje de lípidos se empleó para alimentar a las ratas del grupo soya-grasa, éstas no ganaron el mismo peso que el grupo alimentado con caseína y grasa. Por las razones anteriores, y por la menor ganancia de peso para el grupo de soya, el modelo utilizado fue un modelo de obesidad inducida por dieta.

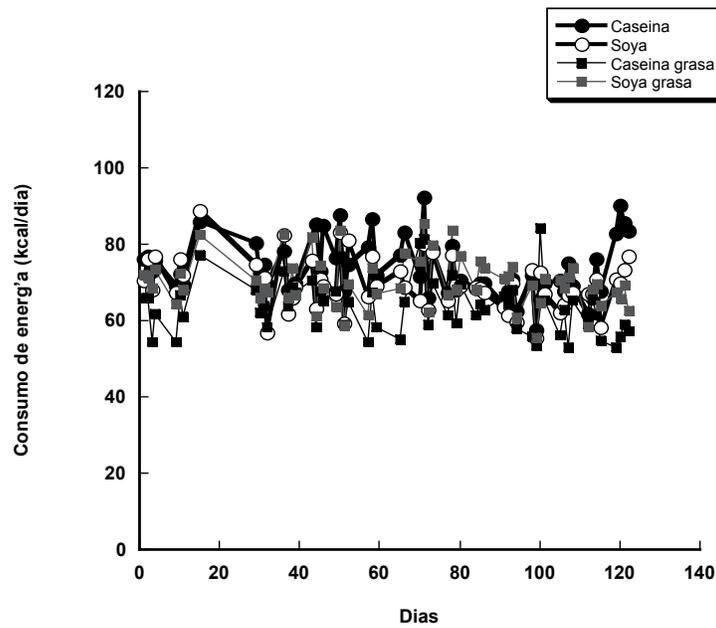
El consumo de alimento resultó ser menor para los animales con mayor porcentaje de lípidos en la dieta (25%), o bien para los grupos Cas HF y Soy HF. Sin embargo, cuando se ajustó el consumo de alimento al consumo de energía, encontramos que los animales de diferentes grupos mantuvieron una ingestión de energía similar durante el tiempo de alimentación.



Gráfica 1. Ganancia de peso, $n=15$, $a>b>c$, $p<0.05$
Los valores se expresan como promedios \pm el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

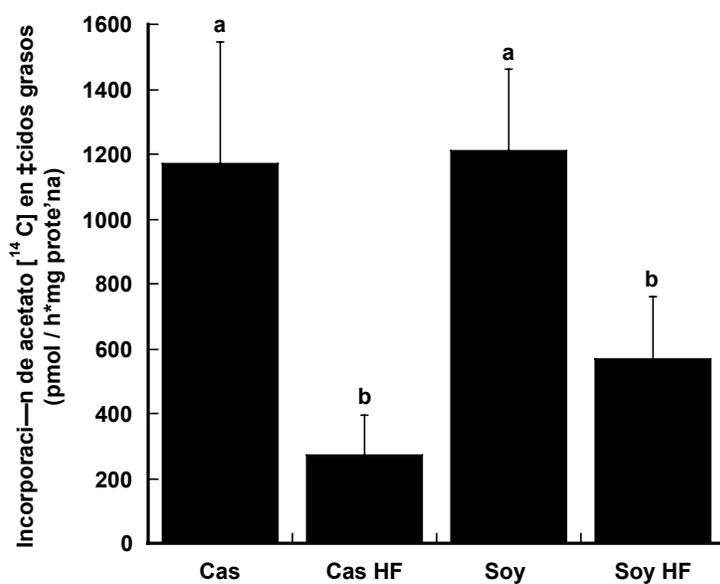


Gráfica 2. Consumo de alimento, n=15
 Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
 Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 3. Consumo de energía, n=15
 Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

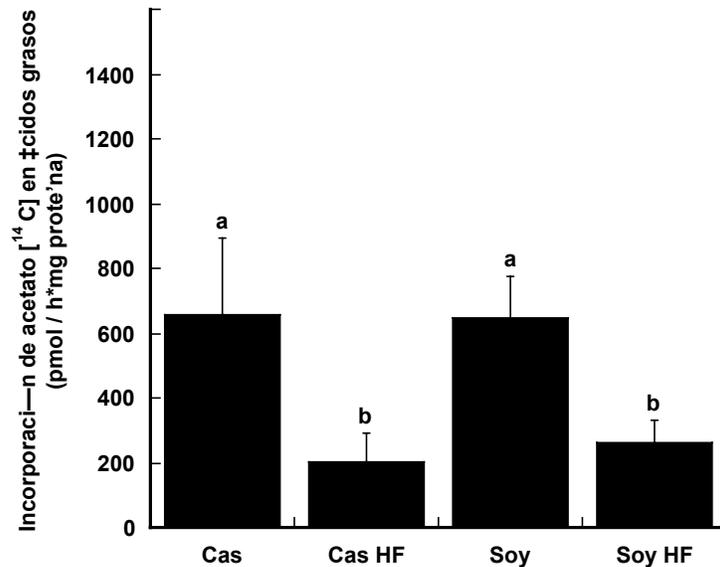
3. Medición de la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Al medir la síntesis de lípidos por adipocitos se observó que, en primer lugar, la síntesis de colesterol es mucho menor que la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo. Se nota, en todos los casos (síntesis de ácidos grasos o colesterol en tejido adiposo abdominal y epididimal) que existe, significativamente más producción de lípidos por parte de los adipocitos provenientes de ratas alimentadas con 5% de lípidos en comparación con ratas alimentadas con 25% de lípidos. De esta forma, hay 2.5 a 4 veces más producción de ácidos grasos por parte de ratas alimentadas con 5% de lípidos y alrededor de 2.5 a 7 veces más síntesis de colesterol en ratas que consumieron 5% de lípidos.



Gráfica 4. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

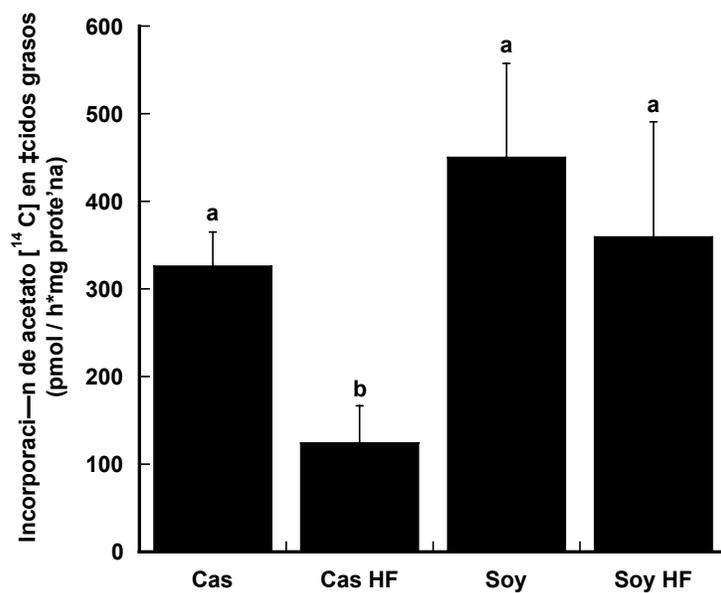
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 5. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

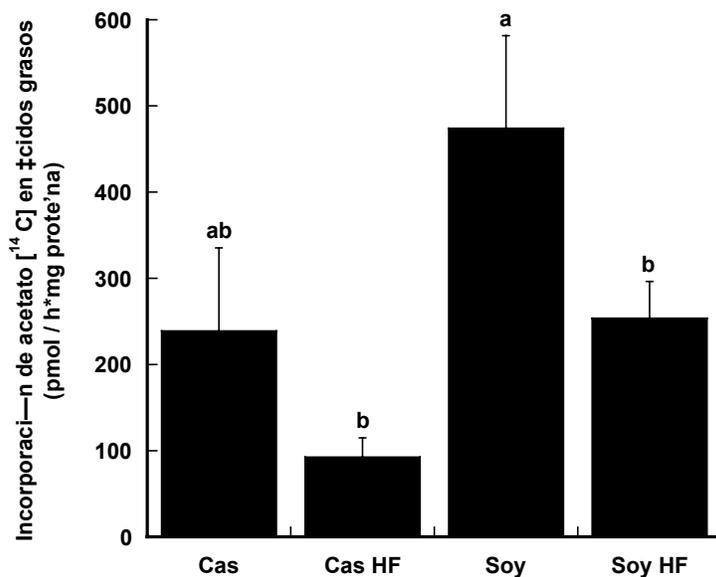
Las excepciones de la afirmación de la mayor producción de lípidos por parte de adipocitos provenientes de animales alimentados con 5% de lípidos son dos. Una de ellas es la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo abdominal durante 6 h de cultivo, en donde se ve que hay mayor producción de ácidos grasos por parte de los adipocitos provenientes de ratas alimentadas con proteína de soya y 25% de lípidos que por parte de adipocitos de ratas alimentadas con caseína y 25% de lípidos (Gráfica 6).



Gráfica 6. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

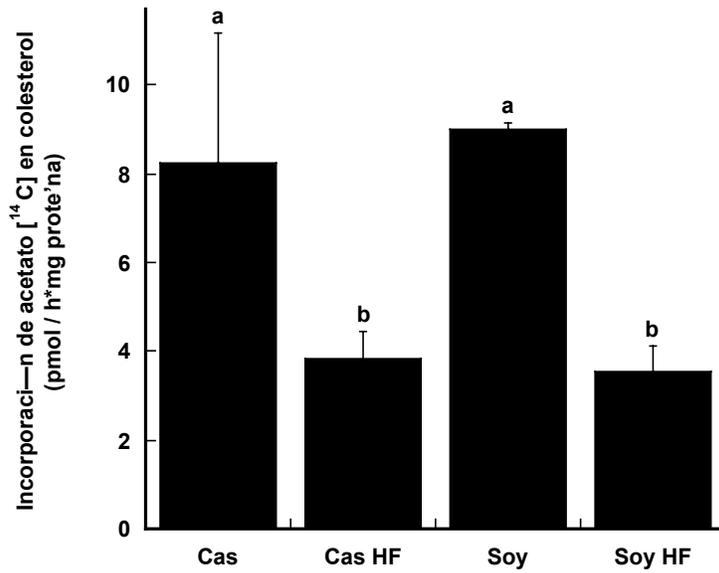
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 7. Síntesis de ácidos grasos a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h, n=4, a>b, p<0.05

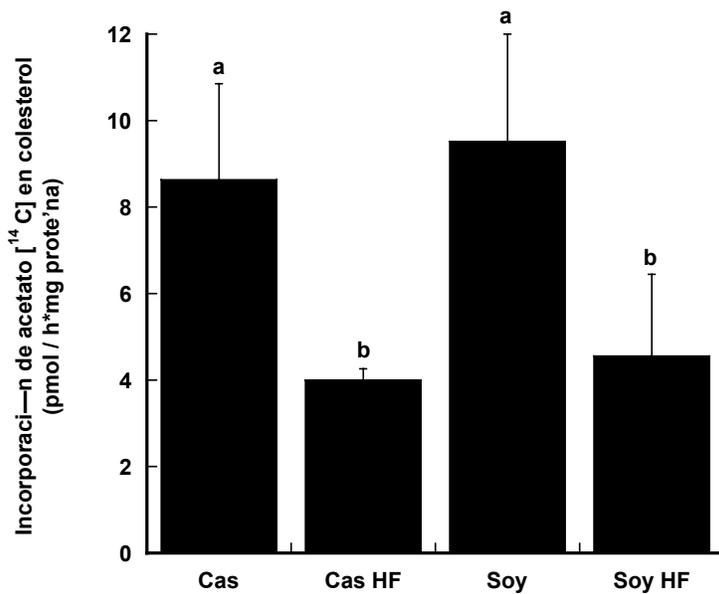
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



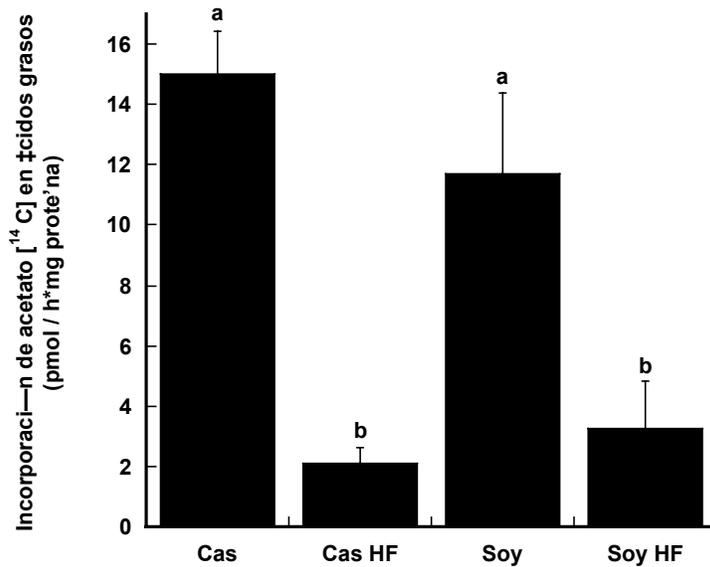
Gráfica 8. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 9. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [¹⁴C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

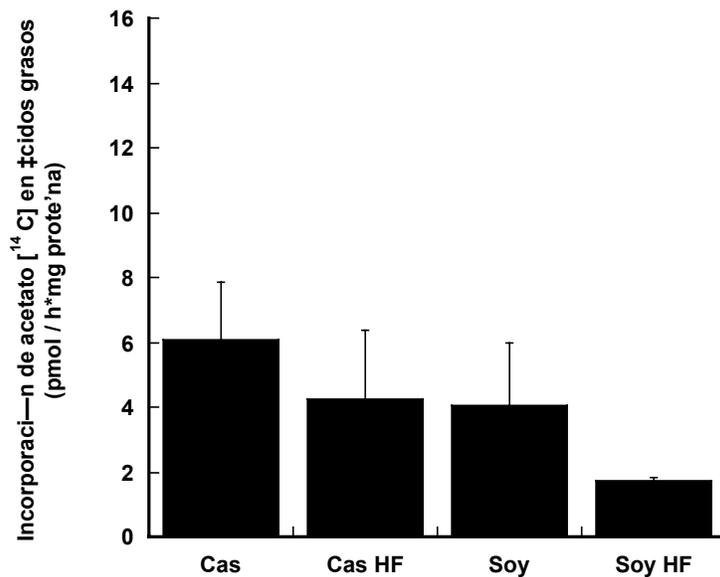
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 10. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [^{14}C] en adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

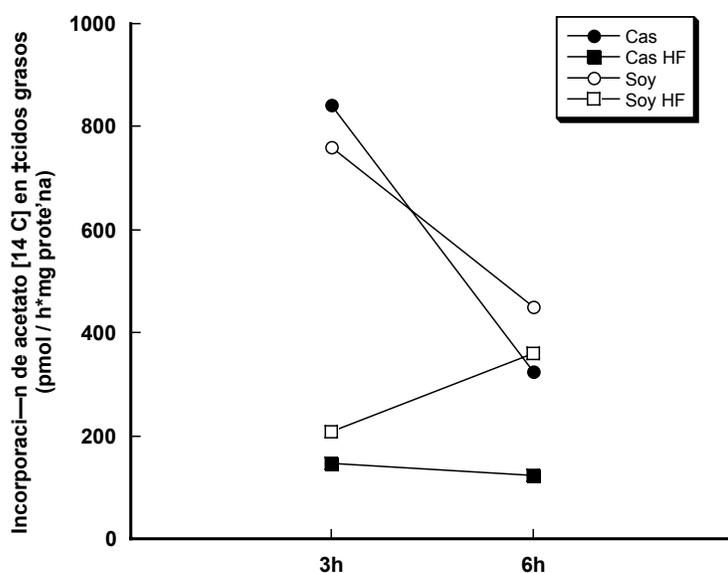
Otra excepción a la tendencia mencionada es la síntesis de colesterol por parte del tejido adiposo epididimal en donde no hay diferencias significativas entre los grupos de alimentación (Gráfica 11).



Gráfica 11. Síntesis de colesterol a partir de acetato de sodio [^{14}C] en adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h, n=4

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

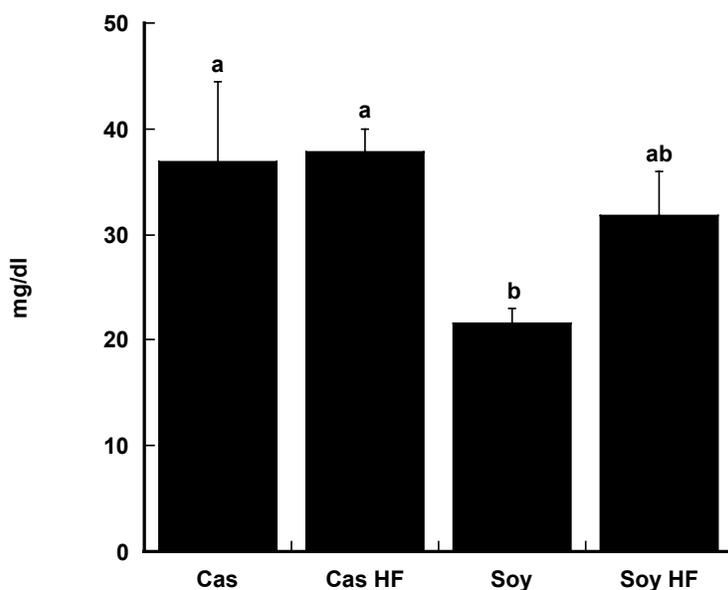
También se concluye, de esta serie de gráficas, que a las 6 h de incubación con acetato hay menor concentración de ácidos grasos formados a partir de acetato marcado que a las 3 h de cultivo por lo que se graficaron las diferencias (Gráfica 12).



Gráfica 12. Síntesis de ácidos grasos en adipocitos abdominales en función del tiempo

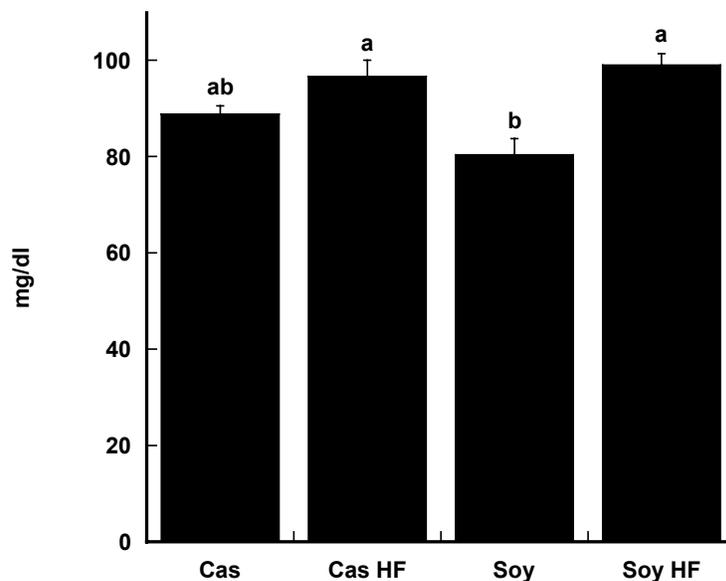
A partir de esta gráfica se podría especular que después de las 3 h de cultivo la disminución en la incorporación de acetato marcado a los ácidos grasos posiblemente se deba a una oxidación de estos, sin embargo se requieren estudios posteriores para confirmarlo. Si este es el caso, la oxidación sería mayor en los cultivos de adipocitos de ratas que consumieron una dieta con 5% de lípidos.

4. Determinación de parámetros bioquímicos en suero. Las siguientes gráficas muestran la concentración de colesterol y triacilglicéridos en el suero de las ratas que fueron alimentadas con las diferentes dietas. La concentración de triacilglicéridos en suero resultó significativamente menor en el grupo que fue alimentado con proteína de soya y 5% de lípidos. Resultaron diferentes los valores del grupo alimentado con caseína y el grupo alimentado con soya (1.7 veces menor), ambos con una concentración de lípidos en la dieta del 5%, por lo cual la soya en la dieta fue determinante para prevenir el establecimiento de hipertrigliceridemia. (Gráfica 13)



Gráfica 13. Concentración de triacilglicéridos en suero, n=4, a>b, p<0.05
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

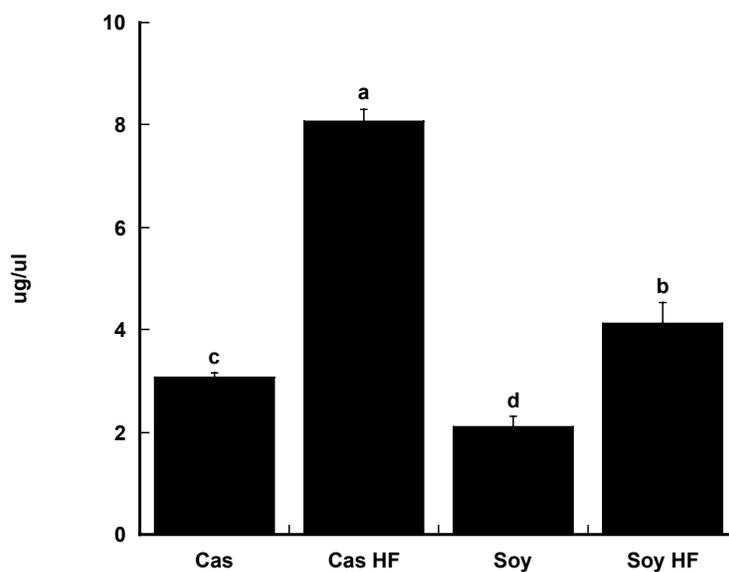
Por su parte, la concentración de colesterol en suero fue menor en el grupo alimentado con proteína de soya y 5% de lípidos de igual forma que la concentración sérica de triacilglicéridos. Sin embargo, el tipo de proteína no resultó ser la variable que tiene influencia sobre la concentración sérica de colesterol, sino la concentración dietaria de lípidos al haber diferencias significativas entre el grupo de animales alimentados con proteína de soya y proteína de soya con 25% de lípidos (Gráfica 14). Así, la concentración de colesterol en el grupo Soy es 1.2 veces menor que Soy HF.



Gráfica 14. Concentración de colesterol en suero, n=3, a>b, p<0.05
 Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
 Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

5. Medición de la concentración de hormonas y citocinas liberadas. Después de 3 y 6 h de cultivo se midió la concentración de leptina liberada al medio. Las mayores concentraciones de leptina son liberadas por adipocitos provenientes de tejido adiposo intraabdominal de ratas alimentadas con caseína y grasa y de ratas alimentadas con soya y grasa. Las diferencias que se indican son significativas mostrando que la obesidad inducida por dieta provoca una mayor secreción de la hormona. La concentración de leptina en

suero depende del tipo de proteína dietaria y la concentración de lípidos en la dieta (Gráfica 15), pues existe 2.6 veces mayor concentración de leptina en el suero del grupo Cas HF con respecto al grupo Cas y es 2 veces más abundante la leptina en suero del grupo Cas HF en comparación con el grupo Soy HF.

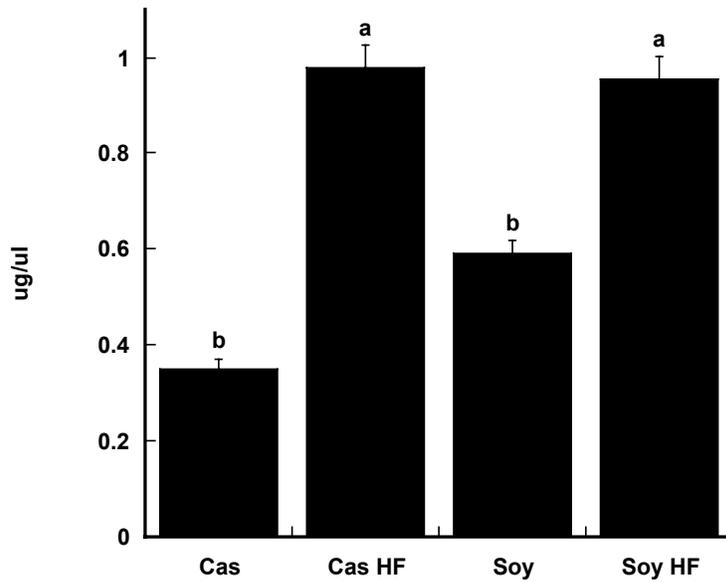


Gráfica 15. Concentración de leptina en suero, n=3, a>b>c>d, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

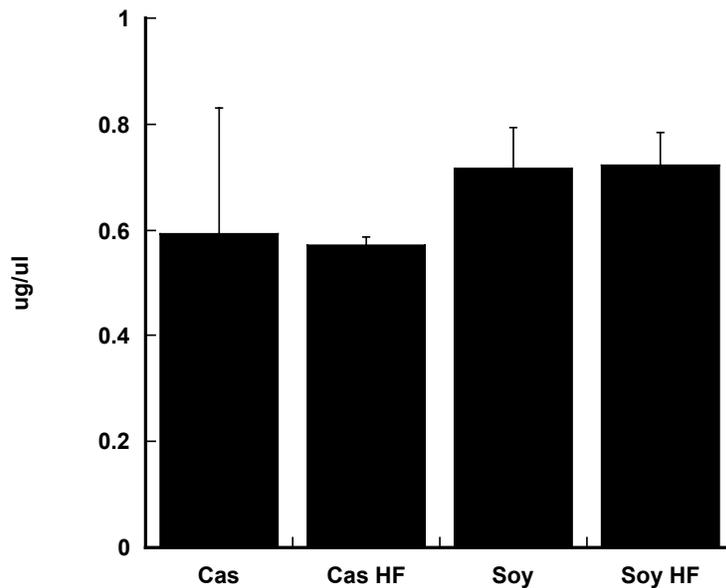
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

La liberación de leptina al medio de cultivo, después de 3 h de incubación, fue mayor por células adiposas abdominales de ratas alimentadas con 25% de lípidos. En estas células, la presencia de grasa saturada en la dieta de animales que consumieron caseína aumentó la liberación de leptina 2.5 veces, pero en animales que consumieron proteína de soya esta liberación fue 1.3 veces mayor. Sin embargo, no se encontraron tales diferencias en los valores de leptina liberada al medio de cultivo por adipocitos epididimales (Gráficas 16 y 17).



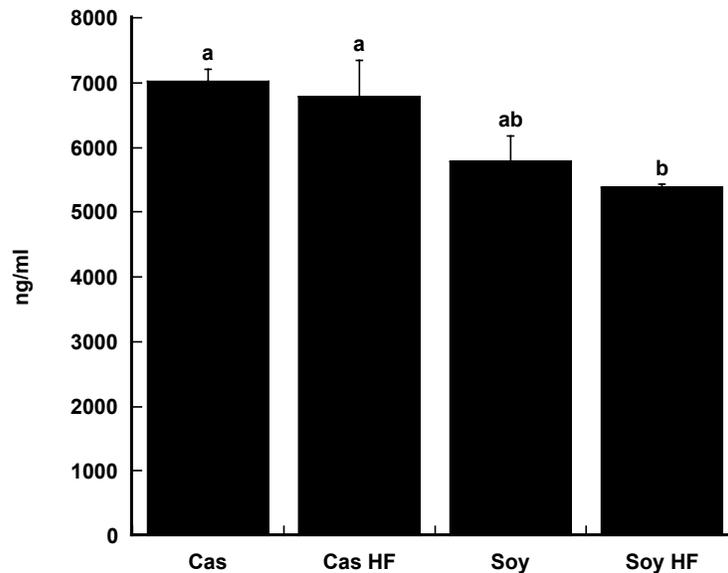
Gráfica 16. Liberación de leptina por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



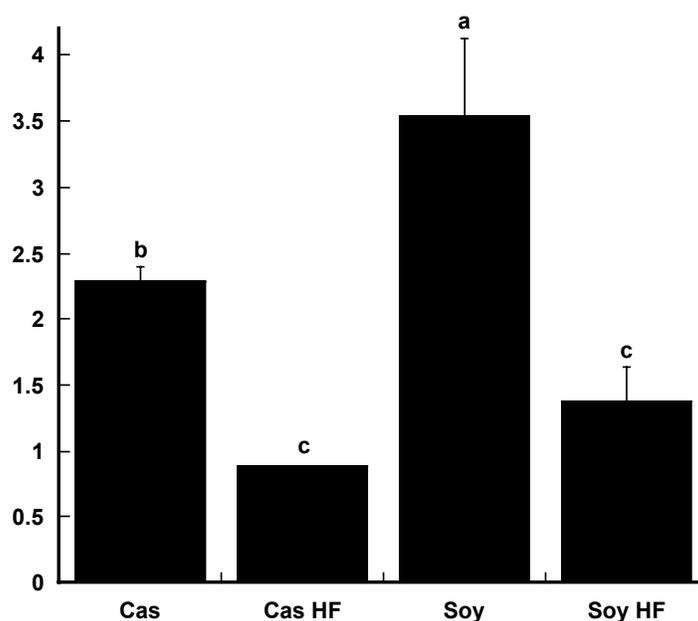
Gráfica 17. Liberación de leptina por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h, n=4

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.



Gráfica 18. Concentración de adiponectina en suero, $n=3$, $a>b$, $p<0.05$
 Los valores se expresan como promedios \pm el error estándar de la media.
 Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

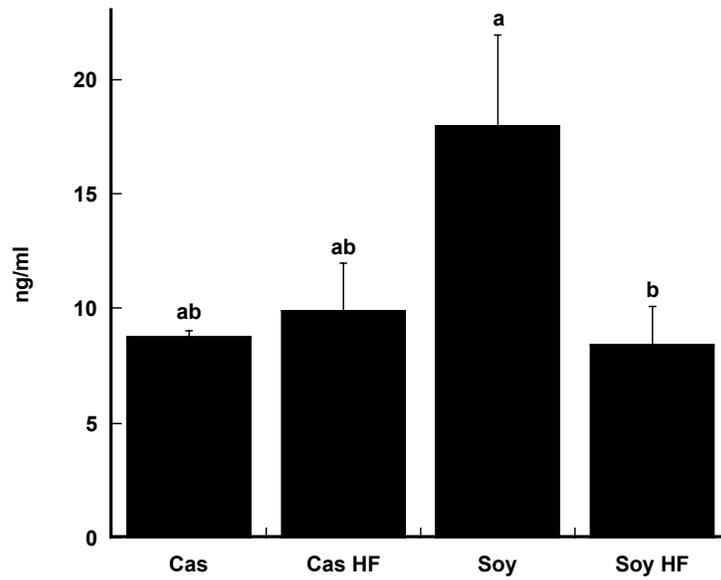
La concentración de adiponectina en suero fue mayor en los grupos alimentados con caseína (Gráfica 18). La adiponectina es la adipocina que se secreta en mayor proporción, por lo que la mayor concentración sérica de adiponectina podría ser reflejo de un mayor porcentaje de masa grasa en estos animales. Así, la concentración de adiponectina se normalizó utilizando la concentración de leptina en suero como un indicador de adiposidad dando lugar a la siguiente gráfica (Gráfica 19).



Gráfica 19. Relación adiponectina/leptina en suero, n=3, a>b>c>d, p<0.05
 Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
 Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

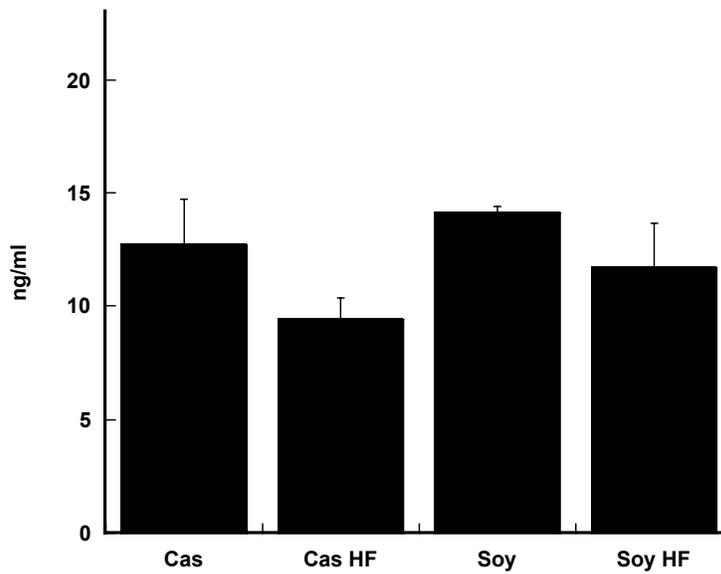
La relación adiponectina/leptina resultó 1.5 veces mayor en el suero de ratas alimentadas con proteína de soya y 5% de lípidos con respecto al suero de ratas que consumieron caseína y 5% de lípidos, lo cual sugiere que la proteína de soya en la dieta promueve mayor síntesis de adiponectina por unidad de masa grasa (Gráfica 19).

También se midió la liberación, *in vitro*, por 3 y 6 h, de adiponectina al medio de cultivo de adipocitos. En todos los casos se observa una tendencia similar, es decir, los valores de liberación de adiponectina son mayores por adipocitos de ratas alimentadas con proteína de soya y 5% de lípidos (Soy). Sin embargo, sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos Soy y Soy HF mostrando que la mayor concentración dietaria de lípidos tiene influencia sobre la secreción de adiponectina, disminuyéndola de 2 a 2.4 veces (Gráficas 20-23).



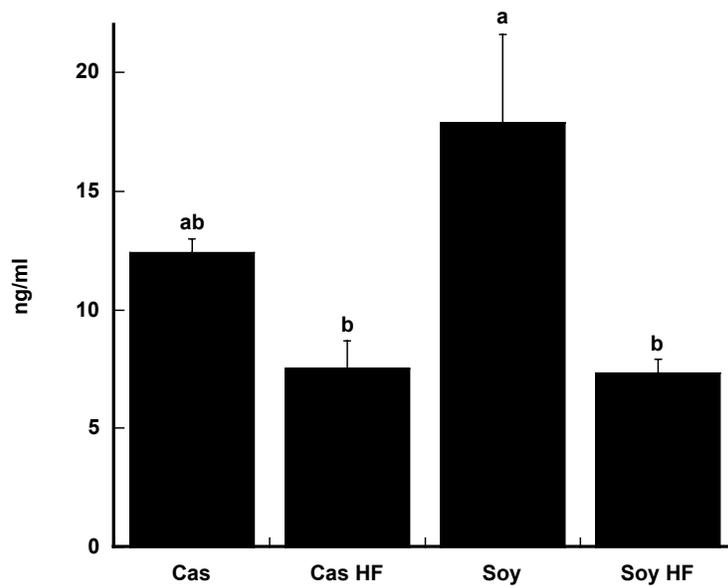
Gráfica 20. Liberación de adiponectina por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



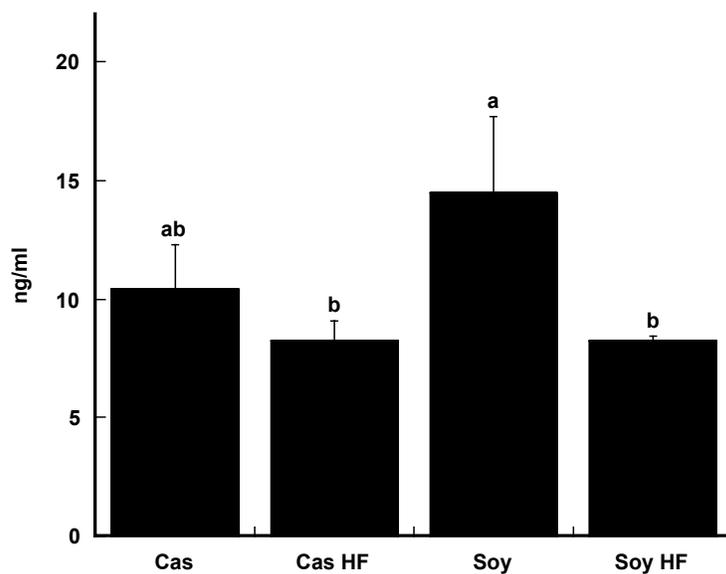
Gráfica 21. Liberación de adiponectina por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h, n=4

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.



Gráfica 22. Liberación de adiponectina por adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h, n=4, $a>b, p<0.05$

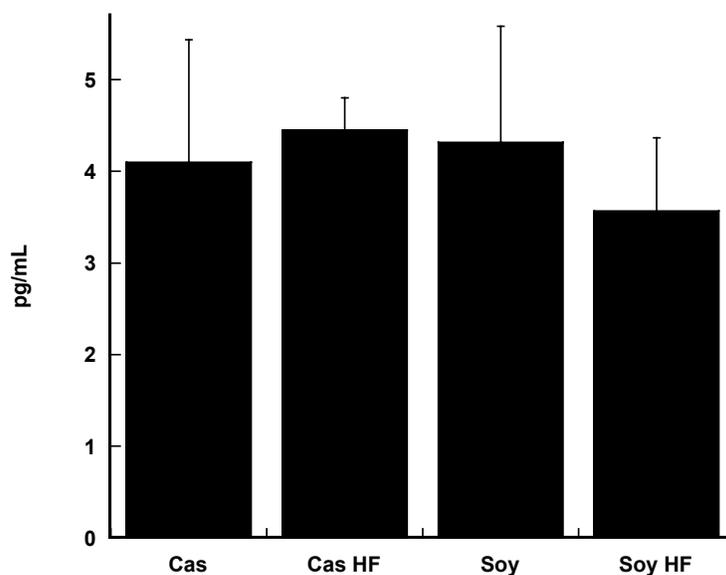
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 23. Liberación de adiponectina por adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h, n=4, $a>b, p<0.05$

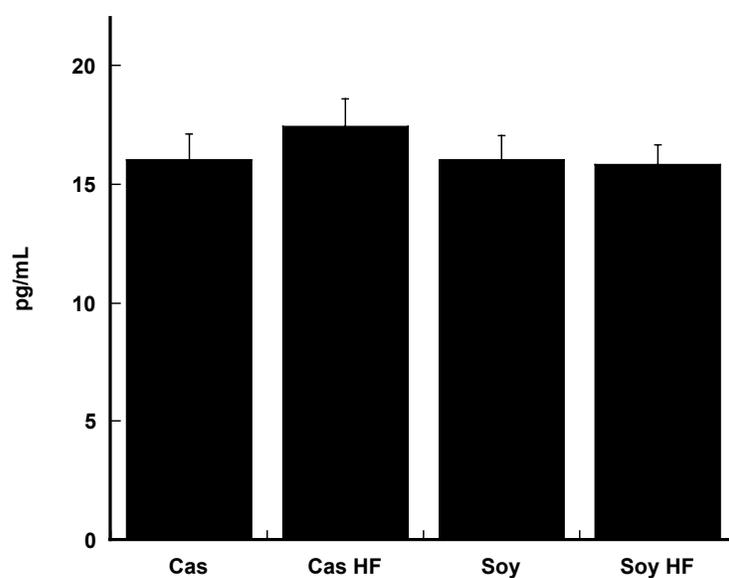
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

Otra adipocina que fue medida en suero y en el medio de cultivo de adipocitos fue TNF- α . En suero, la concentración de TNF- α no fue diferente entre los grupos. Esto quiere decir que no hubo una respuesta inflamatoria generalizada, dependiente de TNF- α en el modelo animal utilizado (Gráfica 24).

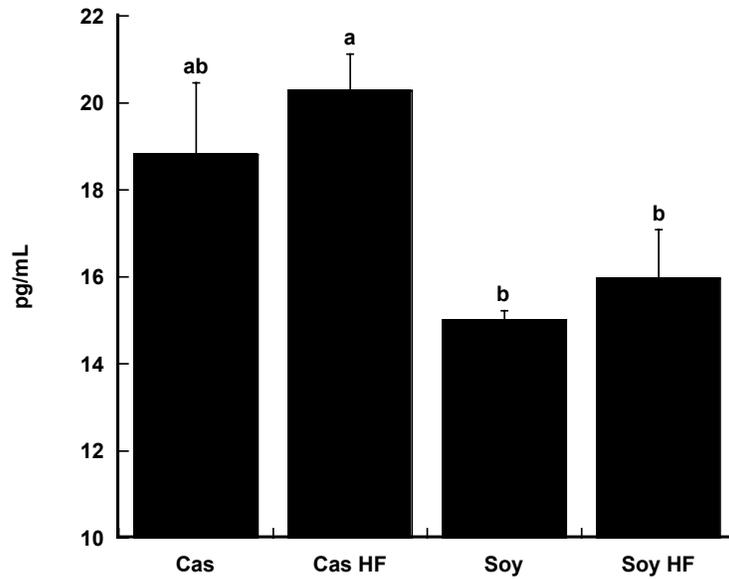


Gráfica 24. Concentración de TNF- α en suero, n=3
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

Al determinar la concentración de TNF- α en el medio de cultivo de células adiposas en los dos tejidos adiposos por 3 y 6 h, se encontraron diferencias entre los grupos sólo al analizar la liberación de la citocina por adipocitos epididimales cultivados por 3 h. En este caso, la liberación de TNF- α es mayor por parte de células adiposas provenientes de ratas alimentadas con caseína y 25% de lípidos con respecto a las células adiposas de ratas alimentadas con proteína de soya y 25% de lípidos. En los demás casos, se nota una tendencia similar sin llegar a la significancia (Gráficas 25-28).

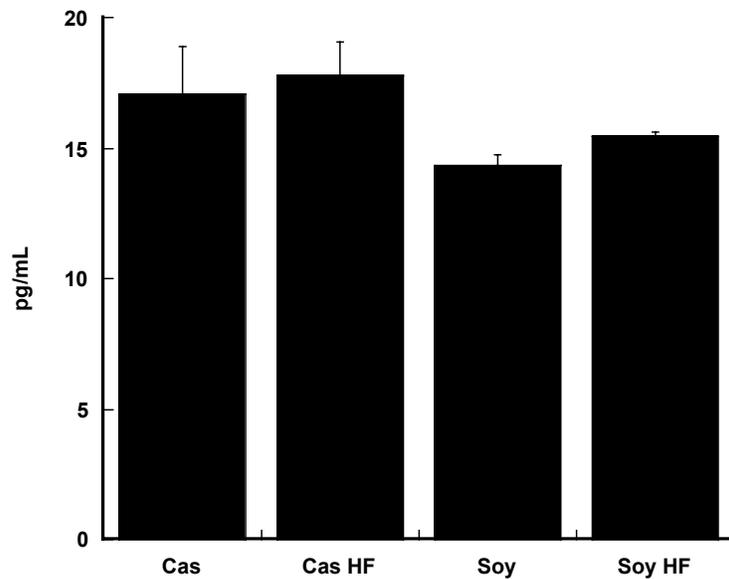


Gráfica 25. Liberación de TNF- α por adipocitos abdominales en cultivo durante 3 h, n=4
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

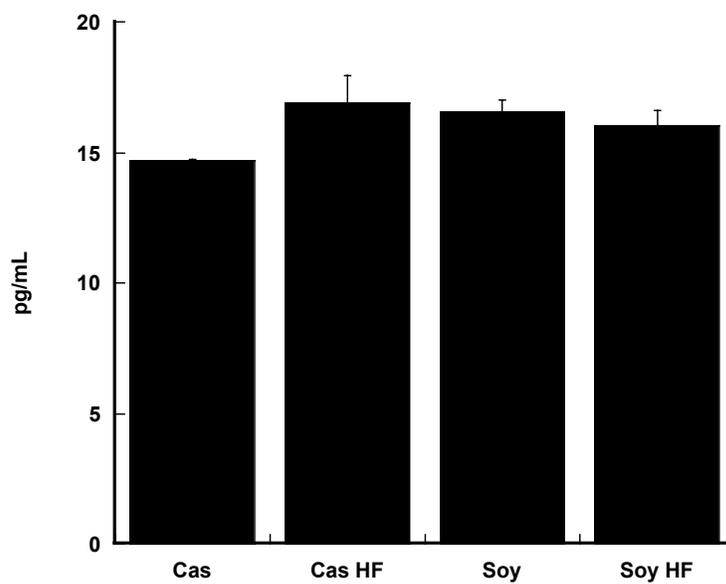


Gráfica 26. Liberación de TNF- α por adipocitos epididimales en cultivo durante 3 h, n=4, a>b, p<0.05

Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 27. Liberación de TNF- α por adipocitos abdominales en cultivo durante 6 h, n=4
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.



Gráfica 28. Liberación de TNF- α por adipocitos epididimales en cultivo durante 6 h, n=4
Los valores se expresan como promedios \pm el error estándar de la media.

6. Determinación de la expresión génica por RT-PCR cuantitativo (tiempo real)

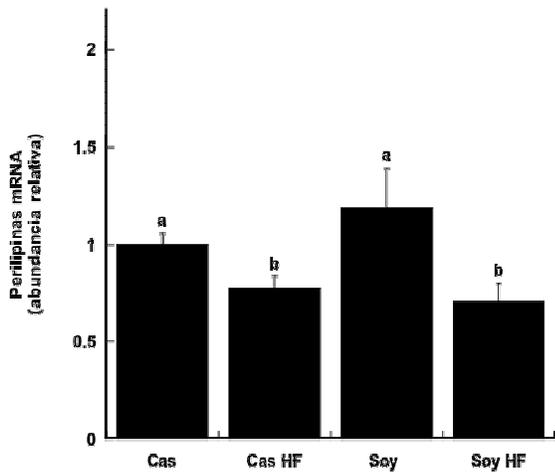
La expresión, medida como la abundancia relativa de RNAm de PPAR γ fue distinta en tejido adiposo abdominal y epididimal. La expresión de PPAR γ en tejido adiposo abdominal fue significativamente mayor cuando los animales fueron alimentados con proteína de soya y 5% de lípidos. Sin embargo, en el tejido adiposo epididimal los valores más altos de expresión de PPAR γ corresponden a los grupos Soy HF y Cas. Esto nos da idea de que el tejido adiposo responde de diferente forma dependiendo de la región de donde se extraiga. Como se explicó, PPAR γ induce la transcripción de genes lipogénicos, por lo que en tejido adiposo abdominal hay mayor expresión de genes lipogénicos por parte de animales que consumieron proteína de soya y 5% de lípidos. Sin embargo, en el tejido adiposo epididimal el mismo comportamiento se observó por parte de los animales que consumieron caseína y 5% de lípidos o proteína de soya con 25% de lípidos (Gráficas 29 y 30).

Gráfica 29. Abundancia relativa de mRNA de PPAR γ en tejido adiposo abdominal, n=3

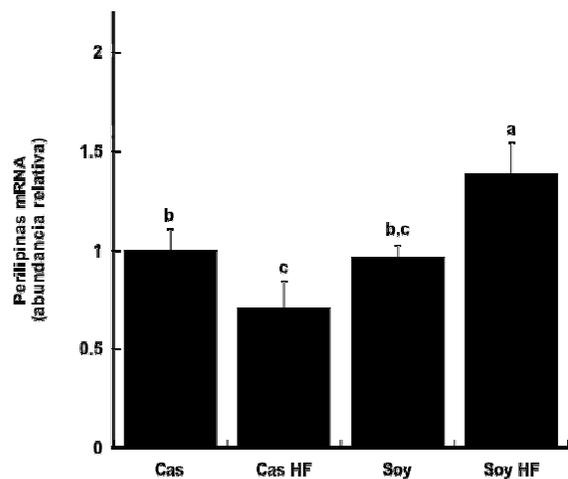
Gráfica 30. Abundancia relativa de mRNA de PPAR γ en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media. Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

Las perilipinas, como ya se mencionó, son proteínas que previenen la utilización de los lípidos contenidos en la vacuola lipídica de los adipocitos. En el tejido adiposo abdominal, la alta concentración de lípidos en la dieta promueve la menor expresión de perilipinas. Sin embargo, en el tejido adiposo epididimal, la mayor expresión de este gen se da en ratas alimentadas con soya y 25% de lípidos, la cual es significativamente diferente de la expresión dada por el grupo de animales alimentado con caseína y 25% de lípidos. Por lo tanto, en el tejido adiposo epididimal, la proteína de soya dietaria en presencia de altas concentraciones de lípidos, puede disminuir la expresión de perilipinas (Gráficas 31 y 32).



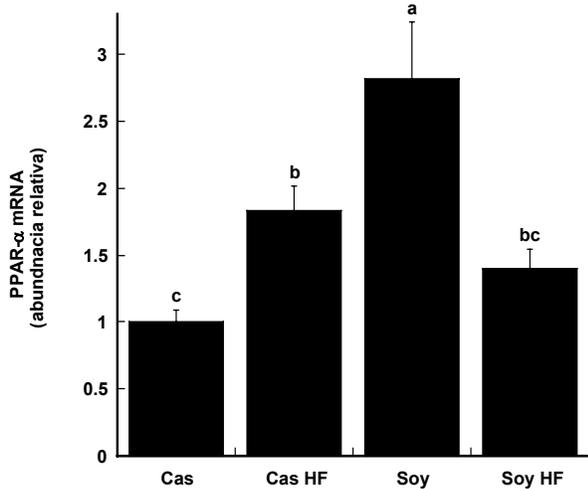
Gráfica 31. Abundancia relativa de mRNA de perilipinas en tejido adiposo abdominal, n=3



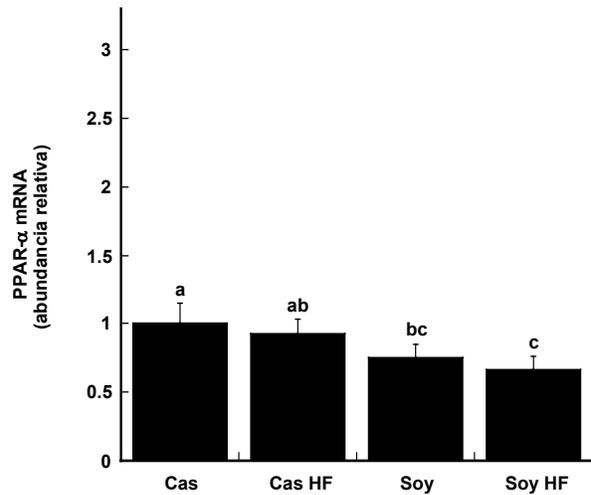
Gráfica 32. Abundancia relativa de mRNA de perilipinas en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media. Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

El factor de transcripción $PPAR\alpha$, al contrario que $PPAR\gamma$, promueve la transcripción de genes que intervienen en el proceso lipolítico. En el tejido adiposo abdominal, este proceso se vio incrementado cerca de 3 veces cuando los animales fueron alimentados con proteína de soya y 5% de lípidos con respecto a aquéllos alimentados con caseína y 5% de lípidos. Por otra parte, la expresión de este mismo factor se abate en tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con soya en comparación con aquéllas alimentadas con caseína (Gráficas 33 y 34).



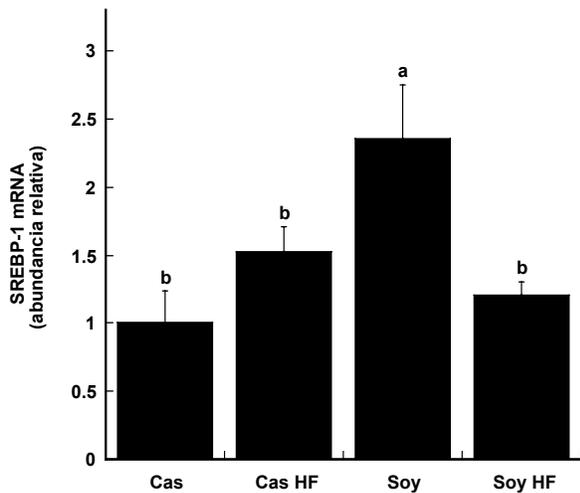
Gráfica 33. Abundancia relativa de mRNA de PPAR α en tejido adiposo abdominal, n=3



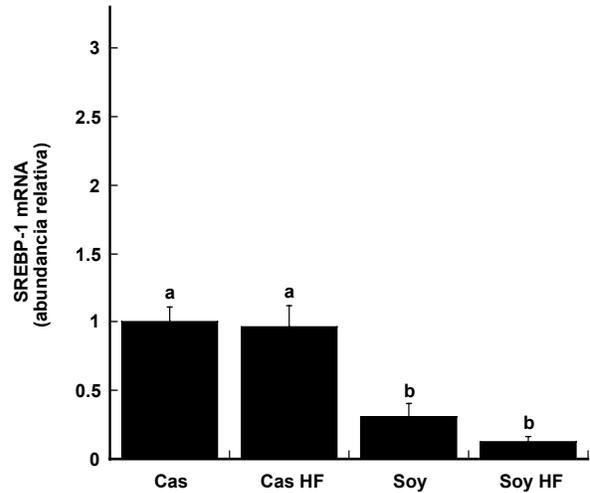
Gráfica 34. Abundancia relativa de mRNA de PPAR α en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media. Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se midió la expresión de SREBP-1, el cual induce la expresión de genes necesarios para la síntesis de ácidos grasos, se encontraron resultados similares a los que se encontraron al medir la expresión de PPAR α . Por ejemplo, en tejido adiposo abdominal, la máxima expresión del factor se dio por las ratas alimentadas con soya y 5% de lípidos, la cual resultó 2.3 veces mayor que la expresión dada por la alimentación con caseína y 5% de lípidos. Sin embargo, la alimentación con soya, independientemente de la concentración de lípidos disminuye la expresión de SREBP-1 en tejido adiposo epididimal 2.2 veces. Esto sugiere que, probablemente, la lipogénesis dependiente de SREBP-1, es mayor en tejido adiposo abdominal cuando la dieta está basada en proteína de soya, contrariamente a lo observado en el tejido adiposo epididimal.



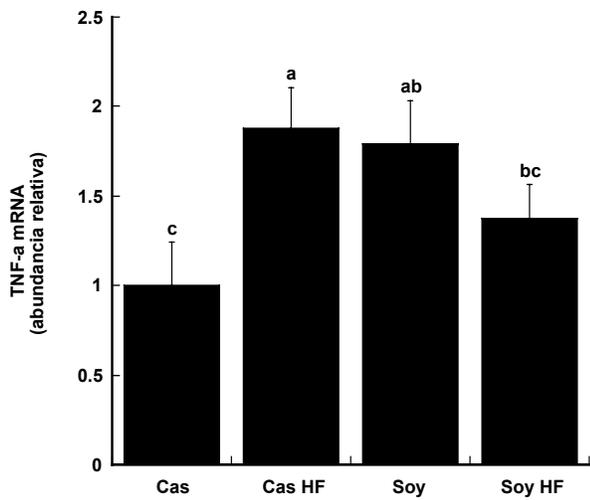
Gráfica 35. Abundancia relativa de mRNA de SREBP-1 en tejido adiposo abdominal, n=3



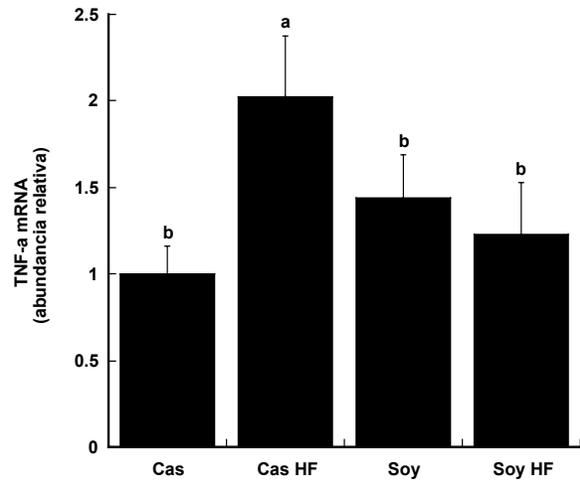
Gráfica 36. Abundancia relativa de mRNA de SREBP-1 en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media. Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la concentración del mensajero de $\text{TNF-}\alpha$, en tejido adiposo abdominal y epididimal, ésta es mayor cuando los animales se alimentaron con caseína y 25% de lípidos. Las diferencias entre los tejidos adiposos fueron importantes, pues la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ en tejido adiposo abdominal se incrementó en el grupo de caseína con respecto al grupo de soya, sólo cuando las dietas se acompañaron de grasa saturada (25% de lípidos). Pero en el tejido adiposo epididimal, todos los grupos mantuvieron una expresión similar a excepción del grupo Cas HF, el cual tuvo el doble de expresión de la citocina con respecto a su control, Cas (Gráficas 37 y 38).



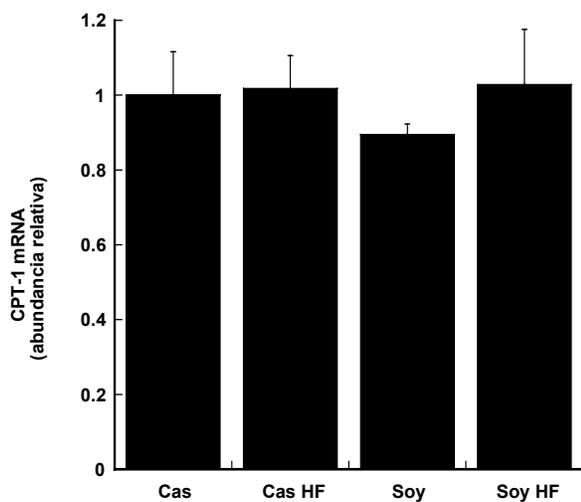
Gráfica 37. Abundancia relativa de mRNA de TNF- α en tejido adiposo abdominal, n=3



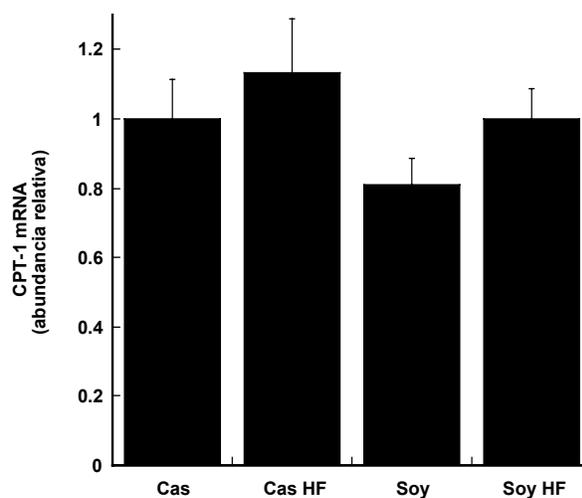
Gráfica 38. Abundancia relativa de mRNA de TNF- α en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media. Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

También se midió la expresión de CPT-1, enzima encargada de transportar a los ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria para ser oxidados. La dieta no tuvo influencia sobre la expresión de este gen en ninguno de los tejidos.



Gráfica 39. Abundancia relativa de mRNA de CPT-1 en tejido adiposo abdominal, n=3



Gráfica 40. Abundancia relativa de mRNA de CPT-1 en tejido adiposo epididimal, n=3

Los valores son relativos a la expresión de actina y se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.

7. Análisis histológico

Con el propósito de conocer el área de las células adiposas en los distintos tejidos y en animales con las dietas experimentales mencionadas se prepararon cortes y tinciones como se explica anteriormente. A continuación se muestran fotografías representativas de los cortes utilizados (20x).

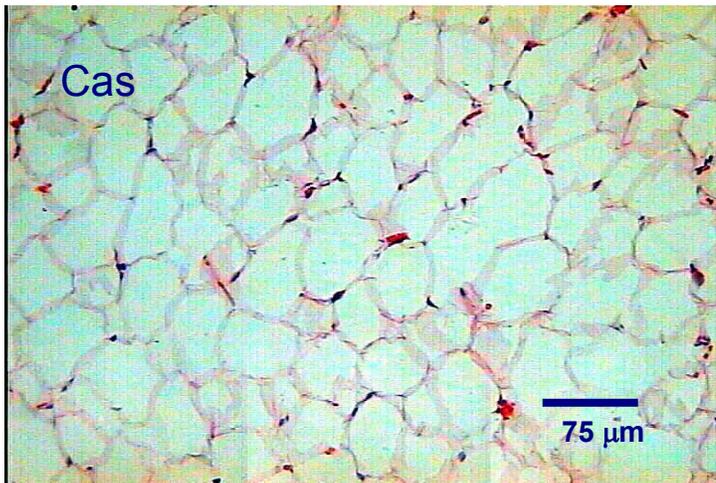


Figura 3. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con caseína

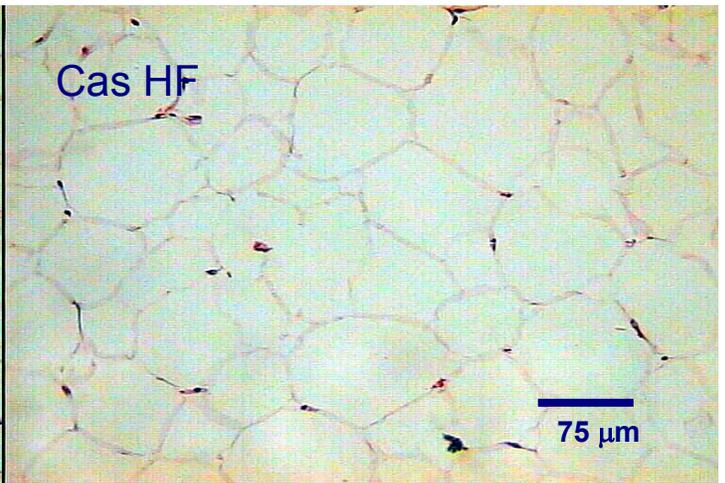


Figura 4. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con caseína y grasa

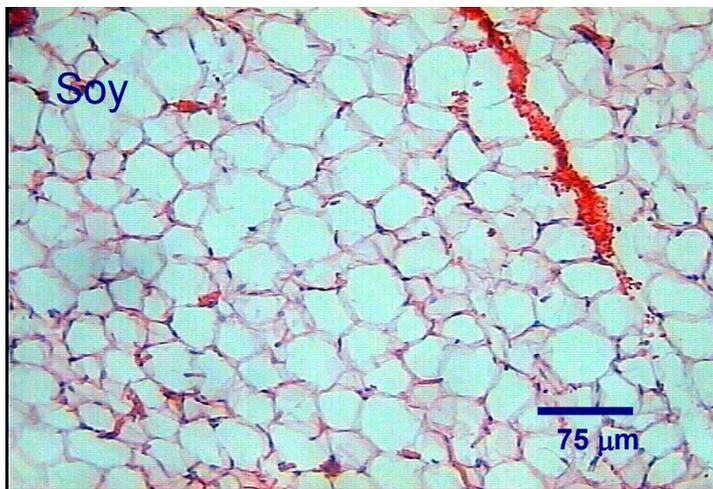


Figura 5. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con soya

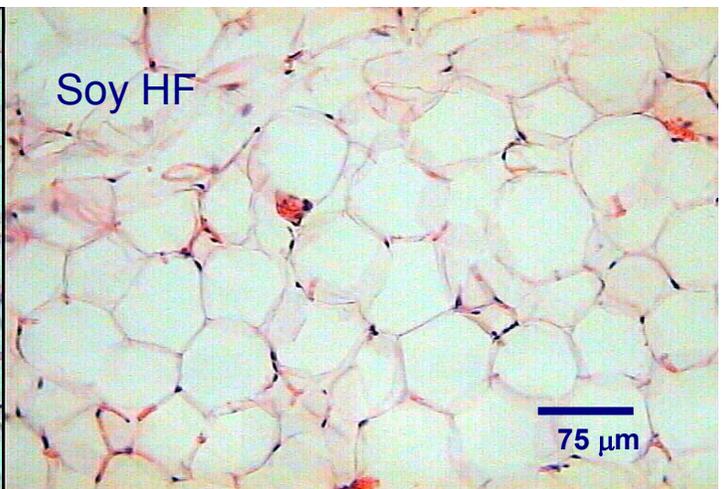
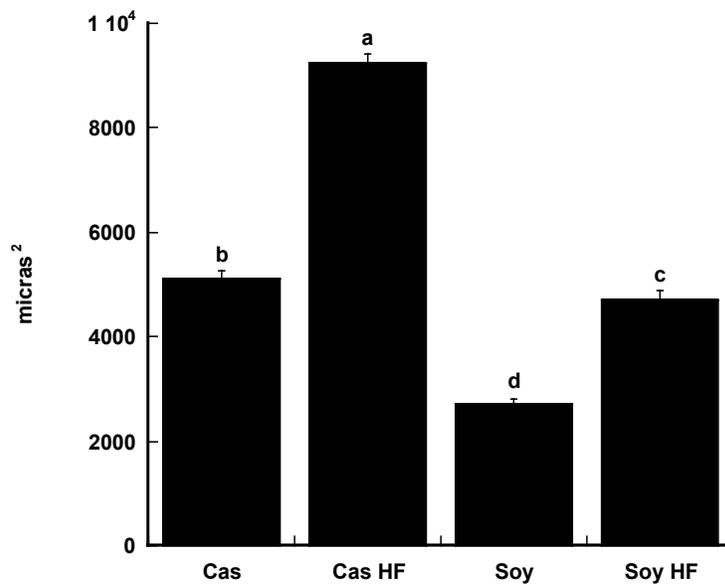
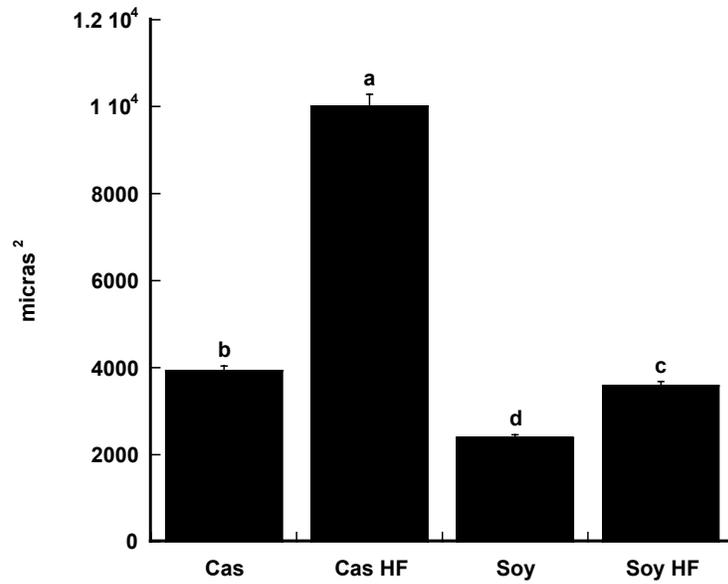


Figura 6. Micrografía óptica de tejido adiposo de ratas alimentadas con soya y grasa

En las gráficas 41 y 42 se muestran los datos de área de los adipocitos abdominales y epididimales. Los resultados indican que, tanto el tipo de proteína, como la concentración de lípidos en la dieta, tienen influencia sobre el tamaño de los adipocitos abdominales y epididimales. Así, las células significativamente más pequeñas resultaron las células de animales que consumieron proteína de soya y 5% de lípidos. Además la proteína de soya es protectora contra la hipertrofia del tejido adiposo, pues a pesar de que se alimentaron las ratas con proteína de soya y 25% de lípidos, las células provenientes de estos animales mantuvieron un tamaño celular más pequeño que las células de ratas que consumieron caseína y 5% de lípidos. La concentración de lípidos en la dieta tiene influencia, también sobre el tamaño de los adipocitos al ser más grandes si la dieta de los animales a los que se extrajo el tejido adiposo contenía 25% de lípidos.



Gráfica 41. Promedio del área de adipocitos abdominales, n=3, a>b>c>d, p<0.05
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 42. Promedio del área de adipocitos epididimales, n=3, a>b>c>d, p<0.05
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas.

Resumen de resultados

- Existe menor síntesis lípidos, menor liberación de adiponectina y mayor liberación de leptina al medio de cultivo por adipocitos de animales que fueron alimentados con una alta concentración de lípidos.
- La proteína de soya disminuye la concentración de leptina y triacilglicéridos y aumenta la relación adiponectina/leptina en suero.
- La proteína de soya promueve menor liberación de TNF- α al medio de cultivo de adipocitos epididimales, pero no abdominales.
- El mensajero de TNF- α se expresa menormente en ambos tejidos cuando los animales fueron alimentados con proteína de soya.
- La proteína de soya promueve mayor expresión de perilipinas en tejido adiposo epididimal.
- La proteína de soya en la dieta incrementa la concentración del mensajero de SREBP-1, PPAR γ y PPAR α en tejido adiposo abdominal, pero no en epididimal.
- La proteína de soya en la dieta previene la hipertrofia del tejido adiposo.

Discusión

El rápido incremento en la incidencia de obesidad y las alteraciones relacionadas a la enfermedad, particularmente el síndrome metabólico, se ha convertido en una razón importante para el estudio profundo del tejido adiposo y su función (69).

El desarrollo del tejido adiposo visceral podría tener influencia sobre el desarrollo del síndrome metabólico como se ha planteado en estudios anteriores (70). En el presente estudio y estudios anteriores en nuestro laboratorio, se demostró que la proteína de soya protege a los animales contra la ganancia de peso y obesidad (Gráficas 1, 2 y 3). Por esta razón, el objetivo del trabajo fue determinar si la proteína de soya tenía efecto sobre el metabolismo del tejido adiposo visceral.

Al respecto, se ha demostrado que si se sustituye la proteína de origen animal por proteína de origen vegetal en la dieta se disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (71). Específicamente, Nagasawa y colaboradores encontraron cambios favorables en la expresión de genes del tejido adiposo epididimal en respuesta a la alimentación con un aislado de proteína de soya (40). En el trabajo anterior se encontró, también, que las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos en suero disminuyeron al consumir proteína de soya. En la gráfica 13 del presente trabajo se muestra que la concentración de triacilglicéridos disminuyó por el consumo de proteína de soya, al igual que se ha descrito en la literatura (72). Sin embargo, la concentración sérica de colesterol no fue significativamente menor para el grupo que consumió soya (Gráfica 14), al contrario de varios estudios, en donde se demuestra que la proteína de soya tiene alto poder hipolipemiante al reducir el colesterol en suero.

Además de determinar las concentraciones de lípidos en sangre, se midió la incorporación de [¹⁴C]-acetato de sodio en ácidos grasos y colesterol en adipocitos en cultivo de animales alimentados con proteína de soya o caseína. El propósito de conocer la capacidad lipogénica fue la de evaluar la actividad metabólica en el tejido adiposo y si ésta se modificaba con el consumo de proteína de soya (Gráficas 4-12).

Los resultados muestran que la alta concentración de lípidos en la dieta, y no el tipo de proteína, disminuye la capacidad metabólica del tejido adiposo epididimal. El tejido adiposo abdominal parece responder al consumo de soya, pues la formación de ácidos grasos es mayor y alcanza diferencias significativas a las 6 h de cultivo (Gráficas 6, 7 y 12). Horton y colaboradores, al medir lipogénesis en tejido adiposo epididimal, encuentran mayor formación de lípidos en animales que sobreexpresan a SREBP-1 (34). En el tejido adiposo epididimal, la expresión de este gen, se encontró reprimida cuando los animales se alimentaron con proteína de soya, por lo que la regulación de la síntesis de ácidos grasos en este tejido posiblemente no depende de este factor de transcripción. Por otra parte, en el tejido adiposo abdominal, la regulación de la síntesis de ácidos grasos, esta mediada por SREBP-1, pues existe una relación directa entre la síntesis de ácidos grasos y la expresión de este gen en animales que consumieron proteína de soya.

Al igual que SREBP-1, el PPAR γ es un factor de transcripción que induce la expresión de enzimas lipogénicas y además estimula la adipogénesis y diferenciación de adipocitos (73-75). La expresión de PPAR γ en el tejido adiposo durante la obesidad se ha encontrado reprimida, aunque en algunos estudios también se ha encontrado aumentada. Además, la concentración de RNA mensajero de PPAR γ aumenta en el tejido adiposo omental o abdominal (76, 77). Los resultados del presente estudio indican que en el tejido adiposo abdominal, el consumo de proteína de soya indujo mayor expresión de PPAR γ (Gráfica 29), fenómeno que puede relacionarse con una menor área de adipocitos por diferenciación de preadipocitos que se unen a la población de adipocitos maduros. Así, PPAR γ induce la diferenciación de las células adiposas y promueve mayor síntesis de ácidos grasos en este tejido. Se ha propuesto que el tamaño de los adipocitos es una característica morfológica que se relaciona con su funcionamiento, donde los de mayor tamaño parecen ser disfuncionales. Con el fin de distinguir su tamaño, realizamos análisis histológicos como se describió. En el tejido adiposo epididimal, a pesar de que el área de los adipocitos resultó mucho menor en animales que se alimentaron con proteína de soya, la diferencia en el tamaño de estas células parece no estar asociada a la expresión de PPAR γ , pues éste se expresa en

menor grado cuando los animales consumieron proteína de soya (Gráfica 30). Es posible, que en el proceso de diferenciación, estén implicadas otras proteínas como C/EBP β , la cual responde a la insulina e induce diferenciación de adipocitos. Otra explicación al menor tamaño de adipocitos, sin mayor expresión de PPAR γ , en tejido adiposo abdominal puede ser, sencillamente, el mantenimiento (dependiente de la proteína de soya) del tamaño pequeño de las células evitando su engrosamiento en la edad adulta.

El mantenimiento del tamaño reducido de los adipocitos es importante, pues como se explicaba antes, el tejido adiposo hipertrófico se ha relacionado con pérdida de funcionalidad definida como inactividad metabólica e insensibilidad a las señales del medio. El volumen de las células adiposas inguinales, perigonadales y retroperitoneales se ha visto relacionado directamente con la abundancia del mensajero de leptina (78). Si la leptina convierte a los adipocitos en células capaces de oxidar gran cantidad de lípidos y, por lo tanto, éstas se depletan de grasa, la hiperleptinemia debiera estar relacionada con adipocitos pequeños. Sin embargo, como ya se describió, la hiperleptinemia está asociada a la resistencia a la leptina. Así, los roedores obesos mantienen concentraciones séricas de leptina más altas que los roedores magros (78). Se ha demostrado, que en modelos de obesidad inducida por dieta, la hipertrofia de los adipocitos requiere del bloqueo de la acción de la leptina o de su receptor (45, 79). Nuestros resultados (Gráficas 41 y 42) confirman las afirmaciones anteriores, pues el grupo con mayores concentraciones de leptina en suero, es decir, el grupo de animales alimentados con caseína y grasa, desarrollaron hipertrofia del tejido adiposo. La proteína de soya fue capaz de mantener un menor tamaño de adipocitos y menor concentración de leptina en suero. Esto significa que la proteína de soya en la dieta es protectora contra la hiperleptinemia, contra la hipertrofia del tejido adiposo y, posiblemente, contra el bloqueo de la acción de la leptina.

La leptina es una hormona secretada principalmente por el tejido adiposo, de la misma forma, la adiponectina es una proteína producida exclusivamente por el tejido adiposo y, la cual, es producida en mayor proporción que otras adipocitocinas. La

importancia de la adiponectina radica en ser el vínculo entre la obesidad y enfermedades cardiovasculares o entre la obesidad y resistencia a la insulina (80). De hecho, la expresión de los receptores de adiponectina en músculo y tejido adiposo, disminuye en ratones con mutaciones en el gen de la leptina, los cuales desarrollan hiperglicemia e hiperinsulinemia (37). Cuando se midió la concentración de adiponectina en el suero de los animales de estudio (Gráfica 18), se encontró que los animales que habían consumido caseína tenían concentraciones séricas mayores de adiponectina. Entonces, al conocer que la adiponectina es la adipocina que se secreta en mayor proporción por el tejido adiposo, se decidió normalizar estos valores, dividiéndolos entre la concentración de leptina en suero. La leptina se usa como un indicador de adiposidad, pues existe una correlación directa entre leptina y presencia de masa grasa. Además, se sabe que la adiponectina y leptina tienen una relación inversa, la cual puede ser causa de algunas consecuencias de la obesidad (81). La relación adiponectina/leptina resultó mayor para los animales que consumieron soya. También, existe una tendencia clara, sin ser significativa, que muestra una mayor liberación de adiponectina por parte de los adipocitos abdominales y epididimales de ratas alimentadas con proteína de soya (Gráficas 20-23). Otros autores han encontrado resultados similares a éste, observando valores más altos del mensajero de adiponectina y concentraciones séricas de adiponectina mayores para animales sujetos a dietas con aislado de proteína de soya (39, 40). La proteína de soya, entonces, podría mejorar la sensibilidad a la insulina y prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas por medio de su influencia sobre la mayor secreción de la adiponectina en el tejido adiposo.

La adiponectina es regulada positivamente por PPAR γ , por lo cual se le ha atribuido la función de mantener un volumen pequeño de células adiposas (37). La proteína de soya, a través del aumento en la relación adiponectina/leptina, podría también, evitar el desarrollo de hipertrofia en el tejido adiposo abdominal o epididimal. La adiponectina tiene la capacidad de inhibir la acción de TNF- α . TNF- α es una citocina proinflamatoria que secreta el adipocito, entre muchos otros tipos celulares. Como se explicó anteriormente, esta citocina se secreta más abundantemente durante el desarrollo de obesidad, se ha visto implicada en el desarrollo de la resistencia a la

insulina y promueve la liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo hacia la circulación (69). Se ha medido la expresión del TNF- α en un modelo de obesidad resultando ésta más grande para los animales obesos al compararse con los animales magros (82). En este estudio, las concentraciones de TNF- α en suero no resultaron diferentes para los grupos de estudio, lo cual significa que no hay una respuesta inflamatoria generalizada en respuesta a la dieta. Sin embargo, los adipocitos epididimales liberaron al medio de cultivo menos TNF- α cuando provenían de ratas alimentadas con proteína de soya. Además, el mensajero de la citocina fue menos abundante en tejido adiposo de animales que consumieron proteína de soya. Un trabajo previo muestra que la proteína de soya no induce cambios en el mensajero de TNF- α , contrariamente a los resultados de este proyecto (40). El tejido adiposo epididimal es el que mejor respuesta tuvo a la proteína de soya, por lo tanto, específicamente el tejido adiposo epididimal es el que, por medio de la alimentación con proteína de soya, queda menos expuesto a las consecuencias de la actividad de TNF- α como resistencia a la insulina o lipólisis acelerada. Independientemente, parecería que la secreción de TNF- α tiene un efecto parácrino, con la cual pueda regular a los mismos adipocitos.

La lipólisis o utilización de los triacilglicéridos contenidos en la vacuola lipídica de los adipocitos está regulada negativamente por la presencia de perilipinas que rodean a esta vacuola. Los resultados del presente trabajo dejan ver un distinto patrón de expresión de este gen en el tejido adiposo abdominal y el epididimal. En el primero hay más expresión de perilipinas cuando la alimentación es menos concentrada en grasa, en el segundo existe más expresión de las mismas cuando la dieta está basada en proteína de soya. Esto puede explicarse por el antecedente que afirma que la expresión de perilipinas disminuye por la acción de TNF- α . Si el tejido adiposo epididimal es más sensible a la regulación de TNF- α por el tipo de proteína en la dieta, entonces este mismo tejido puede transcribir más perilipinas en respuesta a la proteína de soya.

La oxidación de ácidos grasos de cadena larga se da, en parte, por la carnitina palmitoil transferasa-1 o CPT-1. La expresión de este gen no fue modificada por la dieta. Otros estudios han mostrado una mayor expresión de CPT-1 de hígado en ratas que consumieron hasta 60% de lípidos. En estos mismos trabajos no se encuentran diferencias en la expresión de esta enzima en páncreas (83). Es posible que en el tejido adiposo se modifiquen otros factores relacionados con la oxidación de lípidos sin la necesidad de cambiar el patrón de expresión de este gen en específico.

Un posible factor que puede estar alterado por la alimentación con soya y que está asociado a la inducción de actividad de enzimas lipolíticas es PPAR α (84). En el tejido adiposo abdominal, PPAR α está regulado positivamente por el consumo de proteína de soya. Lo contrario sucede en el tejido adiposo epididimal. Es probable que en el tejido adiposo epididimal el consumo de proteína de soya intervenga manteniendo la maquinaria de enzimas oxidativas y no haya necesidad de expresar a PPAR α . De forma contraria, en el tejido adiposo abdominal la proteína de soya funciona aumentando a PPAR α . Es deseable que haya un correcto balance en el funcionamiento de PPAR α y PPAR γ en los tejidos adiposos para mantener un equilibrio entre la acumulación y oxidación de lípidos en el organismo (29). Cuando se pierde este equilibrio, el tejido adiposo pierde su funcionalidad. La proteína de soya en la dieta aumenta la expresión de PPAR α y PPAR γ simultáneamente en el tejido adiposo abdominal, pero no en el tejido adiposo epididimal. El equilibrio entre lipogénesis y lipólisis por la expresión de PPARs es notable en el tejido adiposo cuando éste proviene de animales que consumieron proteína de soya.

La proteína de soya, entonces, mantiene la funcionalidad del tejido adiposo por medio de distintos mecanismos en los diferentes tejidos adiposos viscerales. En el tejido adiposo epididimal la proteína de soya es capaz de disminuir la presencia y expresión de TNF- α y aumentar la expresión de perilipinas. De esta forma, la liberación de lípidos, específicamente, ácidos grasos libres del tejido adiposo epididimal a la circulación se disminuye con el consumo de proteína de soya. Las consecuencias de estos cambios podrían incluir menor carga de lípidos en tejidos no adiposos y, con

esto, menos riesgo a lipotoxicidad o falla en dichos órganos. Mientras tanto, en el tejido adiposo abdominal la alimentación con proteína de soya es responsable de inducir mayor síntesis y oxidación de lípidos y adecuada relación entre la expresión de PPAR α y PPAR γ . Esto da evidencia de un equilibrio entre la utilización y producción de lípidos que se traduce en el mantenimiento del tamaño de los adipocitos y, por lo tanto, incremento en la funcionalidad del tejido adiposo abdominal. Además, la proteína de soya en la dieta aumentó la relación adiponectina/leptina y disminuyó la concentración de triacilglicéridos y leptina en suero. Por estas razones, el consumo de proteína de soya tiene influencia sobre el buen funcionamiento del tejido adiposo. La proteína de soya definida con anterioridad como el aislado que contiene proteína de la misma leguminosa e isoflavonas tuvo los beneficios mencionados. Es probable que la interacción entre estos dos componentes o la presencia de ambos sea la responsable de los efectos protectores o benéficos, ya que en estudios previos se ha demostrado que la proteína de soya pura o las isoflavonas aisladas no son capaces de inducir cambios en el metabolismo de lípidos en órganos como hígado o páncreas.

El estudio de la regulación del tejido adiposo ha tomado relevancia al ser un tejido que dirige el equilibrio energético y otros procesos. La pérdida de la funcionalidad de las células adiposas tiene consecuencias como el desarrollo del síndrome metabólico, pues se cuenta con una desregulación de la secreción de las adipocinas, desequilibrio en el metabolismo de lípidos e hipertrofia de las células adiposas. El efecto de la proteína de soya sobre todos estos factores fue positivo, a pesar de las diferencias metabólicas entre el tejido adiposo abdominal y epididimal. El conocimiento de los mecanismos por los cuales la proteína de soya mantiene la funcionalidad de los adipocitos se deja ver en este trabajo. De esta manera, se concluye que una de las herramientas para la prevención o tratamiento de las consecuencias de la obesidad puede ser parte de la dieta, y específicamente, el consumo de la proteína de soya.

Conclusiones

En el tejido adiposo abdominal se mantuvo el equilibrio deseado entre la síntesis y oxidación de ácidos grasos por medio del consumo de la proteína de soya. En el tejido adiposo epididimal, la dieta con proteína de soya redujo el riesgo de lipólisis acelerada e inflamación. Por lo tanto, la proteína de soya en la dieta mantiene la funcionalidad y tamaño de los adipocitos a través de diferentes mecanismos, dependiendo de las regiones adiposas estudiadas.

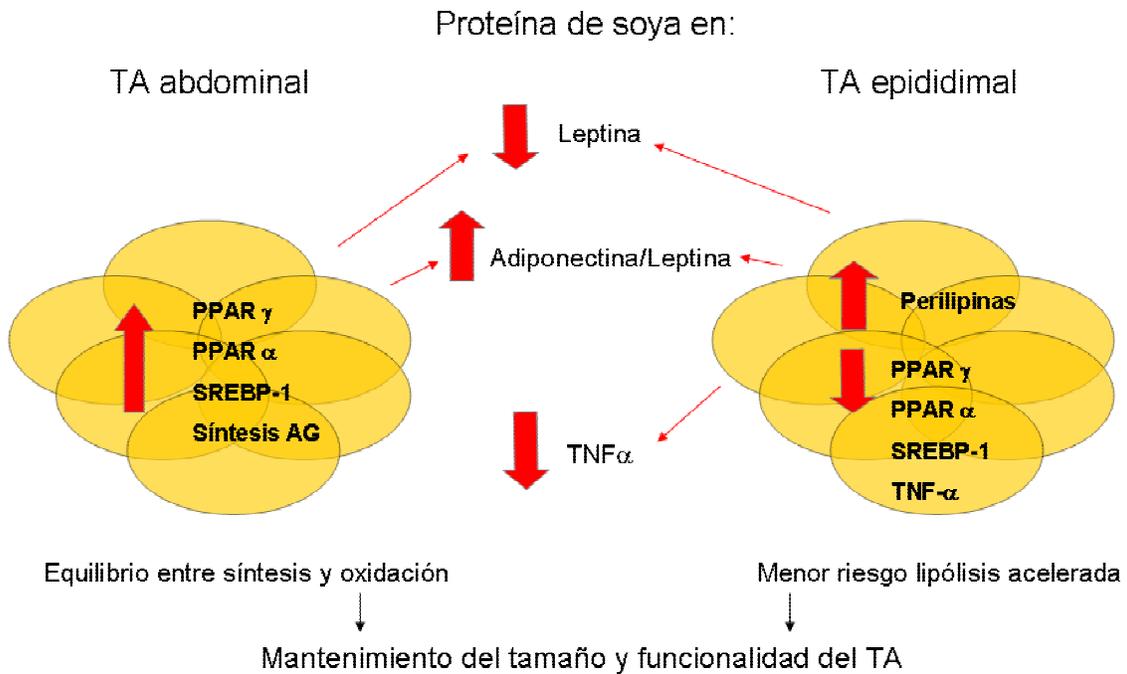


Figura 7. Modelo de integración de los efectos de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo abdominal y epididimal

Perspectivas

- Determinar los efectos de las proteínas de origen vegetal como la proteína de frijol sobre la función del tejido adiposo en modelos de obesidad inducida por dieta a partir del consumo de hidratos de carbono.
- Evaluar el posible equilibrio entre la síntesis, degradación y oxidación de lípidos en el tejido adiposo por medio de la incorporación de acetato en ácidos grasos y su oxidación a acetato en el mismo modelo.
- Medir el estrés oxidativo local del tejido adiposo en el modelo de obesidad mencionado y su relación con fenómenos involucrados en la disfunción del tejido adiposo.
- Explorar la actividad o expresión de adipocinas halladas recientemente como resistina, visfatina o desnutrina en los tejidos adiposos de animales que desarrollen obesidad y el efecto de la proteína del frijol.

Bibliografia

1. Frübeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal F, Burell M. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E827-47.
2. Kershaw E, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
3. Erol A. Adipocyte insensitivity syndromes – novel approach to nutritional metabolic problems including obesity and obesity related disorders. *Medical Hypothesis* 2005; 64: 826-32.
4. Takashi T, Nobuaki Y, Tadamitsu K, Shizou A. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J* 1997; 16: 7432-43.
5. Schling P, Löffler G. Cross Talk Between Adipose Tissue Cells: Impact on Pathophysiology. *News Physiol Sci* 2002; 17: 99-104.
6. Kem P, Marshall S, Eckel R. Regulation of Lipoprotein Lipase in Primary Cultures of Isolated Human Adipocytes. *J Clin Invest* 1985; 75: 199-208.
7. Jinpling L, Xinxin Y, Wentong P, Unger R. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1334-41.
8. Burdi AR, Poissonnet CM, Garn SM, Lavelle M, Sabet MD, Bridges P. Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *Int J Obes* 1985; 9: 247-56.
9. Alihaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 207-33.
10. Sul HS, Smas C, Mei B, Zhou L. Function of Pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes* 2000; 24: S15-S19.
11. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 99-129.
12. Ntambi JM, Y.Ch. K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000; 130: 3122S-6S.
13. Amri E, Ailhaud G, Grimaldi P. Fatty acids as signal transducing molecules:

- involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J Lipid Res* 1994; 35: 930-7.
14. Sorisky A, Magun R, Gagnon AM. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot. *Int J Obes* 2000; 24: S3-7.
 15. Axen KV, Dikeakos A, Sclafani A. High dietary fat promotes syndrome X in nonobese rats. *J Nutr* 2003; 133: 2244-9.
 16. Einstein F y cols. Differential Responses of Visceral and Subcutaneous Fat Depots to Nutrients. *Diabetes* 2005; 54: 672-8.
 17. Giorgino F, Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 2005; 183: 13-30.
 18. Ying K, Halo P, Leible R, Zhang Y. Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 112-19
 19. Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 15-20.
 20. Wajchenberg B. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21: 697-738.
 21. He Q, Engelson S. Preferential loss of omental mesenterio fat during growth hormone therapy of HIV associated lipodistrphy. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2051-7.
 22. Misra A, Vikram N. Clinical and Pathophysiological Consequences of Abdominal Adiposity and Abdominal Adipose Tissue Depots. *Nutrition* 2003; 19: 457-66.
 23. Cousin B, Morroni M, Raimbault S, Castella L. Occurrence of brown adipocytes in rat tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Science* 1992; 103: 931-42.
 24. Lewin B. Genes VIII. 2004. Oxford University Press.
 25. Kubota N y cols. PPAR γ Mediates High Fat Diet Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance. *Mol Cell* 1999; 4: 597-609.
 26. Berger J, Moller D. The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002; 53: 409-35.

27. Chih-Hao L, Olson P, Evans RM. Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinol* 2003; 144: 2201-7.
28. León N, Torres N, Tovar A. Mecanismo de acción de las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBPs) en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos. *Rev Invest Clin* 2002; 54: 145-53.
29. Alemán G, Torres N, Tovar A. Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina. *Rev Invest Clin* 2004; 56: 351-67.
30. Lee Y y cols. Liporegulation in Diet-induced Obesity. *J Biol Chem* 2001; 276: 5629-35.
31. Stoeckman A, Towle H. The Role of SREBP-1 in Nutritional Regulation of Lipogenic Enzyme Gene Expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 27029-35.
32. Rodríguez-Cruz M, Tovar A.R., del Prado M, Torres N. Mecanismos de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin* 2005; 57: 457-72.
33. Felder TK, Klein K, Patsch W, Oberkofler H. A novel SREBP-1 splice variant: Tissue abundance and transactivation potency. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1731: 41-7
34. Horton J, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer R. Overexpression of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1a in Mouse Adipose Tissue Produces Adipocyte Hypertrophy, Increased Fatty Acid Secretion, and Fatty Liver. *J Biol Chem* 2003; 278: 36652-60.
35. Haiyan Xu y cols. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-30.
36. Penforis P, Marette André. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lip Res* 2004; antes de publicación.
37. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr Rev* 2005; 26: 439-51.

38. Yildiz B, Suchard M, Wong M, McCann S, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10434-9.
39. Nagasawa A y cols. Effects of Soy Protein Diet on the Expresión of Adipose Genes and Plasma Adiponectin. *Horm Metab Res* 2002; 34: 635-9.
40. Nagasawa A y cols. Divergent effects of soy protein diet on the expresión of adipocytokines. *Biochem Biophys Res Comun* 2003; 311: 909-14.
41. Nadler S, Attie A. Please Pass the Chips: Genomic Insights into Obesity and Diabetes. *J Nutr* 2001; 131: 2078-81.
42. Wilson-Fritch y cols. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 2004; 114: 1281-9.
43. Ting Zou, Unger R, Ting Zhou Y , Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: Novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2327-32.
44. Unger R. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 398-403.
45. Wang M, Orci L, Ravazzola M, Unger R. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18011-6.
46. Bluer M y cols. Role of Insulin Action and Cell Size in Protein Expression Patterns in Adipocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 31902-9.
47. Fryan K. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 375-80.
48. Schwartz M, Porte D. Diabetes, Obesity and the Brain. *Science* 2005; 307: 375-9.
49. Drake AJ, Livingstone DE, Andrew R, Seckl JR, Morton NM, Walker BR. Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinol* 2005; 146: 913-9.
50. Berthumie M y cols. Actions of PPAR γ agonism on adipose tissue remodeling, insulin sensitivity and lipemia in absence of glucocorticoids. *Am J Physiol* 2004; 287: R1116-23.

51. Young VR. Soy protein in relation to human protein and aminoacid nutrition. *J Am Diet Assoc* 1991; 91: 828-35.
52. Messina M. Modern Applications for an Ancient Bean: Soybeans and the Prevention and Treatment of Chronic Disease. *J Nutr* 1995; 125: 567S-9S.
53. Adams MS, Golden DL, Frankee AA, Potter SM, Smith HS, Anthony MS. Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr* 2004; 134: 511-6.
54. Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M. Soybean beta conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68: 352-9.
55. Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr* 1996; 126: 380-8.
56. Tovar AR y cols. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res* 2005; 46: 1823-32.
57. Anderson J, Johnstone B, Cook-Newell M. Meta Analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 1995; 333: 276-82.
58. Szkudelska K, Nogowski L, Szudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 75: 265-71.
59. Balasubramanian S, Goldstein JL, Faust JR, Brunschede GI, Brown MS. Lipoprotein-mediated Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity and Cholesteryl Ester Metabolism in the Adrenal Gland of the Rat. *J Biol Chem* 1977; 252: 1771-9.
60. Goldstein JL, Dana SE, Brown MS. Esterification of Low Density Lipoprotein Cholesterol in Human Fibroblasts and its Absence in Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 4288-92.
61. Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Induction of 3-Hydroxy-3- methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Human Fibroblasts Incubated with Compactin

- (ML-236B), A Competitive Inhibitor of the Reductase. *J Biol Chem* 1978; 253: 1121-8.
62. Johnson RM, Albert S. The Incorporation of C14-acetate into the Lipids of Tissues Undergoing Cell Division. *Arch Biochem Biophys* 1959; 234: 22-26.
63. Harlan WR, Wakil SJ. Síntesis of Fatty Acids in Animal Tisúes. *J Biol Chem* 1963; 238: 3216-23.
64. Pai J, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL. Differential Stimulation of Cholesterol and Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Cells Expressing Individual Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Proteins. *J Biol Chem* 1998; 273: 26138-48.
65. Sewter CP, Digby JE, Blows F, Prins J, O'Rahilly. Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol* 1999; 163: 33-8.
66. Ruan H, Zarnowski MJ, Cushman SW, Lodish HF. Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. *J Biol Chem* 2003; 278: 47585-93.
67. Zheng P, Niu FL, Liu WZ, Shi Y, Lu LG. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4912-5.
68. Phillips SA y cols. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* 2003; 52: 667-74.
69. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: Integrated response to TNF- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E731-40.
70. Liu KH, Chan YL, Chan WB, Chan JC, Chu CW. Mesenteric fat thickness is an independent determinant of metabolic syndrome and identifies subjects with increased carotid intima-media thicknes. *Diabetes Care* 2006; 29: 379-84.
71. Hermansen K, Sondergaard M, Hoile L, Carstensen M, Brock B. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes care* 2001; 24: 228-33.
72. Zhan S, HoSC. Meta-analysis of the effect of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:397-408.

73. Vidal-Puig A y cols. Regulation of PPAR γ Gene Expression by Nutrition and Obesity in Rodents. *J Clin Invest* 1996; 97: 2553-61.
74. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. *Endocrinol* 2001; 142: 4195-202.
75. Songtao Yu y cols. Adipocyte-specific Gene Expression and Adipogenic Steatosis in the Mouse Liver due to PPAR γ 1 Overexpression. *J Biol Chem* 2003;278: 498-505.
76. Kersten, S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol* 2001; 440: 223-34.
77. Kersten S, Seydoax J, Peters JM, González FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999; 103: 1489-98.
78. Guo KY, Halo P, Leibel R, Zhang Y. Effects of obesity on the relationship of leptin mRNA expression and adipocyte size in anatomically distinct fat depots in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R112-19.
79. Sima AF, Shafir E. Animal Models of Obesity A Primer. 2001. Harwood Academic Press.
80. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 329-39.
81. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 173-80.
82. Furukawa S y cols. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1725-61.
83. Lee Y y cols. Liporegulation in Diet-induced Obesity. *J Biol Chem* 2001; 276: 5629-35.
84. Guerre-Millo y cols. PPAR- α -Null Mice Are Protected From High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* 2001; 50: 2809-14.

Anexos

Anexo 1.

1.1 Composición del aislado de proteína de soya y aislado de caseína (aminoácidos, g/100 g de producto)

Aminoácido	Aislado de caseína	Aislado de proteína de soya
Alanina	2.8	3.6
Arginina	3.4	6.5
Ácido aspártico	6.3	10.3
Cisteína	0.3	1.1
Ácido glutámico	20.5	18.7
Glicina	1.6	3.6
Histidina	2.5	2.3
Isoleucina	4.7	4.3
Leucina	8.2	7
Lisina	7.2	5.5
Metionina	1.9	1.13
Fenilalanina	4.4	4.7
Prolina	9.5	4.8
Serina	5	4.5
Treonina	3.8	3.2
Triptofano	1.6	1.3
Tirosina	4.7	3.5
Valina	6	3.9
<i>% de proteína</i>	<i>90.6</i>	<i>85.9</i>

1.2 Composición del aislado de proteína de soya (isoflavonas, mg/g de producto)

Genisteína	1.38
Daidzeína	0.71
Gliciteína	0.19
Total	2.28

Anexo 2. Alimentación de las ratas (%)

Ingredientes	Caseína	Soya	Caseína grasa	Soya grasa
Caseína ó proteína de soya	33.11	34.09	33.11	34.09
Dextrosa	27.86	27.37	17.86	17.37
Almidón	27.86	27.37	17.86	17.37
Aceite de maíz	5	5	5	5
Manteca	0	0	20	20
Mezcla de nut inorgánicos	5	5	5	5
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1
Citrato de Colina	0.165	0.165	0.165	0.165

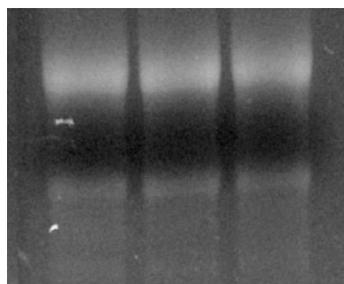
Mezcla de nutrimentos inorgánicos (g/kg)

Calcio	5.914
Fósforo	3.943
Potasio	4.929
Sodio	4.929
Cloro	7.607
Azufre	0.676
Magnesio	0.492
Yodo	.0002
Hierro	.052
Cobre	.0311
Molibdeno	.0197
Zinc	.0006
Flúor	-----

Mezcla de vitaminas (g/kg)

Ácido nicotínico	3
Pantotenato de Calcio	1.6
Piridoxina	0.7
Tiamina	0.6
Riboflavina	0.6
Ácido fólico	0.2
Biotina	0.02
Cianocobalamina	2.5
Acetato de DL-alfa tocoferilo	15
Palmitato de vitamina A	0.8
Colecalciferol	0.2
Filoquinona (vitamina K)	0.075
Sacarosa	974.705

Anexo 3. Gel de agarosa al 1.5% para comprobar integridad de RNA.



tejido adiposo abdominal / epididimal

Anexo 4. 4.1 Rango dinámico de un gen ejemplo. 4.2 Curva de amplificación de actina como gen control.

a)

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

b)

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.