



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTO DE LA DIETA SOBRE LA
REGULACIÓN DE AMPK EN MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE ROEDORES EN DOS
MODELOS DE OBESIDAD

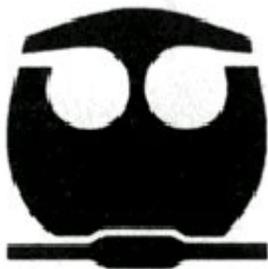
T E S I S

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

P R E S E N T A:

**BERENICE PALACIOS
GONZÁLEZ**

Tutor: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO



MÉXICO, D. F.

Febrero 2008



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.

EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA REGULACIÓN DE AMPK EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE ROEDORES EN DOS MODELOS DE OBESIDAD

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultada de Química, UNAM.
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultada de Química, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultada de Química, UNAM.
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Departamento de Bioquímica, INCMNSZ.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	3
MODELOS DE OBESIDAD	4
PROTEÍNA CINASA ACTIVADA POR ADENOSIN MONOFOSFATO (AMPK)	5
GENES REGULADOS POR AMPK	6
• PROTEÍNAS DE UNIÓN A ELEMENTOS REGULADORES DE ESTEROLES 1C (SREBP1C)	6
• ESTEARIL COA DESATURSA 1 (SCD1)	7
• RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS δ (PPAR δ)	8
• PROTEÍNA DESACOPLANTE 3 (UCP-3)	9
• TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT4)	10
PROTEINA DE SOYA	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
METODOLOGÍA	
DIAGRAMA DE FLUJO	15
MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
Modelos animales	16
Dietas	17
Obtención de muestras y tejido	18
Determinación de parámetros bioquímicos en suero	18
Análisis histológico	18
Determinación de la fosforilación de AMPK por medio de la técnica western blot	19
Determinación de expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real)	19

Análisis de ácidos grasos por medio de cromatografía de gases	20
Determinación del contenido de triglicéridos en el interior del músculo esquelético	21
ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE DATOS	22
RESULTADOS	
MODELO OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA	
Ganancia de peso	23
Consumo de alimento	24
Consumo energético	25
Parámetros bioquímicos	25
Análisis histológico	30
Fosforilación de AMPK	30
Expresión génica	31
Ácidos grasos en el interior del músculo esquelético.	33
Contenido de triglicéridos en el músculo esquelético	34
MODELO OBESIDAD GENÉTICA	
Ganancia de peso	35
Consumo de alimento	36
Parámetros bioquímicos	37
Análisis histológico	40
Fosforilación de AMPK	40
Expresión génica	41
Ácidos grasos en el interior del músculo esquelético.	43
DISCUSIÓN	44
RESUMEN DE RESULTADOS	52
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	54
ANEXO	59

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Titulo	Página
Gráfica 1. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la ganancia de peso en el modelo DIO.	23
Gráfica 2. Efecto la de proteína de soya en el consumo de alimento en el modelo DIO	24
Gráfica 3. Efecto la de proteína de soya en el consumo energético en el modelo DIO.	25
Gráfica 4. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de glucosa en el modelo DIO.	26
Gráfica 5. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de colesterol en el modelo DIO.	27
Gráfica 6. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de triglicéridos en el modelo DIO.	28
Gráfica 7. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de insulina en el modelo DIO.	29
Gráfica 8. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de leptina en el modelo DIO.	29
Gráfica 9. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético modelo DIO.	31
Gráfica 10. Efecto del consumo de proteína de soya en el contenido de ácidos grasos en músculo de ratas del modelo DIO	33
Gráfica 11. Efecto del consumo de proteína de soya sobre el contenido de triglicéridos en músculo de ratas del modelo DIO	34
Gráfica 12. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la ganancia de peso en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	35
Gráfica 13. Efecto la de proteína de soya en el consumo de alimento en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	36
Gráfica 14. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de glucosa en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	37
Gráfica 15. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de colesterol en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	38
Gráfica 16. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de triglicéridos en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	38
Gráfica 17. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de insulina en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	39
Gráfica 18. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de leptina en ratas Zucker fa/fa modelo GO.	39
Gráfica 19. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker fa/fa modelo GO.	41
Gráfica 20. Efecto del consumo de proteína de soya en el contenido de ácidos grasos en músculo de ratas ratas Zucker fa/fa modelo GO.	43

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Composición porcentual de las dietas del modelo de obesidad inducida por dieta.	17
Tabla 2. Composición porcentual de las dietas del modelo de obesidad inducida por dieta.	17
Tabla 3. Efecto del consumo de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP-3, CPT1, MCD, GLUT4, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético del modelo DIO	32
Tabla 4. Efecto del consumo de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP-3, CPT1, MCD, GLUT4, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético de ratas Zucker fa/fa modelo GO	42
Tabla 5. Ejemplo de cálculo de la expresión relativa en el modelo DIO, usando el equipo de PCR de tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems).	59
Tabla 6. Determinación de la abundancia relativa de mRNA de los diferentes genes, donde la expresión de los grupos de soya, soya grasa y caseína grasa se hizo relativa a la expresión del grupo de caseína.	61
Figura 1. Estructura y activación de la AMPK.	5
Figura 2. Secuencia de liberación del amino terminal de SREBP	7
Figura 3. Mecanismo de traslocación de GLUT4.	11
Figura 4. Efecto del consumo de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (<i>Vastus lateralis</i>) del modelo DIO.	30
Figura 5. Efecto del consumo de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (<i>Vastus lateralis</i>)	40
Figura 6. Curva de amplificación de UCP3 en el modelo DIO	60
Figura 7. Curva de amplificación de actina como gen constitutivo	60

ABREVIATURAS

ABCG5	Cassets de unión de ATP, Miembros de la familia G 5.
ABCG8	Cassets de unión de ATP, Miembros de la familia G 8.
ACC	Acetil CoA carboxilasa.
AdipoR	Receptor de leptina.
Akt/PKB	Proteína cinasa B.
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato.
AS160	Sustrato de Akt de 160 kDa.
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares.
CPT1	Carnitina palmitoil transferasa 1.
CYP7A	7 α Hidroxilasa de colesterol.
FGF15	Factor 15 de crecimiento de fibroblastos.
GAP	Proteína con actividad GTPasa.
GLUT4	Transportador de glucosa 4.
IBAP	Proteína de unión de ácidos biliares iliacos.
IBAT	Transportadora de ácidos biliares iliacos.
IRS	Sustratos del receptor de insulina.
LKB1	Enzima cinasa serina/treonina LKB1.
MCD	Malonil CoA descarboxilasa.
NCP1	Niemann pick C1.
Ob-R	Receptor de leptina.
PDK1	Cinasa 1 dependiente de 3 fosfoinositidos.
PI3K	Fosfoinositidil 3 cinasa.
PPAR δ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas δ .
PPRE	Elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas.
pT172AMPK	Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato fosfarilado en el residuo treonina 172.
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados.
ROX	Especies reactivas de oxígeno.
RXR	Receptor X de retinoide.
SCD1	Esteoril CoA desaturasa 1.
SREBP	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides.
UCP3	Proteína desacoplante 3.
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN

Durante la obesidad el tejido muscular incrementa su almacén de lípidos, lo que se ha relacionado con la presencia de resistencia a la insulina. Este almacén de lípidos en tejidos no adiposos llamado lipotoxicidad, puede deberse a que la leptina pierde sus efectos antiestatóticos. Lo anterior se ha relacionado a 1) mutaciones en el receptor de leptina que impidan la unión de esta hormona o la señalización posterior como sucede en la obesidad genética ó 2) por la presencia de resistencia a la leptina como sucede en la obesidad inducida por dieta. La pérdida del efecto antiestatótico de la leptina puede deberse a alteraciones en la regulación de la enzima proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK) involucrada en el balance metabólico de lípidos (oxidación/síntesis de lípidos) en el músculo esquelético. Por otro lado, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de proteína de soya reduce la lipotoxicidad en hígado de ratas en diversos modelos de obesidad. Sin embargo se desconoce si la proteína de soya puede reducir la lipotoxicidad en músculo esquelético, a través de la regulación de AMPK en dos modelos de obesidad como: 1) la obesidad genética (que existe en las ratas Zucker (fa/fa)) y 2) la obesidad inducida por dieta (en ratas donde no existe una alteración genética). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la proteína de soya sobre la regulación de AMPK y el acúmulo de lípidos en músculo esquelético en dos modelos de obesidad en animales: 1) la obesidad genética y 2) la obesidad inducida por dieta.

Los animales alimentados con proteína de soya, independientemente del modelo de obesidad, desarrollaron un menor grado de obesidad y presentaron una disminución significativa en las concentraciones de triglicéridos y colesterol en suero, en comparación con los animales alimentados con caseína. La alimentación con proteína de soya en el modelo de obesidad inducida por dieta no modificó las concentraciones de glucosa e insulina. Sin embargo en el modelo de obesidad genética el consumo de proteína de soya tuvo efecto hipoglucémico sin modificar las concentraciones de insulina. Con respecto a las concentraciones de leptina en suero, la proteína de soya tuvo efecto hipoleptinémico en el modelo de obesidad inducida por dieta. Por el contrario, no se observaron modificaciones en las concentraciones de leptina en el modelo de obesidad genética. El consumo de proteína de soya disminuyó el acúmulo de lípidos en el interior del miocito en ambos

modelos de obesidad e interesadamente no se observaron diferencias significativas en el patrón de ácidos grasos en el modelo de obesidad inducida por dieta. Por el contrario, en el modelo de obesidad genética donde el consumo de proteína de soya disminuyó en forma significativa la concentración de ácido palmítico en el músculo esquelético. En cuanto a la funcionalidad de AMPK, independientemente del modelo de obesidad los animales alimentados con proteína de soya presentaron una mayor relación pT172AMPK/AMPK total y de igual manera existió un incremento significativo en las expresiones génicas de malonil CoA descarboxilasa (MCD), carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), receptor activado por proliferadores de peroxisomas δ (PPAR δ), proteína desacoplante 3 (UCP3) y transportador de glucosa 4 (GLUT4), así como una disminución significativa en la expresión de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP1c) y la esteroil CoA desaturasa 1 (SCD1). Se concluyó que el consumo de proteína de soya en el modelo de obesidad inducida por dieta, no permite el desarrollo de resistencia a la leptina, ocasionando que la leptina pueda activar a AMPK, y de esta forma llevar a cabo su efecto antiestatótico. En el caso del modelo de obesidad genética los cambios observados por el consumo de proteína de soya no se pueden atribuir a los efectos antiestatóticos de la leptina, pero sí a la funcionalidad de AMPK por medio de otras adipocitocinas con efecto antiestatótico como por ejemplo la adiponectina.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La obesidad puede ocurrir como una enfermedad aislada sin complicaciones o constituir un riesgo para enfermedades crónico degenerativas asociadas a un conjunto de anormalidades metabólicas, a las cuales se le ha dado el nombre de Síndrome Metabólico.^{1,2,3,4}

Las causas de la obesidad pueden ser muy variadas; el consumo crónico y excesivo de energía, el sedentarismo, la predisposición genética y/o factores psicológicos que en conjunto o por separado conllevan a la obesidad, que se ha definido como un incremento excesivo en el tejido adiposo, lo cual se ha relacionado con resistencia a la insulina, que se caracteriza por la incapacidad de los tejidos para utilizar la glucosa en respuesta a esta hormona.

Se ha identificado al músculo esquelético como el mayor sitio de utilización de glucosa y de la acción periférica de la insulina.⁵ Estudios recientes indican que el exceso de lípidos en el tejido muscular está relacionado con la resistencia a la insulina.^{6,7,8,9,10} El mecanismo por el cual se produce esta asociación incluye el defecto en el metabolismo de los ácidos grasos, especialmente en las rutas de oxidación, que permite una disminución del uso y el incremento de la esterificación y almacenamiento de lípidos dentro del músculo esquelético¹¹, este almacenamiento de lípidos en tejidos no adiposos se denomina lipotoxicidad.¹²

La lipotoxicidad se asocia a una inadecuada síntesis de adipocitocinas y hormonas secretadas por los adipocitos. Una de estas hormonas es la leptina que estimula la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa, y previene la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos a través de su receptor llamado “Ob-R”. Las mutaciones en el receptor de leptina que impidan la unión de la leptina o la señalización posterior se han relacionado como posibles causas de la obesidad genética.¹³ Como se mencionó anteriormente las causas de la obesidad pueden ser muy diversas, el presente estudio se enfocó a dos modelos de obesidad: 1) la obesidad genética y 2) la obesidad inducida por dieta.

Modelo de obesidad genética

La rata Zucker (fa/fa) tiene una mutación llamada *fa* en el receptor de leptina donde existe una sustitución de la glutamina-269 por prolina.¹⁴ El fenotipo de estos animales se caracteriza por una marcada obesidad, hiperfagia, hiperglicemia y elevadas concentraciones de insulina asociada a un incremento en el número de células beta.¹⁵ Los animales fa/fa desarrollan obesidad entre la 3-4 semana de nacidos. Entre los días 10-14 posteriores al nacimiento se observa una elevación de la insulina plasmática, y a las 4 semanas, se hace evidente la hiperglicemia.

Modelo de obesidad inducida por dieta

Después de un consumo crónico y excesivo de energía, se produce un incremento en el tejido adiposo, el cual aumenta la liberación de ácidos grasos (AG) a la circulación, los cuales pueden ser captados por tejidos como el músculo esquelético para ser almacenados en forma de triglicéridos (TG). El tejido adiposo a su vez aumenta la secreción de leptina para limitar la acumulación de TG en los tejidos no adiposos. Con el tiempo, la concentración circulante de leptina sobrepasa un límite fisiológico generando una disminución en la sensibilidad de los tejidos a su acción (resistencia a la leptina).¹⁶

La resistencia a la leptina produce un desequilibrio entre la síntesis y oxidación de lípidos, provocando que los tejidos pierdan la capacidad de mantener la concentración de lípidos en un rango estrecho. Las consecuencias de la obesidad inducida por dieta se observan a largo plazo que comparadas con la obesidad genética son de menor magnitud.

Los efectos antiestatóticos de la leptina en músculo esquelético se han relacionado con la activación de la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK *por sus siglas en inglés (Adenin Monophosphate activated Protein-Kinase)*).¹⁷

Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK por sus siglas en inglés (Adenin Monophosphate activated Protein-Kinase)

La enzima AMPK es una proteína heterotrimérica constituida de una subunidad catalítica α , y dos subunidades regulatorias β y γ . La subunidad β constituye el sitio de “anclaje” para el dominio cistación β -sintasa (CBS) y cada par de dominios CBS se conoce como un dominio Bateman, los cuales son fundamentales para que se lleve a cabo el proceso de fosforilación de la subunidad catalítica por la enzima cinasa serina/treonina LKB1 (supresor tumoral codificado por el gen *lkb1*, que codifica para LKB1 también llamado STK11). *Figura 1*

Dependiendo de la relación AMP/ATP, se unirá AMP o ATP a los dominios Bateman de la subunidad γ .¹⁸ Si la concentración de AMP es elevada y este se encuentra unido a la subunidad γ , se ocasionará un cambio conformacional en la subunidad α , lo cual permitirá que el sitio T-172 de la enzima quede expuesto y pueda ser fosforilada y como consecuencia activada por la enzima LKB1.¹⁹ En caso de que se una un ATP en los dominios Bateman, entonces no se llevará a cabo el cambio conformacional y la enzima permanecerá en su forma inactiva. Las concentraciones de ATP y AMP en la célula indican el estado energético de esta, de tal forma que el sistema responde a cambios en la relación AMP:ATP, es por eso que la AMPK se ha llamado el “sensor energético de la célula”.

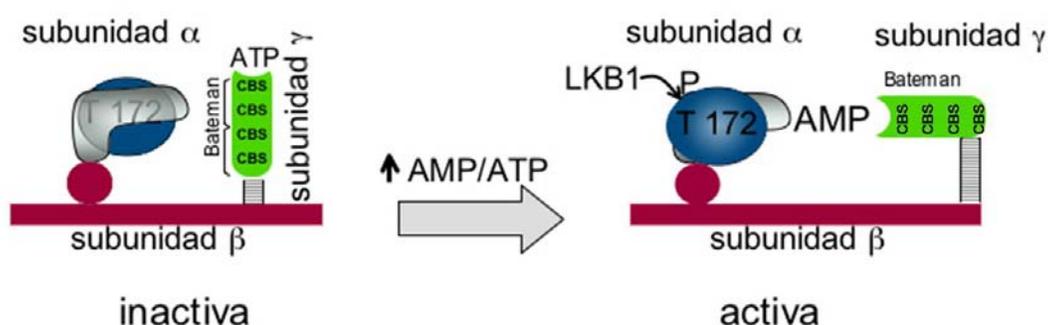


Fig. 1. Estructura y activación de la AMPK.

La leptina puede activar a AMPK por dos medios: (1) puede generar cambios en la relación AMP/ATP o bien (2) puede activar a la cinasa LKB1,²⁰ sin embargo el mecanismo preciso de como se da dicha activación actualmente no está descrito. Una vez que la AMPK se encuentra fosforilada, esta por su actividad cinasa fosforila la Ser221 de la acetil CoA

carboxilasa (ACC) inactivándola, y fosforila en un residuo aún desconocido a la malonil CoA descarboxilasa (MCD)²¹ para activarla. El efecto neto de la AMPK será disminuir la concentración de la malonil CoA, que inicia la síntesis de ácidos grasos y que es un inhibidor de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), proteína encargada de catalizar los ácidos grasos activados a la matriz mitocondrial para poder ser oxidados. La combinación de un incremento en la oxidación de los ácidos grasos y una disminución en su síntesis conlleva a una reducción del contenido de lípidos en la célula.²²

La AMPK además de su actividad cinasa puede actuar a nivel transcripcional,²³ activando o reprimiendo la expresión de genes involucrados en la oxidación y la síntesis de lípidos.

GENES REGULADOS POR AMPK

Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP1c por sus siglas en inglés Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c)

La activación de AMPK suprime la expresión de SREBP1c²⁴, el cual pertenece a una familia de factores de transcripción unidos a membrana designados SREBPs. (*Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides*). Los SREBPs activan directamente la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos como la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la esteroil coenzima A desaturasa 1 (SCD1).²⁵

Las isoformas de los SREBPs incluyen al SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2.

El SREBP-1c es mucho más abundante en tejidos animales, incluyendo al hígado y al tejido adiposo, sin embargo, el SREBP-1a se encuentra en mayor proporción en cultivos celulares que incluyen las líneas celulares HepG2 y 3T3-L1²⁶. 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 triglicéridos como por ejemplo la acetil CoA sintetasa y la acetil CoA carboxilasa. Para funcionar como factor de transcripción el amino terminal del SREBP deberá ser liberado de la membrana a través de una proteólisis.²⁷ *Figura 2.*

Algunos de los factores que regulan la transcripción de SREBP1c son: ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)²⁸, insulina²⁹ y AMPK. El mecanismo por el cual AMPK reprime la transcripción de SREBP no se ha descrito aún.

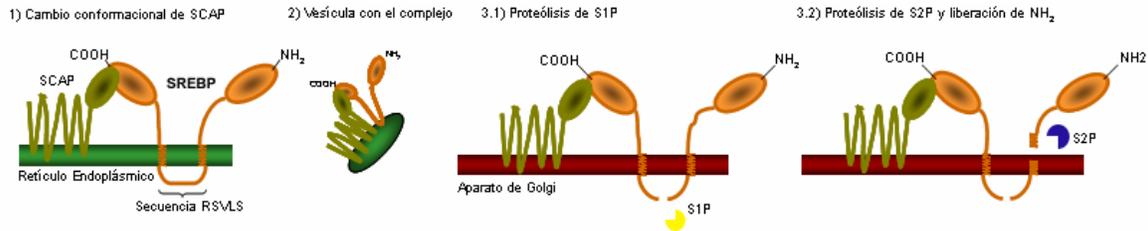


Fig. 2. Secuencia de liberación del amino terminal de SREBP.

1) En ausencia de esteroides SCAP (SREBP cleavage activating protein) sufre un cambio conformacional ocasionando un incremento en la afinidad de SCAP con SREBP.

2) Una vez dada la interacción de SCAP/SREBP este complejo es incorporado a las vesículas COPII a través de la interacción de Sec23/24 y son transportadas al aparato de Golgi-

3) En el aparato de Golgi se realizan dos proteólisis por parte de SP1 y SP2.

3.1) S1P (site 1 protease "Serina Proteasa") corta entre la leucina y serina en la secuencia RSVLS S. Este corte lo que ocasiona es el rompimiento del enlace covalente entre los dos dominios transmembranales de SREBP, pero las dos mitades de la proteína permanecen ancladas a la membrana. Este corte es finamente regulado por esteroides.

3.2) S2P (site 2 protease "Metaloproteína") es una metaloproteasa, que no es directamente regulado por esteroides, pero se requiere el corte previo de S1P. Una vez realizado el segundo corte, el NH₂ del SREBP viaja al núcleo para activar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos.

Esteroil CoA Desaturasa (SCD1 por sus siglas en inglés Stereoil CoA Desaturase)

La disminución en la expresión génica de SREBP1c mediada por AMPK podría estar relacionada con la disminución en la expresión de uno de los genes blanco de SREBP1c, la enzima esteroil CoA desaturasa (SCD1) que se localiza en el retículo endoplásmico, y esta involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados.³⁰ Los sustratos principales de esta enzima son: palmitoil-CoA y esteroil-CoA los cuales son convertidos a palmitoleil-CoA y oleil-CoA, respectivamente. Se ha observado que los ácidos grasos poliinsaturados, la hormona tiroidea, el glucagon, y la leptina reprimen la expresión de SCD1. Un incremento en su actividad genera un desequilibrio entre los ácidos grasos saturados y los monoinsaturados lo cual se ha relacionado con el desarrollo de obesidad. Aún no está claro el mecanismo por el cual la SCD1 disminuye la expresión de AMPK pero se ha observado que en ratones SCD1^{-/-} hay un incremento en la expresión y actividad de AMPK, lo que ocasiona que se fosforile la ACC disminuyendo la concentración de malonil-CoA.³¹

Receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR por sus siglas en inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son receptores nucleares que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroidales nucleares. Existen tres isoformas PPAR α , PPAR δ o β (también llamada NUC-1 o FAAR) y PPAR γ con distinta acción biológica y patrón de expresión específico por tejido.³²

1) PPAR γ . Se expresa predominantemente en el tejido adiposo, y juega un papel importante en la adipogénesis. Además PPAR γ activa a la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1 (SREBP-1) el cual a su vez estimula la expresión de numerosos genes de la lipogénesis, como la acetil-CoA carboxilasa, la sintasa de ácidos grasos, y la ATP-citrato liasa, entre otros.

2) PPAR δ . Se encuentra en diversos tejidos, pero es más abundante en el músculo esquelético. La función de PPAR δ se estudió³³ en miocitos y se observó que incrementaba la beta oxidación, a través de la expresión de las enzimas de esta vía, así como también de proteínas desacoplantes (UCPs).

3) PPAR α . Se expresa predominantemente en el hígado, riñón y músculo esquelético, donde controla el catabolismo de ácidos grasos. La forma en que la oxidación de los lípidos aumenta es a través de la activación de AMPK, la cual se trasloca al núcleo induciendo la transcripción de PPAR α , el cual pertenece a una familia de receptores nucleares, activados por lípidos y glucosa. El PPAR α regula la expresión génica por medio de la formación de un heterodímero con el receptor X de retinoide (RXR). El heterodímero se une a una región consenso en los promotores de sus genes blanco, llamada elemento de respuesta a proliferador de peroxisoma (PPRE).³⁴ La mayoría de los PPREs han sido identificados en los promotores de los genes que codifican para proteínas de oxidación, transporte y síntesis de ácidos grasos, y de las proteínas desacoplantes (UCPs).

Proteína desacoplante 3 (UCP-3 por sus siglas en ingles Uncoupling Carrier Protein -3)

Las UCPs son miembros de la superfamilia de proteínas transportadoras de la mitocondria. Las proteínas desacoplantes permiten el paso de H^+ desde el espacio mitocondrial, hacia la matriz con generación de calor. Esto lleva a una disminución en el gradiente de H^+ , disminuyendo así el potencial electroquímico (negativo y alcalino en el interior), con lo que la fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de H^+ desde el espacio intermembranal hacia la matriz a través de la ATP sintasa es menor, de modo que la síntesis de ATP disminuye.

Existen 5 isoformas de UCPs³⁵: UCP-1 a UCP-5. UCP1 esta presente en tejido adiposo pardo (BAT). Su función esta relacionada con la termogénesis adaptativa. Es activada en respuesta al frío y la sobrealimentación. Y disminuye su activación en respuesta al ayuno.³⁶

UCP2 es ubicua, se encuentra en múltiples tejidos como músculo esquelético, corazón, hígado, bazo, hígado, riñones, páncreas, BAT, y tejido adiposo blanco (WAT). Se le han atribuido diversas funciones entre ellas la regulación de la secreción de insulina. Se activa ante el ayuno, la alimentación con dietas altas en grasa, por leptina y hormonas tiroideas.³⁷

La UCP3, predomina en músculo esquelético; su función se relaciona con la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROX), regulación de síntesis de ATP y regulación de la oxidación de ácidos grasos. Se activa por el ayuno, la alimentación alta en grasa, la leptina y hormonas tiroideas. El hecho de que la expresión de UCP-3 se module a través de la ingestión de alimento, permite entender a esta isoforma como uno de los factores que están involucrados en la fisiopatología de la obesidad.³⁸

La activación de AMPK incrementa la expresión de UCP3 y de la biogénesis mitocondrial. El mecanismo por el cual UCP3 es regulado por AMPK aún se desconoce.

UCP4 se encuentra exclusivamente en cerebro y esta involucrada en la producción de calor, termorregulación en el cerebro. UCP5 también llamada BMCP1 (brain mitochondrial carrier protein 1). Se encuentra principalmente en cerebro y testículos. Se ha relacionado con la termorregulación y el metabolismo energético en estos órganos.³⁹

Transportador de glucosa 4 (GLUT4 por sus siglas en inglés Glucose Transporter 4)

El músculo es el órgano que más contribuye en el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina durante la diabetes mellitus tipo 2. En pacientes diabéticos, la glucosa captada en respuesta a insulina es un 30-40% menor que en individuos no diabéticos, y un 90% de esta disminución se debe a una menor captación por tejidos periféricos, principalmente por el músculo esquelético. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético se define como un defecto en la acción de la insulina sobre la entrada de glucosa que depende del transportador de glucosa 4 (GLUT4).

El GLUT4 se encuentra en vesículas intracelulares y mediante la estimulación con insulina estas son translocadas a la membrana, para permitir el transporte de glucosa al interior de la célula. En el músculo esquelético la translocación de GLUT4 puede darse por la insulina o por la contracción de las fibras musculares.⁴⁰ El mecanismo por el cual la insulina favorece la translocación de GLUT4 es como se describe a continuación: Una vez que la insulina se une a su receptor, se activa la función de tirosina cinasa de éste, el cual fosforila los sustratos del receptor de insulina (IRS) en múltiples residuos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilados funcionan como sitio de unión para la subunidad regulatoria p85 de la fosfoinositidil 3 cinasa (PI3K). La activación de PI3K resulta en un incremento en la producción de fosfoinositol 3 fosfato y fosfoinositol 2 fosfato. Estos fosfoinosítidos participan en el reclutamiento de la proteína Akt a la membrana. Esta proteína contiene un dominio de homología con plequestrina (PH) que es muy importante debido a que permite la interacción con los fosfoinosítidos. La unión de los fosfoinosítidos al dominio PH de Akt permite un cambio conformacional que expone dos sitios de regulación que contienen Thr 308 y Ser 473, permitiendo que estos sean fosforilados por la cinasa PDK1 (cinasa 1 dependiente de 3 fosfoinosítidos). Una vez fosforilado y movilizado el Akt hacia la membrana entonces el Akt fosforila a AS160 (sustrato de Akt de 160 kDa).⁴¹ Esta proteína posee un dominio GAP (*GTPase-activating protein*) que pertenece a la familia de proteínas Rab. Las proteínas Rab son proteína G que cuando se encuentran unidas a GTP participan en el movimiento de vesículas. El dominio GAP para las proteínas Rab estimula la actividad GTPasa del Rab para generar entonces una forma inactiva que tiene unido a GDP. La fosforilación de AS160 inhibe la actividad denominada GAP,

ocasionando que exista mayor cantidad de Rab unido a GTP y de esta forma se favorece la translocación de GLUT4 a la membrana.⁴² Una vez que GLUT4 es traslocado a la membrana se estimula el transporte de glucosa al interior de la célula (Figura 3).

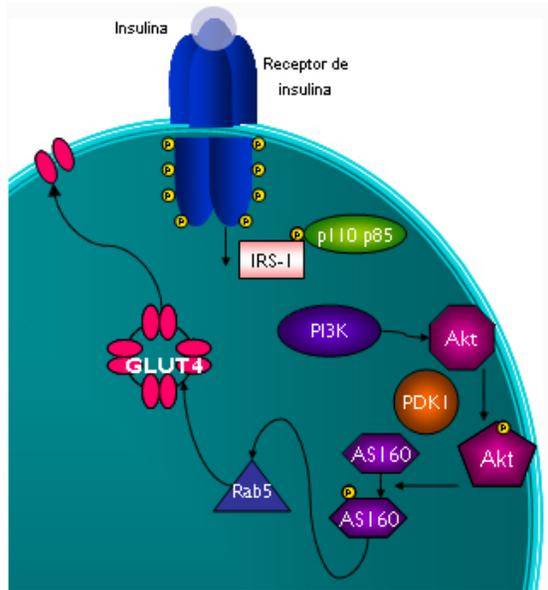


Fig. 3. Mecanismo de traslocación de GLUT4.

La disminución en GLUT4 se asocia a la presencia de resistencia a la insulina, en patologías como la obesidad⁴³, y la diabetes mellitus tipo 2. Diversos estudios sugieren que una disminución en la actividad de la AMPK pudiera ser otro factor involucrado en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético. La AMPK podría disminuir la resistencia a la insulina a través de la fosforilación de la proteína AS160, sugiriendo que AS160 puede estar involucrada en la translocación de GLUT4 dependiente de la AMPK y de forma independiente de insulina.³⁷ El aumento de la transcripción es otro posible mecanismo por el cual la AMPK podría incrementar GLUT4.⁴⁴

Proteína de soya

Sin importar las causas de la obesidad, todas conllevan con el tiempo a una acumulación de lípidos (lipotoxicidad) en el interior del miocito dando como resultado resistencia a la insulina. Este acúmulo de lípidos podría deberse a que la leptina pierde sus efectos antiestatóticos en el músculo esquelético lo que implicaría una menor activación de la AMPK y a una desregulación de los genes blancos de esta enzima. Es por lo tanto

importante buscar medios por los cuales se pueda disminuir o prevenir el fenómeno de lipotoxicidad en músculo esquelético.

Actualmente se sabe que la ingestión de proteína vegetal comparada con el consumo de proteína animal reduce el riesgo de desarrollar 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.⁴⁵ El efecto hipolipidémico de la proteína de soya puede ser mediado en varios niveles. La regulación génica es una de ellos, como se demostró en un modelo de ratas nefróticas en el que la alimentación con proteína de soya disminuyó la expresión del factor de transcripción SREBP1c y así como la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos.⁴⁶

Estudios previos en nuestro laboratorio con diferentes modelos experimentales que incluían a las ratas Zucker, o ratas con obesidad inducida por dieta, indicaron que el consumo de proteína de soya redujo la acumulación de triglicéridos y colesterol en el hígado en ambos modelos experimentales, lo cual indica que la proteína de soya tiene la capacidad de reducir la lipotoxicidad. Estos cambios en el hígado se han asociado a una menor expresión del factor de transcripción SREBP-1c y de uno de los genes blanco regulados por este factor que es la sintasa de los ácidos grasos.⁴⁷ Esta disminución en la síntesis de ácidos grasos en hígado se acompaña de una disminución de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Interesantemente, en todos estos modelos experimentales se ha observado que los animales alimentados con una proteína animal (caseína) desarrollan mayor obesidad que aquellos alimentados con proteína de soya.⁴⁸ Sin embargo se desconoce si la proteína de soya puede reducir la lipotoxicidad en músculo esquelético, a través de la regulación de AMPK en dos modelos de obesidad como 1) la obesidad genética (que existe en las ratas Zucker (fa/fa)) y 2) la obesidad inducida por dieta (en ratas donde no existe una alteración genética).

JUSTIFICACIÓN

Sin importar las causas de la obesidad, en la mayoría de los casos se presenta la pérdida del efecto antiestatótico de la leptina, que permite la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos. Este depósito de lípidos se ha relacionado con la presencia de resistencia a la insulina en músculo esquelético, el cual ha sido identificado como el mayor sitio de utilización de glucosa y de la acción periférica de la insulina.

Por otro lado, alteraciones en la regulación de la enzima AMPK que está involucrada en el balance metabólico de lípidos (oxidación/síntesis de lípidos) en el músculo esquelético se ha asociado a la pérdida del efecto antiestatótico de la leptina.

En la búsqueda de medios para disminuir o prevenir la acumulación de lípidos (principal causa de la resistencia a la insulina) en el músculo esquelético, se propone el consumo de proteína de soya. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de esta proteína reduce la lipotoxicidad en hígado de ratas en diversos modelos de obesidad. Sin embargo se desconoce si la proteína de soya podrá reducir la lipotoxicidad en músculo esquelético, mediante la regulación de AMPK en dos modelos de obesidad: 1) la obesidad genética (que existe en las ratas Zucker (fa/fa)) y 2) la obesidad inducida por dieta (en ratas donde no existe una alteración genética).

HIPÓTESIS

El consumo de un aislado de proteína de soya disminuirá la lipotoxocidad en músculo de ratas de dos modelos de obesidad mediante la regulación de AMPK y sus genes blanco.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la proteína de soya sobre la regulación de AMPK y el acúmulo de lípidos en músculo esquelético en diferentes modelos de obesidad en animales.

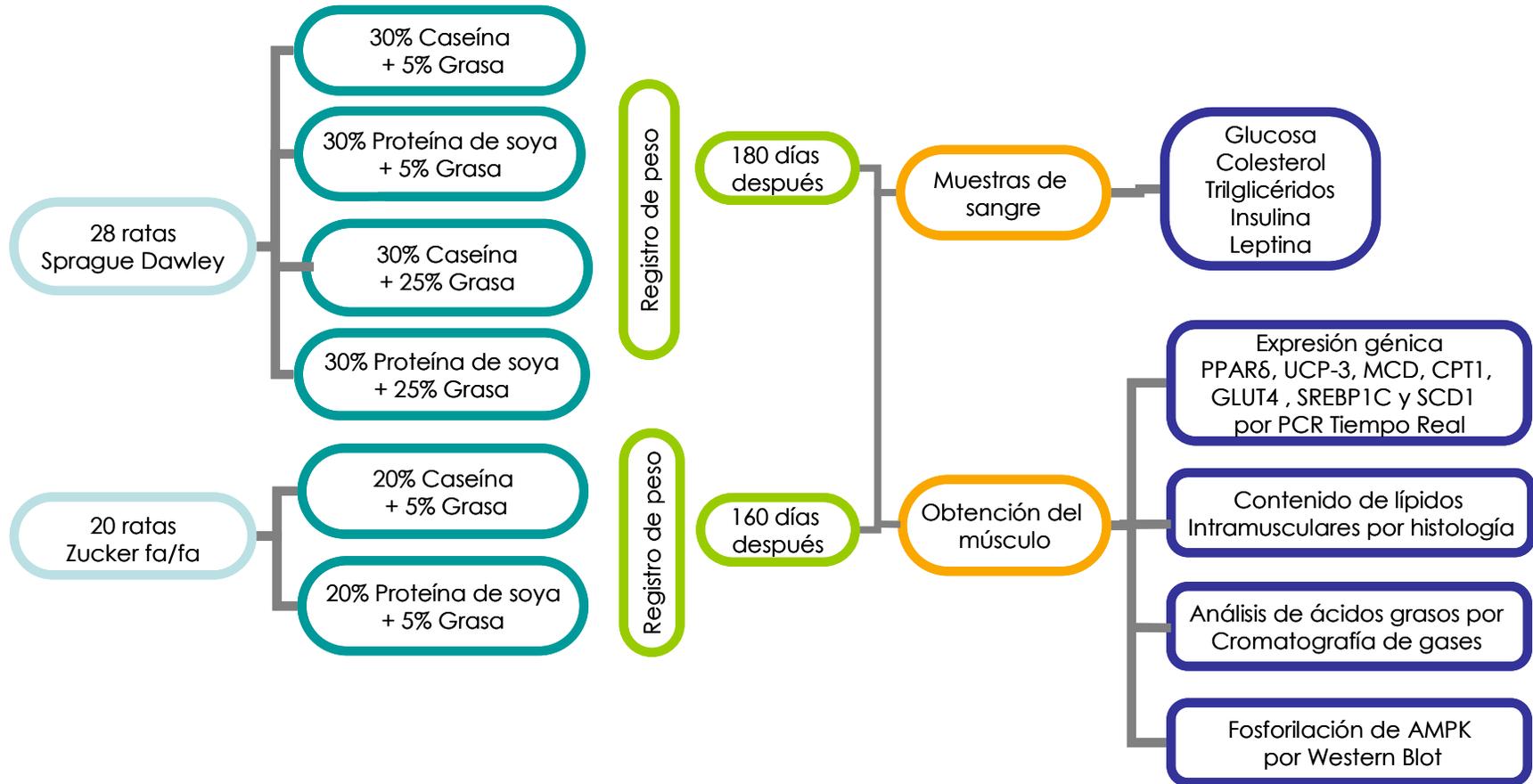
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de la proteína de soya en dos modelos de obesidad sobre:

- La ganancia de peso.
- Las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y leptina en suero.
- La acumulación de lípidos en el músculo esquelético, por medio de un análisis histológico.
- El tipo de ácidos grasos acumulados en el músculo esquelético.
- Contenido de triglicéridos en el músculo esquelético.
- La funcionalidad de AMPK en el músculo esquelético a través de:
 - La determinación de la fosforilación de AMPK en el sitio T-172.
 - La estimación de la expresión génica de SREBP1c, SCD1, MCD, CPT1, PPAR δ , UCP-3 y GLUT4.

METODOLOGÍA

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Modelos animales

Para estudiar el efecto de la proteína de soya sobre la regulación de AMPK y el acúmulo de lípidos en músculo esquelético en dos modelos de obesidad en animales, se utilizaron dos cepas de rata: 1) Ratas macho de la cepa Sprague Dawley de cuatro semanas de edad, las cuales se utilizaron para caracterizar el modelo de obesidad inducida por dieta, 2) Ratas macho Zucker fa/fa de cinco semanas de edad las cuales se utilizaron para caracterizar el modelo de obesidad genética.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta y al agua. Los grupos de estudio fueron los siguientes:

MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

- Grupo 1 (Caseína). Grupo alimentado con 30% de caseína como fuente de proteína y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.
- Grupo 2 (Soya). Grupo alimentado con 30% de proteína de soya y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.
- Grupo 3 (Caseína grasa). Grupo alimentado con 30% de caseína, 20% de lípidos en forma de manteca y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.
- Grupo 4 (Soya grasa). Grupo alimentado con 30% de proteína de soya, 20% de lípidos en forma de manteca y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.

MODELO DE OBESIDAD GENÉTICA

- Grupo 1 (Caseína). Grupo alimentado con 20% de caseína como fuente de proteína y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.
- Grupo 2 (Soya). Grupo alimentado con 20% de proteína de soya y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz.

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética para uso de animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Con la finalidad de determinar el efecto de la proteína de soya en el desarrollo de la obesidad en ambos modelos, se registró diariamente la ganancia de peso, el consumo de alimento y el consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en la dieta durante los

180 días y 160 días de estudio en el modelo de obesidad inducida por dieta y en el modelo de obesidad genética respectivamente.

Dietas

En la siguiente tabla se muestra la composición de las dietas que se administraron a los animales de ambos modelos de obesidad. Todos los nutrimentos utilizados en la elaboración de las dietas se obtuvieron de Harlan Teklad, excepto la soya que se obtuvo de Protein Technologies.

Tabla 1. Composición porcentual de las dietas del modelo de obesidad inducida por dieta

%	Caseína	Soya	Caseína Grasa	Soya Grasa
Proteína	30	30	30	30
Aceite de maíz	5	5	5	5
Manteca de cerdo	-	-	20	20
Mezcla de minerales AIN-93M-MX (Rogers Harper)	5	5	5	5
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan Teklad)	1	1	1	1
Citrato de colina	.165	0.165	0.165	.165
Dextrosa anhidra	29.41	29.41	19.41	19.41
Almidón de maíz	29.41	29.41	19.41	19.41

Tabla 2. Composición porcentual de las dietas del modelo de obesidad inducida por dieta

%	Caseína	Soya
Proteína	20	20
Aceite de maíz	5	5
Mezcla de minerales AIN-93M-MX (Rogers Harper)	5	5
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan Teklad)	1	1
Citrato de colina	0.165	0.165
Dextrosa anhidra	29.41	29.41
Almidón de maíz	39.41	39.41

En el presente trabajo se utilizó un aislado de proteína de soya, el cual contiene 86% de proteína. Este aislado está compuesto en un 90% por dos tipos de proteínas: la β -conglucina o globulina 7S y la glicina o 11S globulina. Estos péptidos inducen una menor expresión de genes lipogénicos y mayor expresión de genes de enzimas relacionadas

con oxidación de lípidos, aunque a la fecha se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta respuesta.⁴⁹ El asilado de proteína de soya también posee isoflavonas donde por cada gramo de producto se tiene: 1.38 mg de genisteína, 0.71 mg de daidzeína, 0.19 mg de gliciteína. La presencia de las isoflavonas en la proteína de soya es importante, debido a que tienen efectos biológicos como antiinflamatorios entre otros.

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la proteína de soya como un aislado que contiene proteína de soya e isoflavonas tiene sus efectos biológicos mencionados anteriormente, por medio de la probable interacción entre los dos componentes, la proteína de soya libre de isoflavonas pierde su acción sobre el metabolismo de los animales tratados.

Obtención de muestras y tejidos

Después de cumplir con el respectivo tiempo de estudio de cada modelo, las ratas con ayuno de 12 horas, se anestesiaron con CO₂. Posteriormente se decapitaron y se recolectó la sangre en tubos con gel separador y activador de coagulación para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina y leptina). De estos mismos animales se extrajo el músculo esquelético (*vastus lateralis*) para la extracción del RNA total, extracción de extractos citoplasmáticos, extracción de lípidos y análisis histológico. El tejido inmediatamente se depositó en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes.

Determinación de parámetros bioquímicos en suero

La concentración en suero de insulina y de leptina se determinó a través de radioinmunoanálisis específicos (Linco Diagnostics). La concentración de glucosa se analizó por el método de glucosa oxidasa en un estuche de diagnóstico *in vitro* (Bayer Corporation). La concentración de triglicéridos y colesterol en suero se determinó por métodos enzimáticos colorimétricos a través de kits de diagnóstico *in vitro* (Bayer Corporation)

Análisis histológico

Para evaluar el efecto de la proteína de soya sobre la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético en dos modelos de obesidad se realizó un análisis histológico. Las muestras de tejido se cortaron en secciones de cuatro micras de espesor utilizando un criostato. Los cortes se tiñeron con rojo oleoso para la determinación de contenido de lípidos y posteriormente se tiñeron con hematoxilina (colorante catiónico) con la finalidad de reconocer DNA y proteínas.

Determinación de la fosforilación de AMPK por medio de la técnica western blot

Para determinar si los cambios observados en los parámetros bioquímicos así como en la acumulación de lípidos en los animales alimentados con proteína de soya en los modelos de obesidad se relacionaban con la funcionalidad de AMPK, se decidió estudiar la funcionalidad de esta enzima de forma indirecta a través de la determinación de la fosforilación de AMPK por medio de la técnica de western blot. Se utilizaron 100 mg de tejido el cual se homogenizó en amortiguador de lisis que contenía 0.25 M de sacarosa, 10 mM Tris HCl, 3 mM MgCl₂ y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Para la obtención de extractos citoplasmáticos, el homogenizado se centrifugó a 3,000 rpm a 2°C durante 15 min. La determinación de la concentración de proteínas en el extracto citoplasmático se hizo por medio del kit de análisis de proteínas DC (Bio-Rad.)

Para la determinación de la proteína total de AMPK y de la fosforilación de la subunidad alfa de AMPK (pT172AMPK), se colocaron 50 µg de proteína en un gel SDS-PAGE al 9%. El gel se sometió a una electroforesis de 50V por 50 min y posteriormente a 100 V por 120 min, las proteínas se electrotransfirieron (7 V por 2 h) a una membrana de PVDF, que posteriormente se colocó en solución de bloqueo (TBS [10 mmol/l Tris, 0.25 mol/l NaCl, pH 7.5], 5% de leche descremada en polvo y 0.05% Tween 20), durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana se incubó durante 12 h a 4 °C con los anticuerpos policlonales para la detección de AMPK, pT172AMPK y Actina (Santa Cruz Biotechnology) a las siguientes diluciones: 1:5000, 1:500 y 1:3000, respectivamente. Posteriormente las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-AMPK, una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-pT172AMPK, y una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-actina. Después de

revelarse con luminol, se procedió a la cuantificación de AMPK, pT172AMPK y actina, la cual se realizó por exposición de la membrana a una película de autorradiografía Kodak MIN-R2000 y la cuantificación de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa SigmaScan Image Measurement Software Versión 1.20.09

Determinación de expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real)

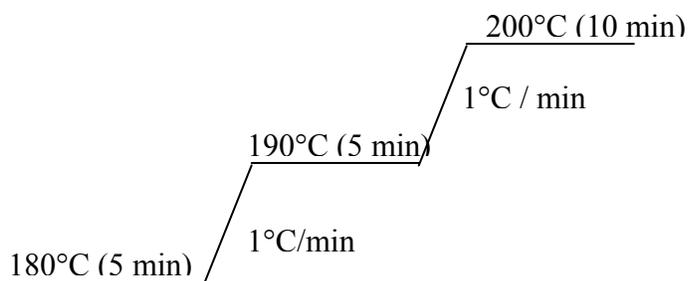
Otra forma de conocer la funcionalidad de AMPK de forma indirecta es a través de la cuantificación de la expresión génica de algunos genes blanco de esta enzima (SREBP1c (SREBP1-SRE), SCD1 (Rn00594894_ml), MCD (Rn00585056_ml), CPT1 (Rn00580707_ml), PPAR δ (Rn00565707_ml), UCP-3 (Rn00565707_ml) y GLUT4 (Rn00562597_ml)) usando un equipo de PCR de tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Para lo cual se obtuvo el RNA total del músculo esquelético por el método de Chomczynski *et al.* (1987). Posteriormente 5 μ g de RNA se sometieron a electroforesis en un gel de formaldehído-agarosa al 1% para comprobar su integridad. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 250 nm; a esta longitud de onda 1 unidad de densidad óptica es igual 40 μ g/ μ l, la pureza se determinó óptima cuando la relación de la absorbencia a 260 y 280 nm era mayor a 1.8.

El RNA obtenido se sometió al análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de dos pasos. El primer paso consistió en la obtención del DNA complementario mediante su retrotranscripción. Para lo cual en un volumen final de 22 μ l se preparó la mezcla de reacción que contenía 300 ng de RNA, amortiguador para la transcriptasa reversa (50 mM de Tris HCl pH 8.3, 75 mM de KCl y 3 mM de MgCl₂), 0.4 mM de cada uno de los dNTPs, 0.01 μ g/ μ l de oligonucleótido dT (el cual contiene de 12 a 18 residuos de timina), 1 U/ μ l de inhibidor de RNAasa y 5 U/ μ l de la transcriptasa reversa M-MULV. La retrotranscripción se llevo a cabo por 1 hora a 42°C y la inactivación de la enzima se realizó por 5 min. En el segundo paso se llevo a cabo la amplificación de los genes antes mencionados en 22 μ l de una mezcla de reacción que contenía 1 μ l del producto de la retrotranscripción obtenido anteriormente, 6 μ l de la mezcla maestra (4304437, Applied Biosystems), 0.6 μ l del oligonucleótido respectivo (SREBP1c, SCD1, MCD, CPT1, GLUT4, PPAR δ y UCP-3). 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 (Rn00667869_ml Applied Biosystems) 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.

Análisis de ácidos grasos por medio de cromatografía de gases.

Se extrajeron los ácidos grasos del músculo a través de la técnica de Folch et al. (1957). Se metilaron los ácidos grasos de acuerdo con Barakat y col. (1976) y se analizaron por cromatografía de gases. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Se utilizó una columna analítica INNOWAX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, y 0.25 μm de espesor de película, la cual consiste de polietilenglicol que le confiere una alta polaridad. Se utilizó una inyección tipo split con una relación 20.8:1, la temperatura del puerto de inyección se estableció a 225°C. Para la columna se utilizó la siguiente rampa de temperaturas:



La temperatura del detector fue de 225°C. Se inyectó 1 μl de muestra y el flujo de columna fue de 0.5 ml/min de helio como gas acarreador.

Se añadió ácido margárico como estándar interno para la cuantificación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos palmitato (16:0), palmitoleato (C16:1), estereato (C18:0), oleato (C18:1) y linoleato (C18:2n6) se identificaron por comparación con el tiempo de retención de los estándares respectivos (Sigma Aldrich)

Determinación del contenido de triglicéridos en el interior del músculo esquelético.

Se extrajeron los triglicéridos del músculo a través de la técnica de Bligh y Dyer⁵⁰. A 400 μl de homogenizado se les añadió 1.5 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2) y se mezcló vigorosamente. Posteriormente se le añadió 500 μl de cloroformo y 500 μl de agua desionizada y se mezcló vigorosamente. La mezcla anterior fue centrifugada a

3000 rpm durante 10 min a 4 °C, con la finalidad de separar las fases. Transcurrido el tiempo de centrifugación se transfirió la fase orgánica a un tubo nuevo. La fase orgánica se evaporó con N₂ durante 15 min. Para la cuantificación el evaporado se disolvió en un volumen de 700 µl de una mezcla al 10% de isopropanol/triton 10X. La concentración de triglicéridos se determinó a través de un ensayo (método enzimático colorimétrico) de diagnóstico *in vitro* (Bayer Corporation).

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE DATOS

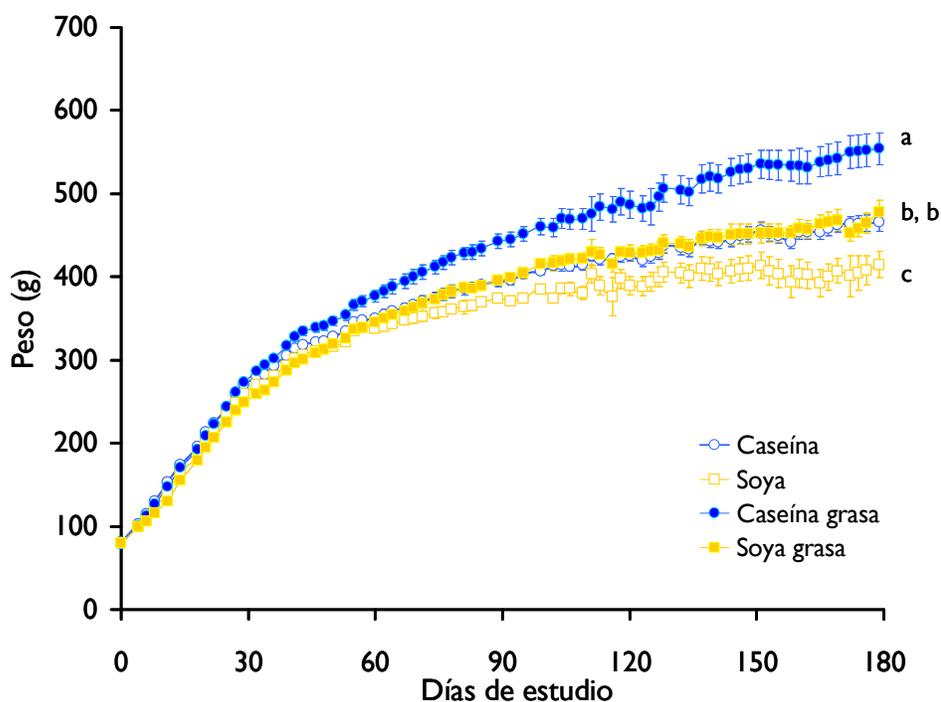
Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos se evaluaron por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con el tipo de proteína como variable independiente. El grado de significancia de las diferencias entre los grupos control y experimentales se determinó por medio de la prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher (Fisher PLSD), usando el programa StatView (Abacus Concepts) para Macintosh. Las diferencias se consideran significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA (OID)

Ganancia de peso

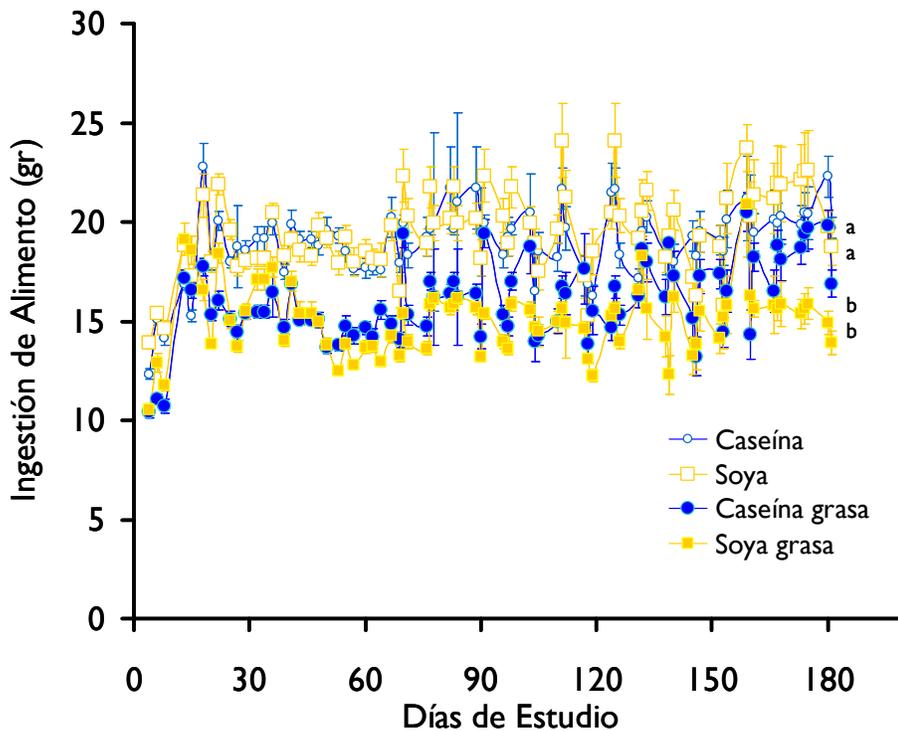
En la gráfica 1 se observa que el grupo alimentado con caseína presentó al término del estudio un peso de 465 ± 10 g, con una diferencia estadísticamente significativa con el grupo que consumió proteína de soya el cual terminó con un peso de 415 ± 14 g. Con respecto a los grupos altos en grasa, se observaron diferencias significativas entre los animales alimentados con caseína que presentaron al término del estudio un peso de 550 ± 2 g, 15.6 % más que el grupo soya grasa el cual alcanzó un peso de 465 ± 4 g.



Gráfica 1. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la ganancia de peso en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar del peso que presentaron cada uno de los grupos cada día durante los 180 días de estudio, $n=7$. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b > c$

Consumo de alimento

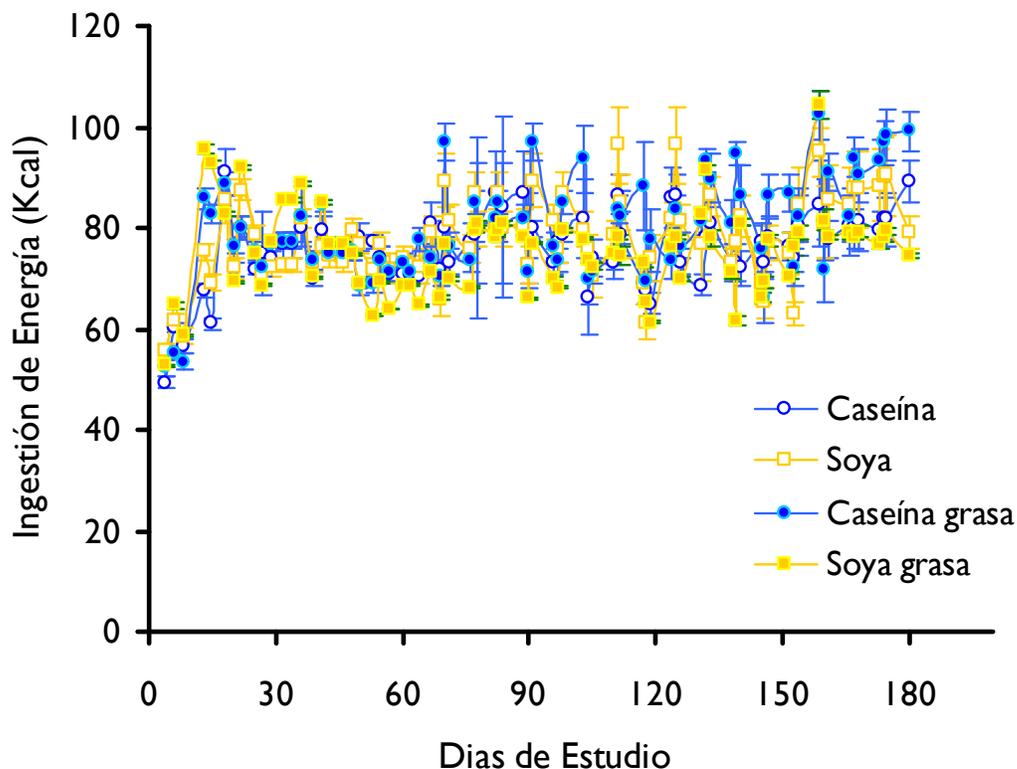
Para conocer si las diferencias encontradas en el peso de cada uno de los grupos se debían a cambios en el consumo de alimento, se determinó la cantidad de alimento ingerida por los animales. En la gráfica 2 se observa como el grupo de animales alimentados con caseína consumieron en promedio 19 ± 0.2 g sin presentar diferencia significativa con el grupo alimentado con soya el cual consumió 19.5 ± 0.2 g; los grupos alimentados con las dietas con elevado contenido en grasa consumieron 19.4% menos que los grupos anteriores, el grupo caseína grasa consumió 16 ± 0.2 g sin presentar diferencia significativa con el grupo soya grasa el cual consumió 15 ± 0.2 g.



Gráfica 2. Efecto la de proteína de soya en el consumo de alimento en el modelo DIO Los valores representan la media \pm del error estándar de la cantidad de alimento ingerida diariamente por durante los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Consumo de energía (Kcal/día)

En la gráfica 3 se muestra el consumo energético sin observarse diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. El consumo promedio durante el estudio fue de 77.3 ± 0.5 kcal/día en promedio.



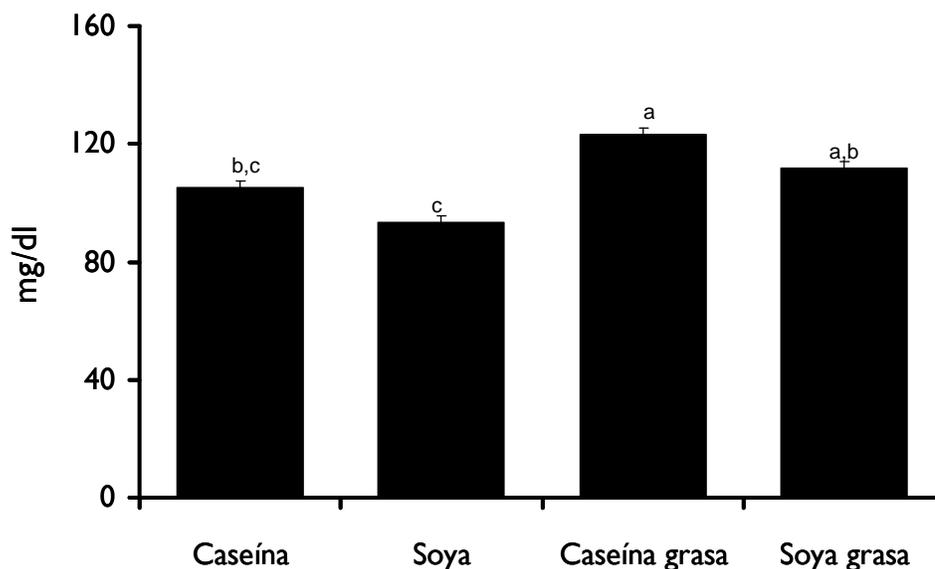
Gráfica 3. Efecto la de proteína de soya en el consumo energético en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar del consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en la dieta durante los 180 días de estudio, n=7. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$

PARAMETROS BIOQUIMICOS

Para determinar si las diferencias encontradas en los pesos de los animales alimentados con proteína de soya, modificaban las concentraciones algunos metabolitos, se obtuvo el suero de los animales de cada grupo y se determinó la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol.

Concentración de glucosa en suero

En la gráfica 4 se puede observar como el grupo de caseína presentó una concentración de 105 ± 2 mg/dl de glucosa sin mostrar diferencia significativa con respecto al grupo de soya el cual alcanzó una concentración de 93.5 ± 6 mg/dl de glucosa; el grupo de caseína grasa tuvo concentraciones de 123 ± 6.7 mg/dl de glucosa la cual no fue diferente con el grupo de soya grasa, con concentraciones de 111.6 ± 5.7 mg/dl de glucosa; los niveles de glucosa plasmática en los grupos alimentados con las dietas de mayor contenido lipídico fueron 19% más altos que en los grupos alimentados con las dietas con un contenido normal de lípidos, sin presentarse diferencias significativas entre ambos grupos.

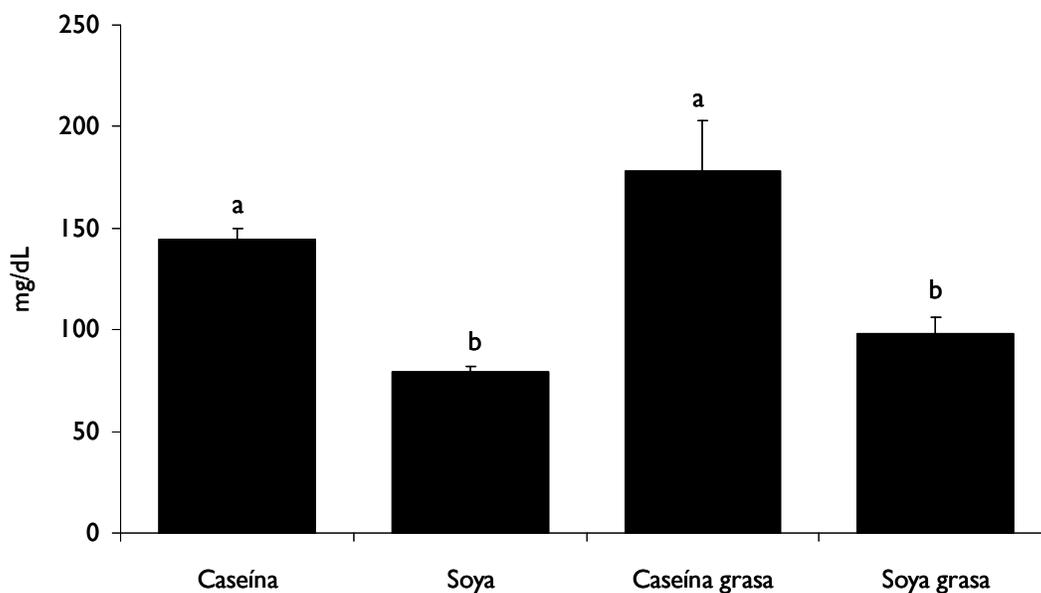


Gráfica 4. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de glucosa en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar de la glucosa en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b > c$.

Concentración de colesterol en suero

El consumo de proteína de soya, mantuvo las concentraciones normales de colesterol (79 ± 3 mg/dl) comparado con el grupo que fue alimentado con caseína el cual presentó un incremento del 45.5% de los valores normales (145 ± 5 mg/dl). Independientemente de la cantidad de lípidos en la dieta, el grupo alimentado con soya grasa presentó 98 ± 8.3 mg/dl,

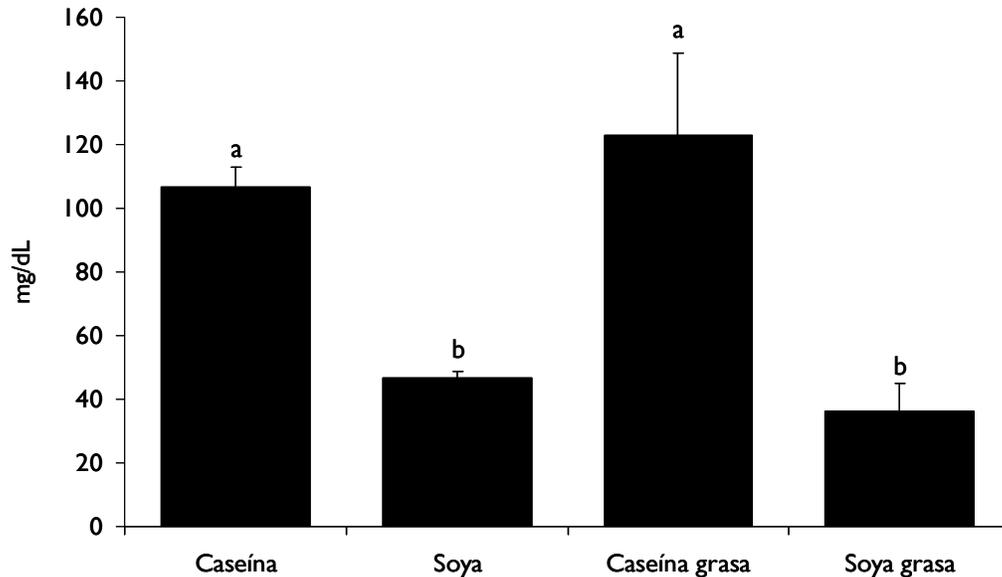
1.8 veces menos que las concentraciones alcanzadas por el grupo alimentado con caseína grasa el cual alcanzó concentraciones de 178.2 ± 24.8 mg/dl de colesterol (Ver Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de colesterol en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar del colesterol en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Concentración de triglicéridos en suero

Las concentraciones de triglicéridos en suero se presentan en la gráfica 6. El consumo de proteína de soya tuvo un efecto hipolipidémico con respecto a las concentraciones de triglicéridos, presentando 2.3 veces menos triglicéridos (46.5 ± 2.2 mg/dl) que el grupo alimentado con caseína que alcanzó 106.5 ± 6.5 mg/dl. Con respecto a los grupos alimentados con dietas altas en lípidos, el grupo caseína grasa presentó 122.7 ± 25.9 mg/dl de triglicéridos, 3.38 veces mayor que el grupo soya grasa con 36.33 ± 8.6 mg/dl de triglicéridos. Entre el grupo de proteína de soya como el grupo de proteína soya con grasa no se observaron diferencias significativas.

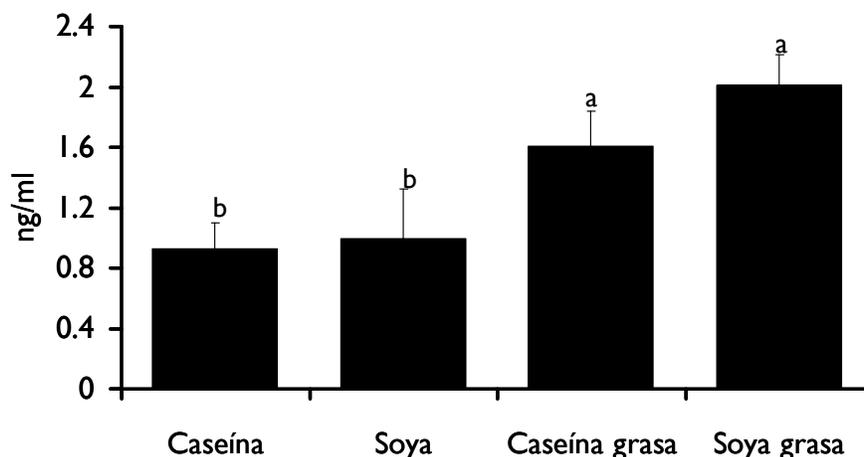


Gráfica 6. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de triglicéridos en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar de los triglicéridos en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, $n=7$. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p<0.05$). $a>b$.

Para poder establecer si las diferencias encontradas en las concentraciones de colesterol, triglicéridos y glucosa en sangre, se encontraban relacionadas con cambios en los niveles plasmáticos de las hormonas encargadas de regular el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, se determinó la concentración de insulina y leptina en plasma.

Concentración de insulina en suero

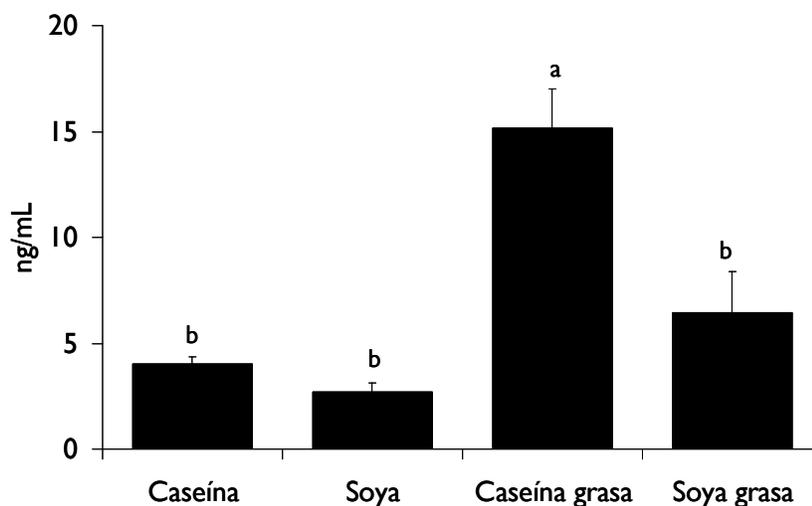
En la gráfica 7 se puede observar como la concentración de insulina plasmática no presentó diferencia significativa entre el grupo alimentado con caseína y el grupo alimentado con soya encontrándose en promedio en 0.95 ± 0.15 ng/ml; entre los grupos alimentados con dietas altas en lípidos no se presentaron diferencias, alcanzando valores de 1.60 ± 0.22 ng/ml y 2.01 ± 0.23 ng/ml para el grupo alimentado con caseína grasa y soya grasa respectivamente.



Gráfica 7. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de insulina en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar de la insulina sérica presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Concentración de leptina en suero

Como se muestra en la gráfica 8, la concentración de leptina entre el grupo alimentado con caseína y proteína de soya no presenta diferencias significativas. El grupo caseína grasa alcanzó valores de 15.1 ± 1.8 ng/ml, 2.35 veces más altos que los valores presentados por el grupo de soya grasa (6.4 ± 1.9 ng/ml).



Gráfica 8. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de leptina en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar de leptina sérica presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

CORTES HISTOLÓGICOS

Para conocer si existía acumulación de lípidos en el tejido muscular, se realizaron cortes histológicos de 4 micras en frío de músculo esquelético (*Vastus lateralis*), los cuales se tiñeron con rojo oleoso (Fig. 4). Se observa mayor acumulación de lípidos en los animales alimentados con caseína y caseína grasa, que en los de soya y soya grasa.

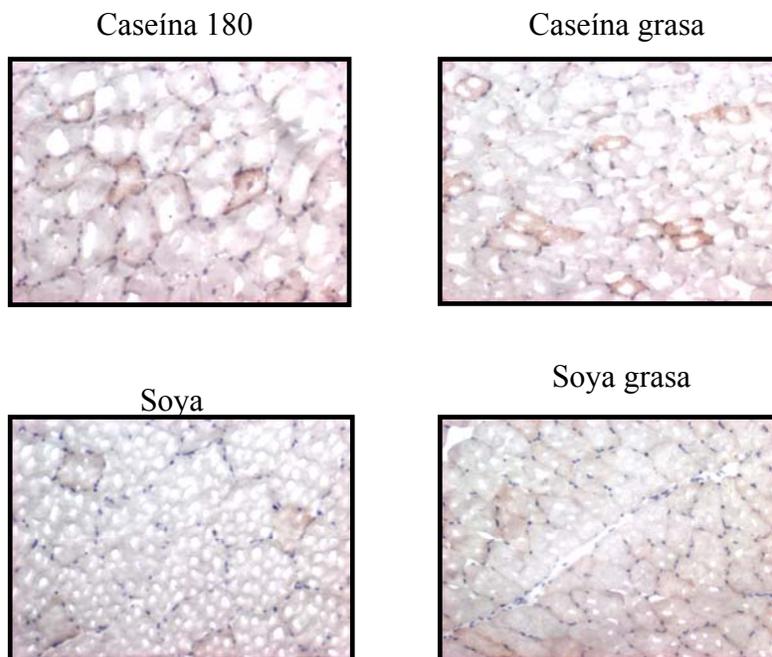
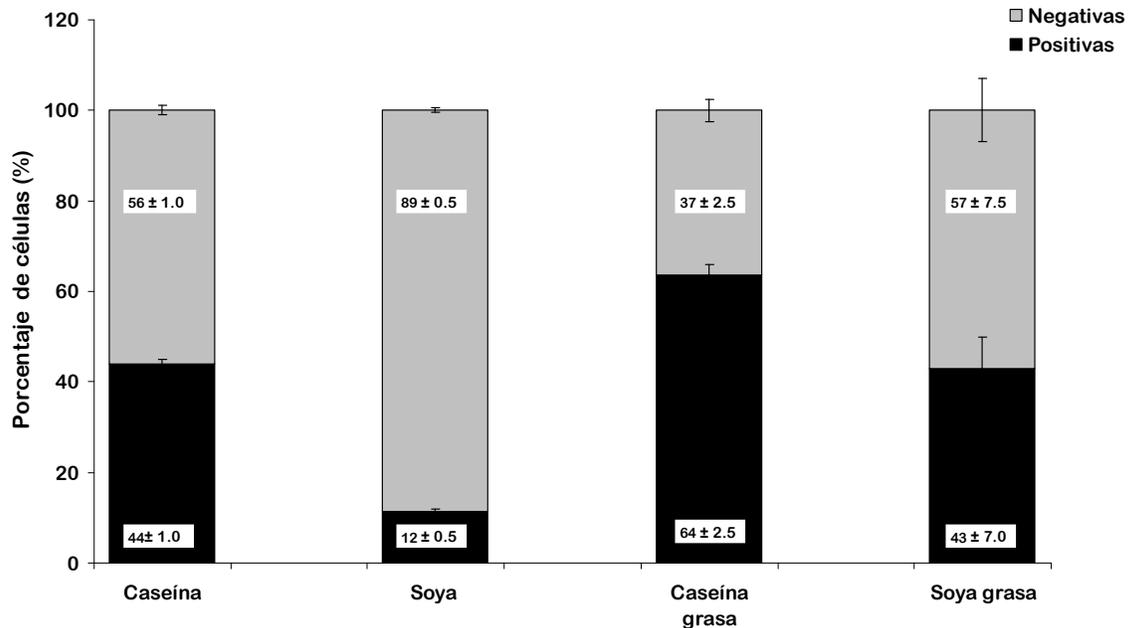


Fig. 4 Efecto del consumo de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (*Vastus lateralis*) del modelo DIO. Cortes histológicos de 4 μm de *Vastus lateralis* representativos de cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio. Sometido a tinción de Rojo Oleoso para la identificación de lípidos. Aumento 10x.

Uno de los hechos mas importantes que se notan al examinar los patrones de tinción de rojo oleoso en músculo esquelético, es la heterogeneidad que existe de la tinción de lípidos de las fibras musculares la cual esta relacionada con el tipo de fibras. La heterogeneidad permite hacer un análisis cuantitativo de las células teñidas con rojo oleoso (positivas) y de las células no teñidas de rojo oleoso (negativas). Se observa que las células de los grupos que consumieron proteína de soya y soya grasa independientemente del contenido de lípidos poseen un menor porcentaje de células positivas y un mayor porcentaje de células negativas al ser comparadas con los grupos de caseína y caseína grasa. Gráfica 9.



Gráfica 9. Efecto del consumo de proteína de soya sobre el acúmulo de lípidos en el interior del miocito en el modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar del porcentaje de células teñidas (positivas ■) y de células no teñidas (negativas ■) presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=4.

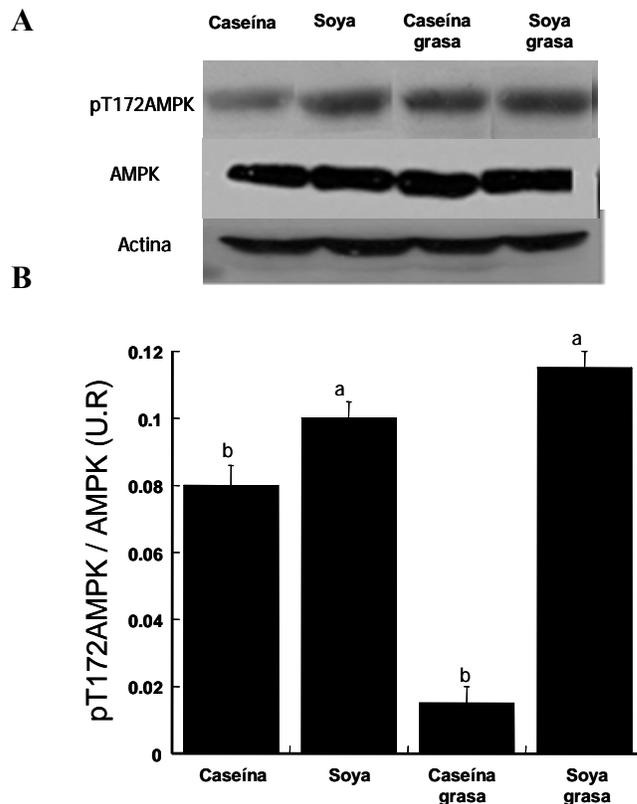
Porcentaje de células positivas: caseína 44 ± 1.0^b , soya 12 ± 0.5^c , caseína grasa 64 ± 2.5^a , soya grasa 43 ± 7.0^b .

Porcentaje de células negativas: caseína 56 ± 1.0^b , soya 89 ± 0.5^a , caseína grasa 37 ± 2.5^c , soya grasa 57 ± 7.5^b .

Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b > c$.

Al observar las histologías y encontrar menor acumulación de lípidos al interior del miocito, así como los cambios observados en los datos bioquímicos, en los animales que consumieron soya independientemente del contenido de lípidos en la dieta, se estudió la funcionalidad de AMPK, con la finalidad de entender si estos efectos se debían a un cambio en la capacidad oxidativa del músculo esquelético y se observó lo siguiente:

1) *La determinación de la fosforilación de AMPK.* Se midió la expresión de la proteína total (AMPK) así como de la proteína AMPK fosforilada en el residuo Thr 172 (pT172AMPK), utilizando como control de carga a la proteína actina. Posteriormente, se calculó la relación pT172AMPK/AMPK y de esta forma se determinó el porcentaje de la fosforilación de AMPK con la finalidad de conocer de forma indirecta el grado de activación de la proteína en cada uno de los tratamientos dietarios. Así se observó que en el modelo de obesidad inducida por dieta, la relación pT172AMPK/AMPK fue significativamente mayor en los animales alimentados con proteína de soya independientemente del contenido de lípidos en la dieta. Gráfica 10.



Gráfica 10. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético modelo DIO. A) Inmunoblot de AMPK total, Actina y la fosforilación de AMPK Thr¹⁷², B) Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos (p<0.05). a>b.

2) La expresión de mRNA de algunos genes blanco de AMPK

Para la determinación de la abundancia relativa de mRNA de los diferentes genes, la expresión de los grupos de soya y soya grasa se hizo relativa a la expresión de los grupos caseína y caseína grasa, respectivamente.

En el **Anexo 1** se muestran los cálculos para la obtención de la expresión relativa, así como una segunda determinación de la abundancia relativa de mRNA de los diferentes genes, donde la expresión de los grupos de soya, soya grasa y caseína grasa se hizo relativa a la expresión del grupo de caseína.

Con respecto a la expresión de los genes involucrados en las vías oxidativas y transporte de glucosa como: PPAR δ , UCP3, CPT1, MCD, y GLUT4 respectivamente se observó un incremento significativo en la expresión de mRNA en animales alimentados con

proteína de soya, independientemente de la cantidad de lípidos. Por el contrario, en la expresión de los genes involucrados en las vías lipogénicas como: SREBP1c y SCD1 se observó una disminución significativa en la expresión de mRNA en animales alimentados con proteína de soya de forma independientemente de la cantidad de lípidos recibidos (Tabla 3). Estos resultados sugieren que la combinación de un incremento en la oxidación de los ácidos grasos y una disminución en su síntesis conlleva a una reducción del contenido de lípidos en la célula.⁵¹

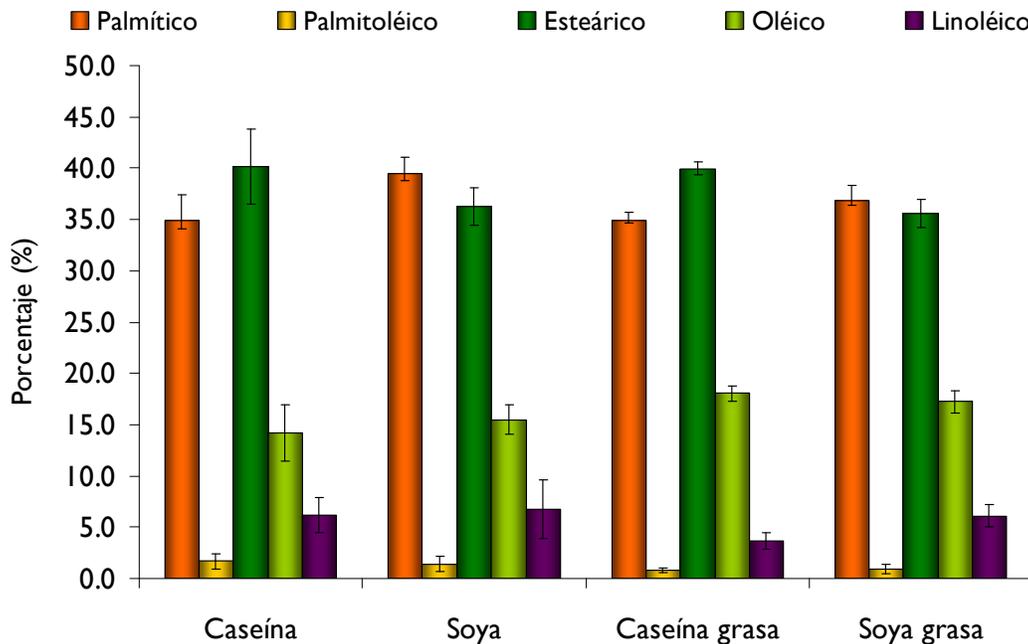
Tabla 3. Efecto del consumo de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP3, CPT1, MCD, GLUT4, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético del modelo DIO

	Caseína	Soya	Caseína grasa	Soya grasa
PPARδ	1.0 \pm 0.13 ^b	1.82 \pm 0.04 ^a	1.0 \pm 0.05 ^b	2.09 \pm 0.12 ^a
UCP3	1.0 \pm 0.01 ^b	1.83 \pm 0.07 ^a	1.0 \pm 0.01 ^b	1.67 \pm 0.05 ^a
CPT1	1.0 \pm 0.14 ^b	1.61 \pm 0.06 ^a	1.0 \pm 0.15 ^b	1.88 \pm 0.15 ^a
MCD	1.0 \pm 0.23 ^a	0.81 \pm 0.09 ^a	1.0 \pm 0.15 ^b	5.80 \pm 0.29 ^a
GLUT4	1.0 \pm 0.15 ^b	2.62 \pm 0.32 ^a	1.0 \pm 0.06 ^b	2.17 \pm 0.56 ^a
SREBP1c	1.0 \pm 0.07 ^a	0.40 \pm 0.02 ^b	1.0 \pm 0.10 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b
SCD1	1.0 \pm 0.07 ^a	0.623 \pm 0.17 ^b	1.0 \pm 0.13 ^a	0.047 \pm 0.009 ^b

Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de caseína y caseína grasa fueron utilizados valores relativos para los grupos de proteína de soya y soya grasa, respectivamente. Expresados como promedios \pm el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b$. $n = 3$.

Determinación del tipo de ácidos grasos contenidos en el músculo esquelético.

Para determinar si la acumulación de lípidos en el músculo se asociaba con la presencia de un tipo de ácido graso. Se cuantificaron los ácidos grasos contenidos en el interior del músculo esquelético por medio de cromatografía de gases. No se observaron diferencias significativas en el tipo de ácidos grasos contenidos en el músculo esquelético en ninguno de los tratamientos dietarios. Gráfica 11.

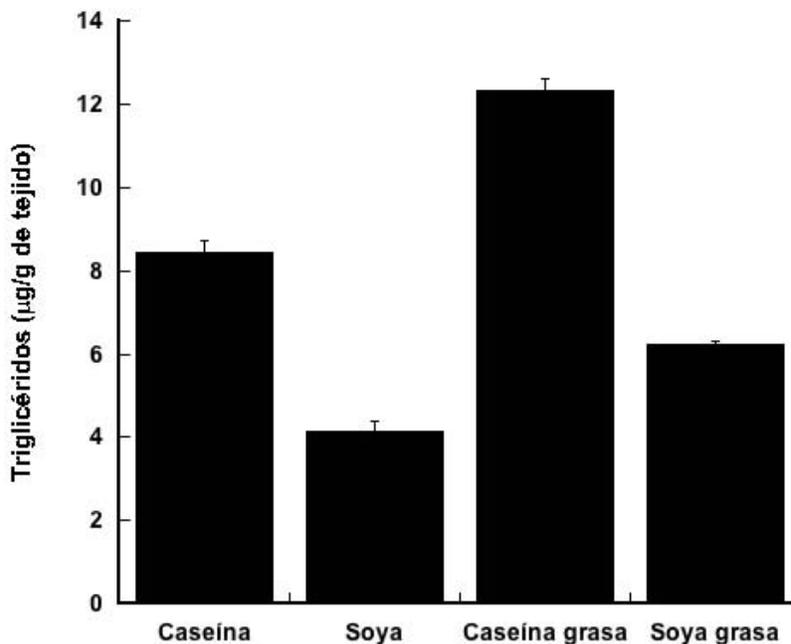


Gráfica 11. Efecto del consumo de proteína de soya en el contenido de ácidos grasos en músculo de ratas Sprague Dawley modelo DIO. Los valores representan la media \pm del error estándar de los ácidos grasos expresados como porcentaje del total presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=7. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Durante la obesidad existe un incremento en el contenido de triglicéridos en el interior de este tejido lo que interfiere en la señalización de insulina. En ausencia de un cambio significativo en el patrón de ácidos grasos, se realizó la extracción de triglicéridos del músculo esquelético.

Contenido de triglicéridos en el interior del músculo esquelético

Como se muestra en la gráfica 12, el consumo de proteína de soya independientemente del contenido de lípidos en la dieta disminuyó significativamente el acúmulo de triglicéridos en el músculo esquelético.



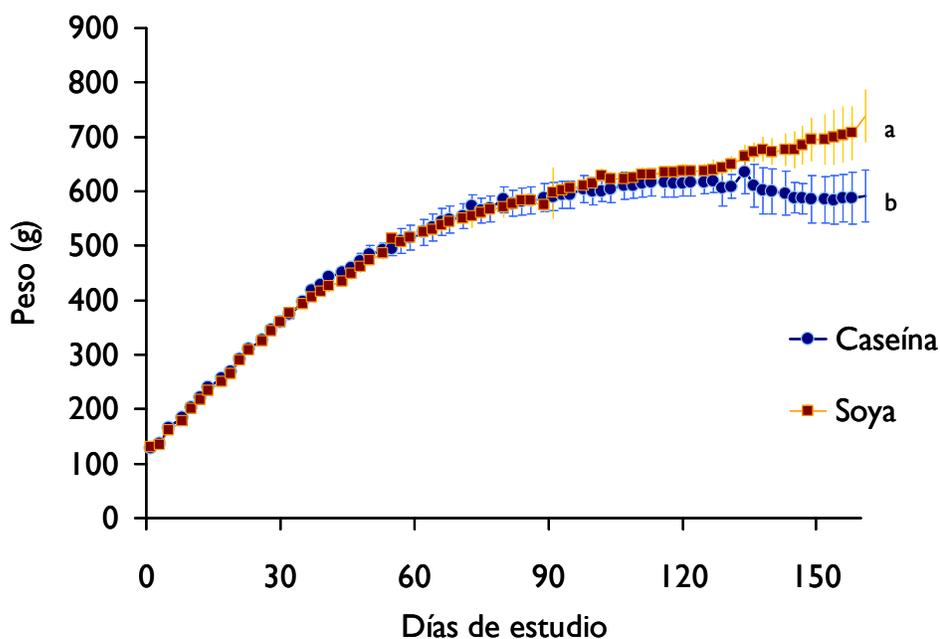
Gráfica 12. Efecto del consumo de proteína de soya sobre el contenido de triglicéridos en el músculo esquelético. Los valores representan la media \pm del error estándar del contenido de triglicéridos presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=5. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Con el estudio del modelo anterior de obesidad, se observó que el consumo de proteína de soya independientemente del contenido de lípidos en la dieta, incrementó la fosforilación de AMPK, permitiendo una mayor expresión de genes involucrados en la oxidación de lípidos así como en la utilización de glucosa, y una menor expresión de los genes involucrados en la síntesis de lípidos. Y disminuyó el contenido de triglicéridos en el interior del músculo esquelético. Para conocer si los efectos de la proteína de soya en el músculo esquelético eran mediados directamente a través de una acción directa sobre el receptor de la leptina, se utilizó un modelo de obesidad que presenta un defecto en este receptor. A continuación se muestran los resultados obtenidos en el modelo de obesidad genética.

OBESIDAD GENÉTICA (ZUCKER (FA/FA))

Ganancia de peso

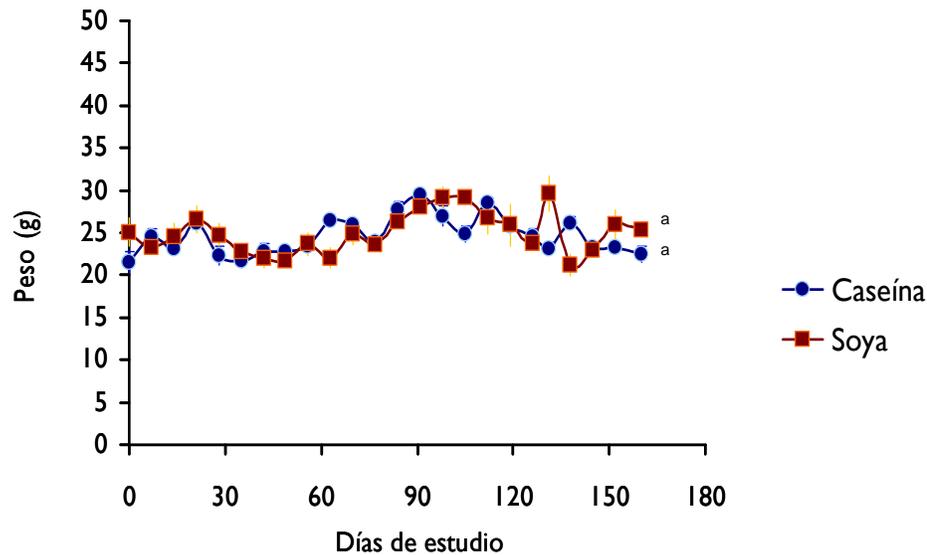
En la gráfica 13 se observa que el grupo alimentado con caseína presentó al término del estudio un peso de 591.9 ± 48.9 g, 16% menor que el grupo que consumió proteína de soya el cual terminó con un peso de 687 ± 22 g.



Gráfica 13. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la ganancia de peso en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar del peso que presentaron cada uno de los grupos cada día durante los 160 días de estudio, n=10. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Consumo de alimento

En la gráfica 14 se observa que el grupo de animales alimentados con caseína consumieron en promedio 24.5 ± 2.1 g sin presentar diferencia significativa con el grupo alimentado con soya el cual consumió 25 ± 2.4 g.



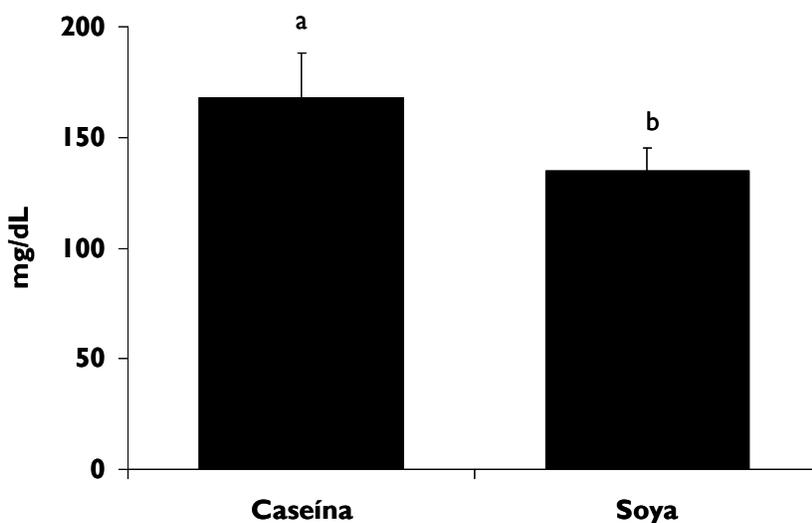
Gráfica 14. Efecto la de proteína de soya en el consumo de alimento en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de la cantidad de alimento ingerida diariamente por durante los 180 días de estudio, n=10. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Para determinar si la diferencia encontradas en el peso de los animales alimentados con proteína de soya, afectaban a los parámetros bioquímicos, se obtuvo el suero de los animales de cada grupo y se determinó la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol.

PARAMETROS BIOQUIMICOS

Concentración de glucosa en suero

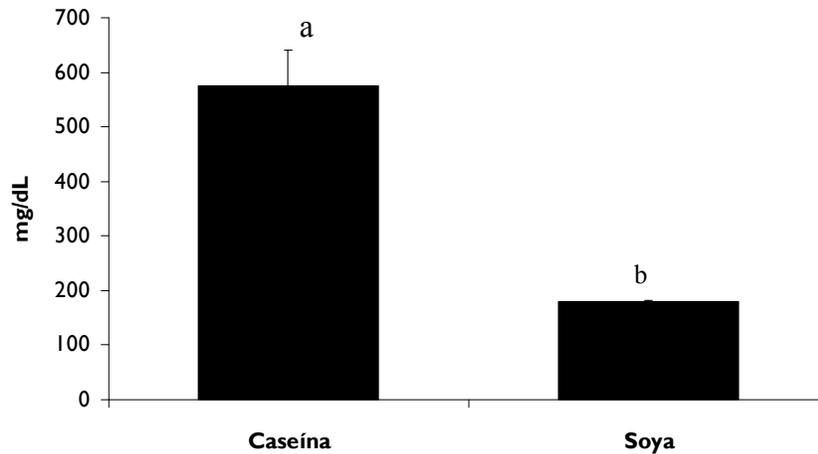
En la gráfica 15 se observa que la alimentación con proteína de soya disminuyó significativamente la concentración de glucosa, de 168 ± 20 mg/dl en el grupo de caseína a 135 ± 10 mg/dl de glucosa.



Gráfica 15. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de glucosa en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de la glucosa en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=10. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Concentración de colesterol en suero

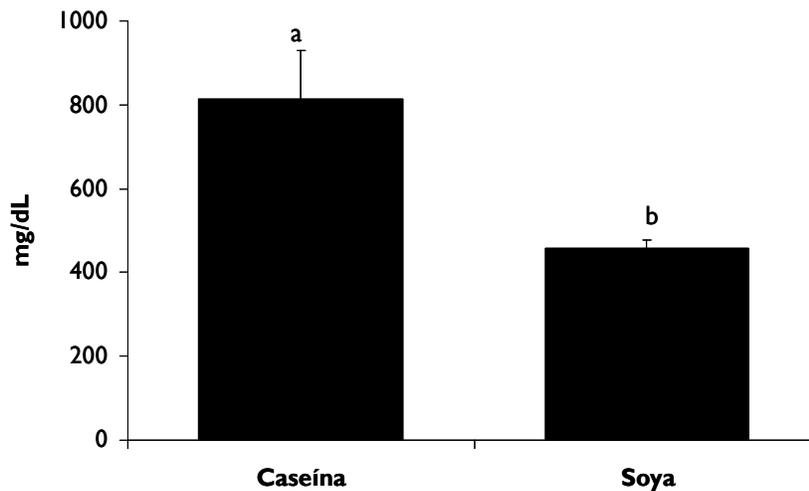
El grupo alimentado con soya disminuyó significativamente sus niveles de colesterol 179 ± 30 mg/d comparados con el grupo alimentado con caseína que presentó valores de 575 ± 66 mg/dl de colesterol. (Gráfica 16).



Gráfica 16. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de colesterol en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar del colesterol en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=10. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b$.

Concentración de triglicéridos en suero

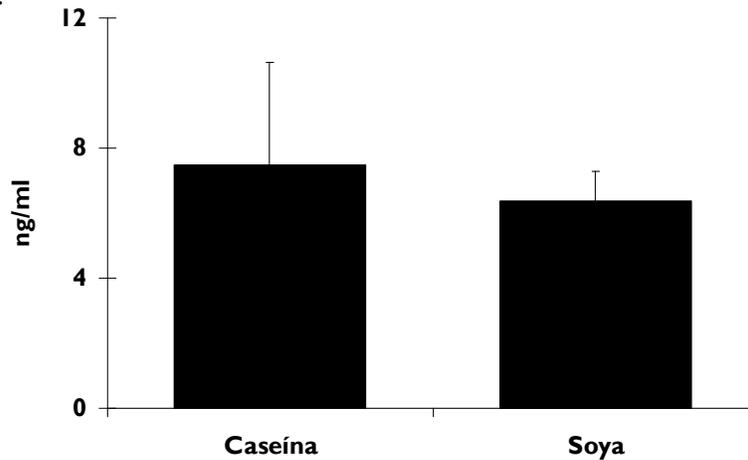
La concentración de triglicéridos en suero se presenta en la gráfica 17. El consumo de proteína de soya disminuyó las concentraciones de triglicéridos en suero (457.5 ± 20 mg/dl) comparado con el grupo de caseína que alcanzó valores de 813 ± 116 mg/dl.



Gráfica 17. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de triglicéridos en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de los triglicéridos en suero presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=10. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). $a > b$.

Concentración de insulina en suero

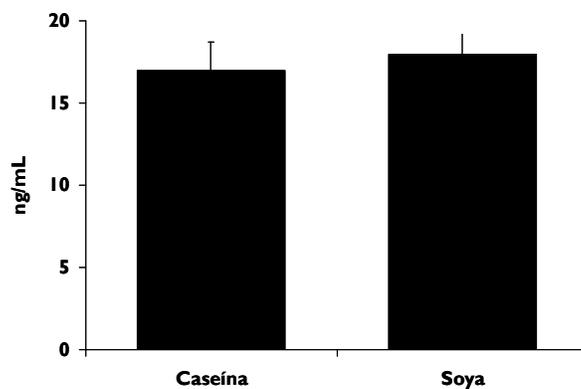
En la gráfica 18 se puede observar como la concentración de insulina plasmática no presentó diferencia significativa entre el grupo alimentado con caseína y el grupo alimentado con soya con concentraciones de 7.4 ± 3.13 ng/ml y 6.3 ± 0.9 ng/ml respectivamente.



Gráfica 18. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de insulina en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de la insulina sérica presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=10. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

Concentración de leptina en suero

Como se muestra en la gráfica 19, la concentración de leptina entre el grupo alimentado con caseína y proteína de soya no se observaron diferencias significativas. Las concentraciones registradas fueron de 17 ± 1.7 ng/ml y 18 ± 1.8 , respectivamente.



Gráfica 19. Efecto del consumo de proteína de soya sobre las concentraciones séricas de leptina en ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de leptina sérica presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=10. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

CORTES HISTOLÓGICOS

Para conocer si existía acumulación de lípidos en el tejido muscular, se realizaron cortes histológicos de 4 micras en frío de músculo esquelético (*Vastus lateralis*), las cuales se analizaron por medio de la técnica de rojo oleoso (Fig. 5). Se observa mayor acumulación de lípidos en los animales alimentados con caseína.

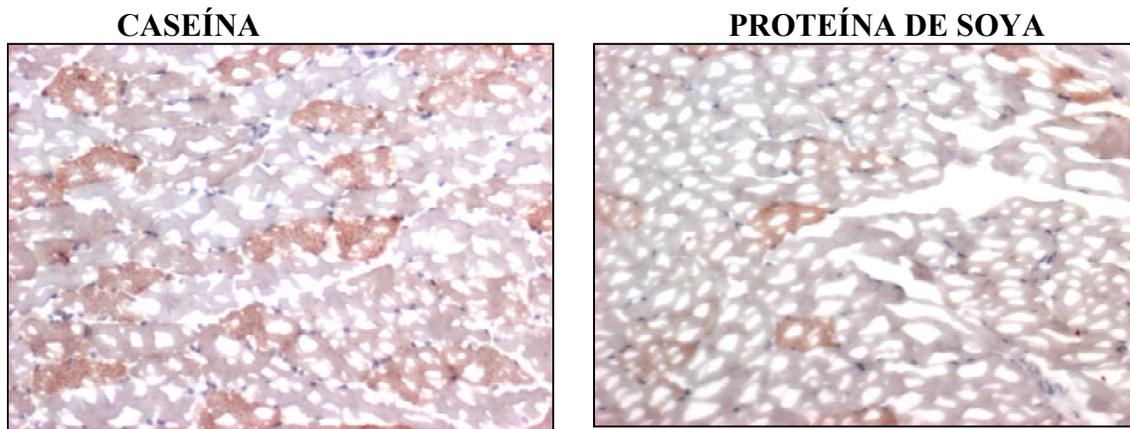
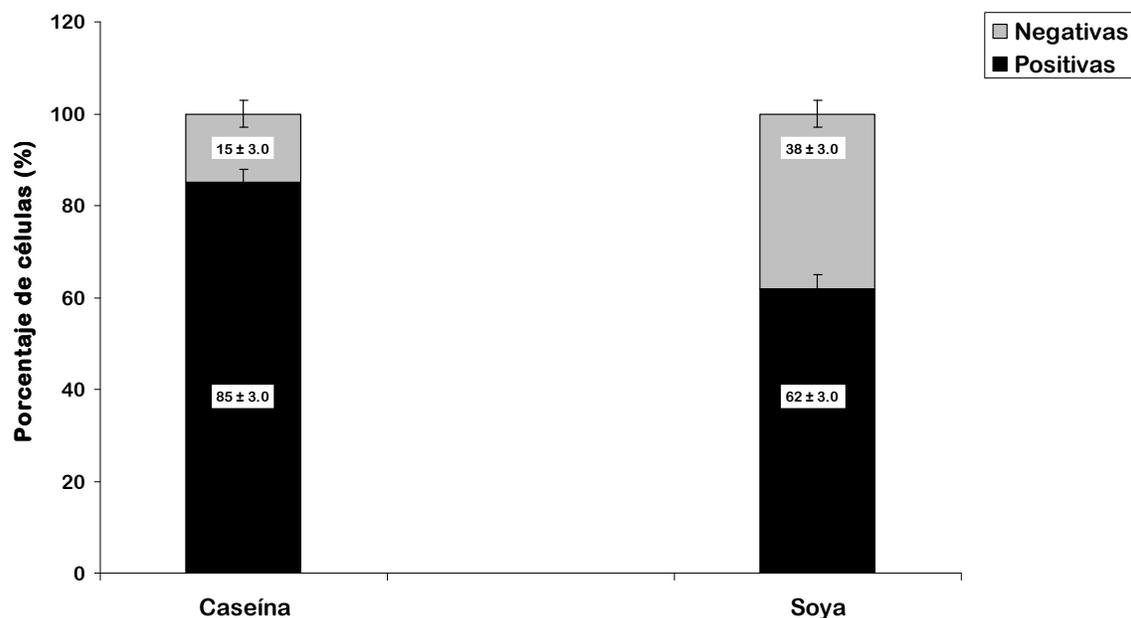


Fig. 5 Efecto del consumo de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (*Vastus lateralis*) de ratas Zucker fa/fa modelo GO. Cortes histológicos de 4 μm de *Vastus lateralis* representativos de cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio. Aumento 10x. n=5.

La heterogeneidad de la tinción de las fibras con rojo oleoso permite hacer un análisis cuantitativo de las células teñidas con rojo oleoso (positivas) y de las células no teñidas de rojo oleoso (negativas). Se observa que el grupo que consumió proteína de soya posee un menor porcentaje de células positivas (62 ± 3.0) y un mayor porcentaje de células negativas (38 ± 3.0) al ser comparadas con el porcentaje de células positivas (85 ± 3.0) y negativas (62 ± 3.0) del grupo de caseína Gráfica 20.



Gráfica 20. Efecto del consumo de proteína de soya sobre el acúmulo de lípidos en el interior del miocito de ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar del porcentaje de células teñidas (positivas ■) y de células no teñidas (negativas ■) presentada por cada uno de los grupos al término de los 180 días de estudio, n=4. p<0.05.

Porcentaje de células positivas: caseína 85 ± 3.0^a , soya 62 ± 3.0^b

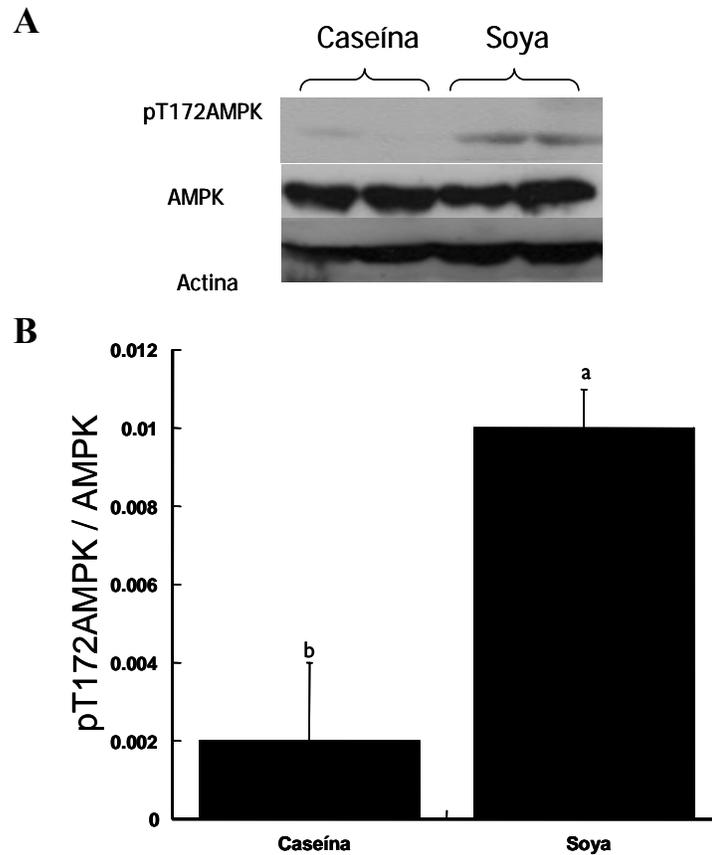
Porcentaje de células negativas: caseína 15 ± 3.0^b , soya 38 ± 3.0^a

Las letras indican diferencias significativas entre los grupos (p<0.05). a>b.

Al observar menor acumulación de lípidos al interior del miocito en los animales alimentados con proteína de soya. Se estudió el efecto del consumo de proteína de soya sobre la funcionalidad de AMPK mediante:

1) *Determinación del estado de fosforilación de la AMPK.*

De la forma descrita en el modelo anterior (DIO) se determinó la fosforilación de AMPK con la finalidad de conocer de forma indirecta la funcionalidad de la proteína en cada uno de los tratamientos dietarios. Así se observó que en el modelo de obesidad genética, la relación pT172AMPK/AMPK fue significativamente mayor en los animales alimentados con proteína de soya. Gráfica 21.



Gráfica 21. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker fa/fa modelo GO. A) Inmunoblot de AMPK total, Actina y la fosforilación de AMPK Thr¹⁷², B) Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=5. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos (p<0.05). a>b.

2) La expresión de mRNA de algunos genes blanco de AMPK

Para la determinación de la abundancia relativa de mRNA de los diferentes genes se comparó la expresión del grupo de soya relativo a la expresión del grupo alimentado con caseína. Con respecto a la expresión de los genes involucrados en las vías oxidativas y de transporte de glucosa (PPAR δ , UCP3, CPT1, MCD, y GLUT4) se observó un incremento muy significativo en la expresión de mRNA en animales alimentados con proteína de soya. Por otra parte, la expresión de los genes involucrados en las vías lipogénicas (SREBP1c y SCD1) presentó una disminución significativa en la expresión de mRNA en animales alimentados con proteína de soya (Tabla 4).

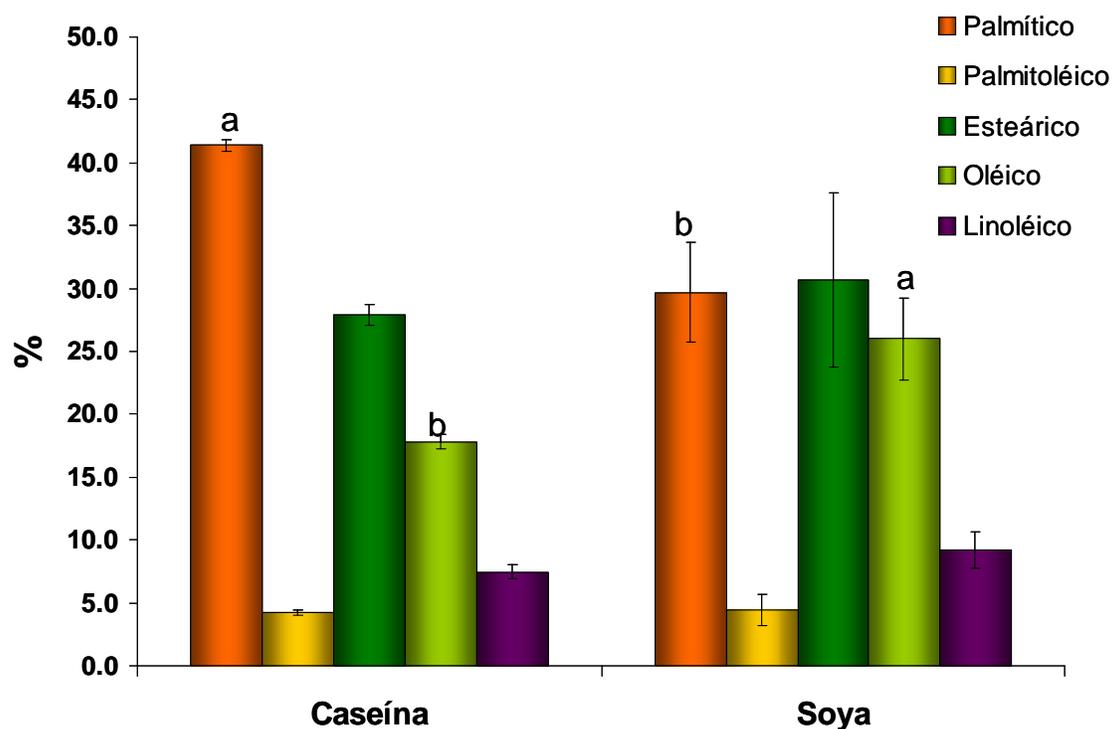
Tabla 4. Efecto del consumo de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP-3, CPT1, MCD, GLUT4, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético del modelo GO.

	Caseína	Soya
PPARδ	1.00 \pm 0.63 ^b	7.63 \pm 0.36 ^a
UCP3	1.00 \pm 0.67 ^b	8.77 \pm 0.37 ^a
CPT1	1.00 \pm 0.06 ^b	4.05 \pm 0.073 ^a
MCD	1.00 \pm 0.06 ^b	12.50 \pm 1.10 ^a
GLUT4	1.00 \pm 0.02 ^b	1.56 \pm 0.18 ^a
SREBP1c	1.00 \pm 0.04 ^a	0.18 \pm 0.073 ^b
SCD1	1.00 \pm 0.13 ^a	0.028 \pm 0.002 ^b

Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de caseína fue utilizada como valor relativo para el grupo de proteína de soya y soya grasa. Expresados como promedios \pm el error estándar de la media. n=3. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). a>b.

Determinación del tipo de ácidos grasos contenidos en el músculo esquelético.

De igual forma que en el modelo anterior se cuantificaron los ácidos grasos contenidos en el interior del músculo esquelético por medio de cromatografía de gases. Los animales alimentados con proteína de soya presentaron 11.7% menos en el contenido de ácido palmítico (C16:0) y un 8.2% más en el contenido de ácido oléico. En cuanto a los demás ácidos grasos no se encontró diferencia significativa. Gráfica 22.



Gráfica 22. Efecto del consumo de proteína de soya en el contenido de ácidos grasos en músculo de ratas ratas Zucker fa/fa modelo GO. Los valores representan la media \pm del error estándar de los ácidos grasos expresados como porcentaje del total presentada por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=5. No se encontraron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La soya posee una proteína de buena calidad nutrimental que es capaz de cubrir los requerimientos proteicos y el balance de nitrógeno en niños, adolescentes y adultos;⁵² una vez digerida, la proteína de soya brinda el 100% de los aminoácidos indispensables requeridos para la fase de crecimiento, a diferencia de otras proteínas vegetales como la zeína que es deficiente en lisina lo que ocasiona una disminución en la velocidad de crecimiento en los animales que la consumen.⁵³ En el presente estudio se observó que independientemente del modelo de obesidad (obesidad inducida por dieta o obesidad genética) los seis grupos de investigación, presentaron la misma curva de crecimiento durante los primeros 30 días lo que indica que los animales se comportan de igual manera durante la fase de crecimiento independientemente del tipo de proteína que reciben, además de que muestra que la proteína de soya cubre los requerimientos para que un organismo pueda crecer de forma correcta.

Durante la fase adulta en el modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) la ratas alimentadas con proteína de soya alcanzaron una menor ganancia de peso independientemente de la cantidad de lípidos de la dieta. Para conocer si las diferencias encontradas en la ganancia de peso se debían a cambios en el consumo de alimento, se determinó la cantidad de alimento ingerida, encontrándose un menor consumo de alimento en los animales que consumieron las dietas altas en lípidos. Debido a que el aporte energético que proporcionaba las dietas altas en lípidos era de 5 kcal/g comparadas con las dietas con un contenido normal de lípidos que aportaban 4 kcal/g, se calculó el consumo energético, indicando que todos los animales independientemente del tipo de proteína y la cantidad de lípidos recibida ingirieron la misma cantidad de energía.

En la fase adulta del modelo de obesidad genética (GO) la ganancia de peso entre los dos grupos fue igual sin existir diferencia significativa hasta el día 140 de tratamiento. Sin embargo, a partir del día 150, los animales alimentados con caseína perdieron peso, mientras que los alimentados con proteína de soya tuvieron una ganancia de peso continua hasta el final del tratamiento. La disminución en el peso de los animales alimentados con caseína se pudo deber posiblemente a un mayor deterioro físico acompañado de irritación en la piel, provocando pérdida de pelo y desprendimiento de escamas.

Dentro de las características que se presentan en el desarrollo de la obesidad se encuentran alteraciones en las concentraciones plasmáticas de algunos metabolitos, como los triglicéridos, el colesterol y la glucosa.⁵⁴ En los dos modelos DIO y GO estudiados, se pudo confirmar el efecto hipolipidémico que presenta el consumo de proteína de soya, se observó una disminución considerable en los niveles de colesterol y triglicéridos, independientemente de la cantidad de lípidos en la dieta (gráficas 5, 6, 16 y 17). El mecanismo por el cual el consumo del aislado de proteína soya ejerce este efecto aún no ha sido completamente establecido. Actualmente se considera que el balance entre la ingestión y excreción de colesterol resulta de la absorción en el ileon por el transportador NCP1 y su excreción por los transportadores ABCG5/ABCG8. Por otro lado la incretina FGF15 disminuye la síntesis de ácidos biliares en el hígado reprimiendo la expresión del gen CYP7A (enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares). La recirculación de los ácidos biliares ocurre mediante el transportador de ácidos biliares BSEP en el hígado y los ácidos biliares son reabsorbidos y transportados por IBAT e IBAP en el enterocito respectivamente. Estudios en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición indican que los animales que consumen proteína de soya muestran un incremento en la expresión de NCP1 así como de ABCG5/ABCG8 lo que indica un incremento en la absorción de colesterol. También se observó una reducción en la expresión de FGF15 y un incremento en la expresión de CYP7A junto con un incremento en la expresión de BSEP y una disminución en la expresión génica de IBAT (transportador de ácidos biliares iliacos) e IBAP (proteína de unión de ácidos biliares iliacos) indicando con los resultados anteriores que el consumo de proteína de soya incrementa la síntesis y excreción fecal de ácidos biliares.^{55, 56} Por otro lado Lovati y col.⁵⁶ encontraron una mayor eliminación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad por los hepatocitos, esto último siendo responsable de la disminución de los triacilglicéridos plasmáticos, lo cual se asocia a una mayor expresión del receptor para LDL.

Los valores de glucosa en suero en el modelo DIO, no presentaron cambios independientemente del tipo de proteína y la cantidad de lípidos recibidos; sin embargo, el aumento en los niveles de glucosa en los animales que mantuvieron una mayor ingestión de lípidos sugiere la aparición de resistencia a la insulina. Contrario a los resultados en DIO,

en el modelo de GO la proteína de soya indujo una disminución de la concentración de glucosa sin modificar las concentraciones de insulina.

En el presente trabajo los valores de insulina plasmática en los modelos DIO y GO, no presentaron diferencias significativas por el tipo de proteína recibida. Se ha demostrado que la resistencia a la insulina puede estar ocasionada por la acumulación de ácidos grasos en el músculo esquelético.^{57, 58} Para conocer el acúmulo de lípidos en el interior del miocito se realizaron cortes histológicos. Uno de los hechos mas importantes que se notan al examinar los patrones de la tinción de rojo oleoso en músculo esquelético, es la heterogeneidad que existe de la tinción de lípidos de las fibras musculares la cual esta relacionada con el tipo de fibras, debido a que las fibras musculares difieren en su contenido de lípidos así como a la sensibilidad a la insulina.⁵⁹ En general las fibras tipo I o *slow-twitch* u oxidativas (fibras de resistencia) contienen más lípidos que las fibras tipo II que son menos sensibles a la insulina. En pacientes obesos se observa una disminución de fibras tipo I (oxidativas) en el músculo *vastus lateralis* y un incremento en las fibras tipo II, a diferencia de personas delgadas donde se observa un mayor contenido de fibras tipo I que fibras tipo II y en cuanto al contenido de lípidos este se incrementa en pacientes obesos comparado con pacientes delgados. Interesantemente el incremento en el contenido de lípidos en los obesos parece ser independiente del tipo de fibras.⁶⁰ En el presente estudio, se observó que en ambos modelos de obesidad existe mayor concentración de lípidos en los miocitos de los animales alimentados con caseína comparados con los alimentados con proteína de soya. El acúmulo de lípidos resulta mucho mayor en el modelo GO debido a la ausencia del receptor de leptina. El acúmulo de lípidos en el miocito (lipotoxicidad) se debe a la pérdida en la acción antiestatótica de la leptina, que puede deberse a la resistencia a la acción de esta hormona o a la mutación del receptor como en la obesidad inducida por dieta o en la obesidad génica, respectivamente. Al encontrar menor acumulación de lípidos al interior del miocito en los animales alimentados con proteína de soya se investigó el papel de la leptina sobre este efecto.

Los efectos antiestatóticos de la leptina en músculo esquelético se han relacionado con la activación de AMPK por medio de cambios en la relación AMP/ATP⁶¹ lo que permite la fosforilación en la Thr172 por medio de la enzima cinasa serina/treonina LKB1. Si la concentración de AMP se eleva y el AMP se encuentra unido a la subunidad γ de

AMPK, ocasionará un cambio conformacional en la subunidad α , lo que permitirá que el residuo Thr172 de la enzima quede expuesto y pueda ser fosforilado⁶² y en consecuencia activada por la enzima LKB1⁶³. En caso de que una molécula de ATP se una en los dominios Bateman, no se llevará a cabo el cambio conformacional y la enzima permanecerá en su forma inactiva.

Recientemente se encontró en mioblastos C2C12 de ratón que la leptina produce una activación bifásica de la subunidad α AMPK⁶⁴. En principio activa a la subunidad α -2AMPK que contiene a las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 1$ lo que resulta en la estimulación de la oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación de ACC y MCD abatiendo la concentración de la malonil CoA, que inicia la síntesis de ácidos grasos y que es un inhibidor de la proteína CPT1 encargada de transportar a los ácidos grasos activados a la mitocondria para poder ser oxidados. El efecto posterior de la leptina, que hace que la oxidación de los lípidos trascienda, se debe a que $\alpha 2$ AMPK es translocada al núcleo gracias a la señal de localización nuclear (NLS) que posee dentro de la subunidad $\alpha 2$. Una vez en el núcleo la $\alpha 2$ AMPK induce la transcripción de PPAR α . La activación de AMPK permite el incremento de la proteína desacoplante 3 (UCP3) pero el mecanismo por el cual UCP3 es regulado por AMPK aún se desconoce. Por otro lado Acin et al⁶⁵ identificaron un elemento de respuesta para los PPARs en el gen de UCP. Una posibilidad para el incremento de la UCP3 en músculo esquelético mediada por AMPK podría deberse a que AMPK aumente la transcripción de PPAR. Pero esto es sólo una hipótesis, aún falta comprobar si la leptina a través de AMPK también incrementa la transcripción de PPAR δ y que este factor incremente la transcripción de UCP3. Finalmente, se ha reportado que en ratas obesas resistentes a la insulina existe una disminución de la expresión y de la fosforilación de la AMPK y una disminución de la expresión de la enzima LKB1. En el modelo DIO se observó que los niveles plasmáticos de leptina mostraban una correlación importante con el peso corporal ($R^2 = 0.8526$). Se observó que la ganancia de peso fue menor en los animales alimentados con proteína de soya y esto se asocia significativamente con una menor concentración de leptina en suero. Se ha demostrado que la obesidad así como el consumo de dietas altas en lípidos, se relacionan con hiperleptinemia lo que se ha asociado con la resistencia a la leptina⁶⁶. Debido a que los animales alimentados con proteína de soya mostraron concentraciones menores de leptina comparado con los animales que

consumieron caseína, independientemente del contenido de lípidos en la dieta, se observó un aumento en la fosforilación de AMPK en los animales alimentados con soya, lo que se asocia con una mejor funcionalidad de la leptina. Estos animales presentaron un incremento significativo en las expresiones génicas de MCD, CPT1, PPAR δ y UCP3. Lo anterior indicaría que la proteína de soya no permite el desarrollo de resistencia a la leptina, ocasionando que la leptina pueda activar a la AMPK, dando como resultado un incremento en la oxidación de lípidos mediada por AMPK.

Por otra parte, en el modelo DIO se observó un incremento en la expresión génica de GLUT4 en los animales alimentados con proteína de soya independientemente del contenido de lípidos en la dieta. El incremento en la expresión de GLUT4 en músculo esquelético podría contribuir de forma importante a disminuir o prevenir la resistencia a la insulina. Es importante considerar que el músculo esquelético en reposo es el responsable del 20% del metabolismo de glucosa, pero bajo condiciones de estimulación por insulina es el responsable del 80% de la captación de glucosa.⁶⁷ Por lo tanto, el músculo es uno de los tejidos que más participa en la resistencia a la insulina en la diabetes de tipo 2. En pacientes diabéticos, la glucosa captada en respuesta a insulina es un 30-40% menor que en individuos no diabéticos, y un 90% de esta disminución se debe a una menor captación por tejidos periféricos, principalmente el músculo. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético se define como un defecto en la acción de la insulina sobre la entrada de glucosa.³⁹ Estudios previos sugieren que una disminución en la actividad de la AMPK pudiera ser otro factor involucrado en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo. La AMPK podría disminuir la resistencia a la insulina a través de dos mecanismos. El primer mecanismo es el aumento de la fosforilación de IRS1 lo cual incrementa la señalización de la insulina. El segundo mecanismo es a través de la fosforilación de la proteína AS160 por la AMPK, sugiriendo que AS160 puede estar involucrada en la translocación de GLUT4 de forma dependiente de la AMPK y de forma independiente de insulina.⁶⁸ Otro de los posibles mecanismos por los cuales la AMPK podría incrementar GLUT4 es a través del incremento en su transcripción.⁶⁹

Por otro lado la AMPK activa, puede reprimir a nivel transcripcional los genes involucrados en la síntesis de lípidos controlados por el factor de transcripción SREBP1c, el mecanismo por el cual AMPK reprime la transcripción de SREBP no se ha descrito.

Estudios en animales de laboratorio han demostrado que la sobreexpresión SREBP1c en hígado así como el consumo de dietas altas en lípidos ocasionan acúmulos de triglicéridos y colesterol en el hepatocito, así como el incremento de la expresión de genes como HMG CoA, ACC, FAS, SCD1 lo que ocasiona un incremento en la síntesis de colesterol y ácidos grasos en el hígado ocasionando esteatosis hepática.^{70, 71} El consumo de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en animales indican una reducción en los niveles de expresión de SREBP⁷², debido a que aceleran la degradación de SREBP1c. Por otro lado pacientes obesos muestran una baja tasa de oxidación de ácidos grasos, e incremento en la síntesis de triglicéridos en el músculo esquelético asociados con un incremento en la expresión y la actividad de SCD1.⁷³ Los animales SCD^{-/-} presentan una menor ganancia de peso, valores bajos de insulina y leptina en plasma, reducción en la cantidad de tejido adiposo, no presentan resistencia a la insulina y tienen un mayor gasto energético.⁷⁴ Estudios previos en el laboratorio indican que el consumo de proteína de soya en ratas con obesidad inducida por dieta reduce significativamente el acúmulo de triglicéridos y colesterol en el hígado, disminuyendo de esta manera la lipotoxicidad. Estos cambios en el hígado se han asociado a una menor expresión del factor de transcripción SREBP-1 y de sus genes blanco como es el de la sintasa de los ácidos grasos. Esta disminución en la síntesis de ácidos grasos en hígado se acompaña de una disminución en la concentración de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).⁷⁵

En el presente estudio, en el modelo DIO se observó en músculo esquelético una disminución significativa en la expresión génica de SREBP1c así como de SCD1 en los animales alimentados con proteína de soya a pesar del consumo alto de lípidos, indicando una disminución en la síntesis de lípidos mediada en parte por SREBP1c y su gen blanco SCD1. La disminución en la síntesis de lípidos se asoció a una disminución en la acumulación de triglicéridos en el interior del músculo esquelético.

La forma en la cual se relacionan los lípidos intramusculares con la resistencia a la insulina aún está en debate. Se ha propuesto que el incremento en el contenido de triglicéridos interfiere en la señalización de insulina, impidiendo la activación de PI3K mediada por insulina, y en consecuencia se observa menor translocación de la proteína encargada de transportar la glucosa al interior de la célula (GLUT4).⁷⁶ Por otro lado, se han relacionado a los ácidos grasos de cadena larga (LCA) con la resistencia a la insulina.⁷⁷

Holland y col.⁷⁸ han demostrado que los ácidos grasos libres saturados pero no los ácidos grasos monoinsaturados inhiben a la PKB también llamada Akt. Los ácidos grasos saturados inducen la acumulación de ceramidas y diacilglicerol (DAG). El acúmulo de ceramidas y de DAG se ha implicado en la resistencia a la insulina debido a que inhiben la señalización de insulina, a través de la activación de PKC ζ . Esta cinasa inhibe la translocación de Akt a la membrana e inhibiendo la unión de los fosfoinositidos al dominio PH de Akt a través de la fosforilación en el residuo Thr 34 del dominio PH (dominio de homología con plequestrina) de Akt. Esta fosforilación ocasiona la pérdida del cambio conformacional en la Akt, ocasionando que no se expongan los sitios de regulación Thr 308 y Ser 473 fosforilados posteriormente por PDK1.⁷⁹ En sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 2 se observa un incremento en el contenido lipídico en músculo esquelético comparado con sujetos delgados no diabéticos. Una de las características de la resistencia a la insulina es la disminución en la capacidad oxidativa de los lípidos para ser utilizados como fuente de energía. El consumo de proteína de soya en el modelo DIO, disminuyó el acúmulo de triglicéridos en el interior del músculo esquelético, sin presentar diferencia en el patrón de ácidos grasos. Un menor acúmulo de triglicéridos se ha relacionado con un adecuado funcionamiento de la leptina. En el modelo DIO observamos que las ratas no presentaron resistencia a la acción de la leptina debido a que no desarrollaron hiperleptinemia. Esto sugiere que la leptina llevó a cabo sus acciones a través de la activación de AMPK y en consecuencia incrementó la expresión de genes involucrados en la oxidación de lípidos y la disminución de la expresión de genes involucrados en la síntesis de lípidos. Por otro lado, estudios previos en el laboratorio han demostrado que el consumo de proteína de soya en una dieta alta en lípidos incrementa la sensibilidad a la insulina a través de la reducción en la secreción de esta hormona,⁸⁰ lo que concuerda con los resultados de este trabajo.

A diferencia del modelo DIO donde la soya no permitió el desarrollo de resistencia a la leptina. Los animales del modelo GO desarrollan hiperleptinemia independientemente del tipo de dieta. Esto se debe a que las ratas Zucker obesas (fa/fa) tienen una mutación en el receptor de leptina donde existe una sustitución del residuo glutamina-269 por prolina. Esta mutación ocasiona que el efecto antiestatístico de la leptina no pueda llevarse a cabo. De tal forma que el mecanismo planteado anteriormente para la activación de AMPK

mediado por leptina no ocurre para el modelo GO. Interesantemente, una de las observaciones que más llamó la atención en el modelo GO es el aumento en la fosforilación de AMPK que se observó en los animales que consumieron proteína de soya, el cual no se observa cuando se compara con el grupo alimentado con caseína. Por lo tanto, la leptina no es la única adipocitocina que puede modular la actividad de la AMPK. De hecho se ha descrito que la adiponectina puede regular la actividad de la AMPK,⁸¹ aunque aún no se ha descrito el mecanismo.

La adiponectina es una hormona secretada por el tejido adiposo. Existen dos tipos, la forma globular y la forma larga que se observa principalmente en plasma. Se han identificado dos receptores para adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2. El receptor AdipoR1 tiene un patrón de expresión ubicuo pero es más abundante en músculo esquelético y responde a la forma globular, mientras que el receptor AdipoR2 es más abundante en hígado y responde a la forma larga de adiponectina.⁸² La expresión de ambos receptores está disminuida en músculo esquelético y tejido adiposo en ratones ob/ob lo que se ha relacionado con la reducción en la sensibilidad de la adiponectina.⁸³ En ratones obesos y diabéticos, como en humanos obesos la expresión de adiponectina se encuentra disminuida.^{84, 85, 86}

Al igual que la leptina, la adiponectina mediante sus receptores AdipoR1 y AdipoR2 puede incrementar la sensibilización de la insulina *in vivo* reduciendo el acúmulo de triglicéridos en el músculo esquelético. Este efecto se ha relacionado a un incremento en la expresión de genes involucrados en el transporte de ácidos grasos y en la beta oxidación mediada por PPAR α ⁸⁷ y por la forma activa de AMPK.⁸⁸ En ratones ob/ob la activación de AMPK mediada por adiponectina está disminuida. El mecanismo por el cual la adiponectina activa a AMPK en el músculo esquelético parece ser común al de la leptina. Es posible que los efectos observados en el modelo GO en los animales alimentados con proteína de soya, sobre la disminución de la concentración de ácido palmítico en el interior del miocito, así como del incremento en la expresión de genes involucrados en la oxidación de lípidos (MCD, PPAR δ , CPT1 y UCP3), en el transporte de glucosa (GLUT4) y de la disminución de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de lípidos (SREBP1c y SCD1) pudiera deberse a que la proteína de soya incrementó la sensibilidad del receptor de adiponectina Adipo R1 en músculo esquelético a través de la fosforilación de AMPK. En

ratas Zucker (fa/fa) comparados con ratas Zucker delgadas, las ratas Zucker fa/fa presentan niveles elevados de adiponectina en plasma pero niveles de expresión del receptor AdipoR1 disminuidos en hígado, tejido adiposo pardo y blanco, sin encontrar diferencias significativas en músculo esquelético. Indicando que las diferencias existentes entre las ratas Zucker fa/fa y las Zucker delgadas no se debe a una disminución en las concentraciones de adiponectina, sino a una disminución en la sensibilidad a la hormona.⁸⁹ Los resultados de este trabajo en conjunto establecen que la proteína de la soya incrementa la actividad de AMPK en músculo esquelético por un mecanismo independiente de leptina. Este aumento en la actividad de AMPK se asocia con un aumento en la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos y de transporte de glucosa y a una disminución en la expresión de síntesis de ácidos grasos. Como consecuencia no hubo una acumulación de lípidos en el músculo esquelético, lo que se relaciona con una mejora en la sensibilidad de la insulina.

RESUMEN DE RESULTADOS

El consumo de proteína de soya en la obesidad inducida por dieta:

- Permitió el adecuado crecimiento de los animales con una ganancia de peso menor con respecto a los grupos de caseína.
- Indujo un efecto hipolipidémico sobre las concentraciones de triglicéridos y colesterol en sangre.
- Disminuyó el acúmulo de lípidos en el interior del miocito sin cambios significativos en el patrón de ácidos grasos.
- Aumentó la relación de pT172AMPK/AMPK total.
- Indujo un incremento significativo en la expresión génica de MCD, CPT1, PPAR δ , UCP3 y GLUT4, así como una disminución significativa en la expresión de SREBP1c y SCD1.

El consumo de proteína de soya en la obesidad genética:

- Permitió el adecuado crecimiento de los animales y menor deterioro físico.
- Indujo un efecto hipolipidémico e hipoglucémico.
- Disminuyó el acúmulo de lípidos con una disminución significativa en la concentración de ácido palmítico.
- Aumentó relación de pT172AMPK/AMPK.
- Indujo un incremento significativo en la expresión génica de MCD, CPT1, PPAR δ , UCP3 y GLUT4, así como una disminución significativa en la expresión de SREBP1c y SCD1.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo establecen que la proteína de la soya incrementa la actividad de AMPK en músculo esquelético por un mecanismo independiente de leptina. Este aumento en la actividad de AMPK se asocia con un aumento en la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos y de transporte de glucosa y a una disminución en la expresión de síntesis de ácidos grasos. Como consecuencia una menor acumulación de lípidos en el músculo esquelético, lo que se relaciona con una mejora en la sensibilidad de la insulina. Aún queda por establecer a través de que mecanismo la proteína de soya estimula la activación de AMPK.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Everhart JE, Pettit DJ, Bennetm PH. Duration of obesity increase the incidence of NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 235-40.
- ² Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-43.
- ³ Zimmet P, Alberti KGM, Shaw J. Global and societal implication of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-819.
- ⁴ Aguilar CS. La obesidad en la pobreza. Un nuevo reto para la salud pública. *Rev Invest Clin Mex* 2001; 52 :469-470.
- ⁵ Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473-481.
- ⁶ Petersen FK, Shulman G. Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle. *J R Soc Med* 2002; 95 Suppl 42 : 8-13.
- ⁷ Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger R. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997; 273: E708-E713.
- ⁸ Ellis B, Poynten AN, Lowy A, Furler S, Chisholm D, Kraegen E, Cooney G. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E554-E560.
- ⁹ Schmitz-Peiffer C, Oakes ND, Browne CL, Kraegen E.W, Biden TJ. Reversal of chronic alterations of skeletal muscle protein kinase C from fat-fed rats by BRL-49653. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997; 273: E915–E921.
- ¹⁰ Ye J.-M, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen, EW. Peroxisome proliferator–activated receptor (PPAR)-{alpha} activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat–fed rats: comparison with PPAR-{gamma} activation. *Diabetes* 2001; 50: 411–417.
- ¹¹ Kelly D. Goodpaster B. Skeletal muscle triglyceride. *Diabetes Care* 2001; 24: 933-41.
- ¹² Unger R, Orci L. Disease of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 2001;15: 312-21.
- ¹³ Sima A, Shafrir E. *Animal models of diabetes: A Primer*. 2001. Harwood Academic Publishers. ISBN:90-5823-096-1.

- ¹⁴ Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K. Substitution at codon 269 (Glutamine--- Proline) of the leptin receptor (Ob-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224: 597-604.
- ¹⁵ Coleman DL. Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; 14: 141-148.
- ¹⁶ Unger R, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes* 2000; 24, Suppl 4: S28-S32.
- ¹⁷ Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 415: 339-43.
- ¹⁸ Adams J, Chen ZP, Van Denderen BJ, Morton CJ, Parker MW, Witters LA, Stapleton D, Kemp BE. Intracellular control of AMPK via the gamma subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci* 2004; 13: 155-65.
- ¹⁹ Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003; 13: 2004-08.
- ²⁰ Kola B, Boscaro M, Rutter GA, Grossman AB, Korbonits M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 205-15.
- ²¹ Saha A, Schwarsin A, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, Ruderman N. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 2000; 275: 24279–24283.
- ²² Kraegen E, Saha A, Preston E, Wilks D, Hoy A, Cooney G, Ruderman N. Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:471-479.
- ²³ Kemp B, Stapleton D, Campbell D, Chen Z, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams J, Katsis F, van Denderen B, Jennings I, Iseli T, Michell B, Witters L. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *AMPK 2002 – 2nd International Meeting on AMP-activated Protein Kinase* Edited by D. G. Hardie (Dundee) and D. Carling.

- ²⁴ Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear L, Moller D. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167-1174.
- ²⁵ Horton J, Goldstein J, Brown M. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-1131.
- ²⁶ Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 838-845.
- ²⁷ McPherson R, Gauthier A. Molecular regulation of SREBP function: the insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 201-211.
- ²⁸ Jump, D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 155-164.
- ²⁹ Osborn TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 2000; 275: 32379-32382.
- ³⁰ Ntambi, J. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res* 1995; 34:139-150.
- ³¹ Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie G, Friedman J, Ntambi J. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Soc USA* 2004; 101: 6409-6414.
- ³² Armstrong M, Towle H. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha mediated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1197-E1204.
- ³³ Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu R, Ham J, Kang H, Evans R. Peroxisome -proliferator activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170.
- ³⁴ Rosen E, Spiegelman B. PPAR gamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation and cell growth. *J Biol Chem* 2001; 276: 37731-34.
- ³⁵ Margareto J, Marti A, Martínez A. Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARg. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 130-137.

- ³⁶ Jezek P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins-UCP. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1190-1204.
- ³⁷ Rousset S, Alves Guerra M, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier A-M, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 2004; 53: S130-5.
- ³⁸ Boss O, Samec S, Kühne F, Bijlenga P, Assimacopoulos J, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulates by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem* 1998; 273: 5-8.
- ³⁹ Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 2000; 345: 161:179.
- ⁴⁰ Cortright RN, Dohm GL. Mechanisms by which insulin and muscle contraction stimulate glucose transport. *Can J Appl Physiol* 1997; 22: 519–530.
- ⁴¹ Saltiel AR, Khan R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
- ⁴² Thong S.L. F, Bilan P, Klip A. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-Activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 2007; 56: 414-423.
- ⁴³ De Carvalho Papa P, Vargas AM, da Silva JLT, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. *Life Sci* 2002; 71: 1917–1928.
- ⁴⁴ Winder WW. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91:1017-1028.
- ⁴⁵ Nagasawa A. Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res* 2002; 34: 635-9.
- ⁴⁶ Tovar AR, Murguía F, Cruz C, Hernández-Pando R, Aguilar-Salinas CA, Pedraza-Chaverri J, Correa-Rotter R, Torres N. A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome. *J Nutr* 2002; 132: 2562-9.
- ⁴⁷ Anderson J, Johnstone B, Cook-Newell M. Meta analysis of the effects of soy protein intake on serun lipids. *N Engl J Med* 1995; 333: 276-82.
- ⁴⁸ Nadler S, Attie A. Please pass the chips: Genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 2001; 131: 2078-81.

- ⁴⁹ Adams MS, Goleen 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.
- ⁵⁰ Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
- ⁵¹ Kraegen E, Saha A, Preston E, Wilks D, Hoy A, Cooney G, Ruderman N. Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol* 2006; 290:471-479.
- ⁵² Young V.R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J Am Diet Assoc* 1991; 91: 828-835.
- ⁵³ Tovar A, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E1016-E1022.
- ⁵⁴ Kopelman P. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643.
- ⁵⁵ Granados O, Torres N, Tovar A. Soy protein regulates cholesterol homeostasis through enhanced bile acid synthesis. 2007 FASEB Poster.
- ⁵⁶ Van der Meer R de Vries HT, Van Tintelen GT. The phosphorylation state of casein and the species-dependency of its hypercholesterolemic effect. *Br J Nutr* 1988; 59: 467-473.
- ⁵⁷ Lovati MR, Manzoni C, Canavesi A, Sirtori M, Vaccarino V, Marchi M, Gaddi G, Sirtori CR. Soybean protein diet increase low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. *J Clin Invest* 1987; 80: 1498:1502.
- ⁵⁸ Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E. Association of increased intramyocelulluar lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetc subjects. *Diabetes* 1999; 48: 1113-1119.
- ⁵⁹ Chico A, D'Alessandro M, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo Y. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are alterated in insulin resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* 2003; 133: 27-133.
- ⁶⁰ Kelly DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 325-46.

- ⁶¹ Malenfant P, Joanisse DR, Thériault R, Goodpaster BH, Kelley DE, Simoneau JA. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obes* 2001; 25: 1316–1321.
- ⁶² Orci L, Cook WS, Ravazzola M, Wang MY, Park BH, Montesano R, Unger RH. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2058-63.
- ⁶³ Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, K. BR, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 27879-87.
- ⁶⁴ Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 2003; 13: 2004-08.
- ⁶⁵ Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the α 2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4317–4327.
- ⁶⁶ Acín A, Rodriguez M, Rique H, Canet E, Boutin JA, Galizzi JP. Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 278-83.
- ⁶⁷ Steinberg G, Parolin M, Heigenhauser G, Dyck D. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E187–E192.
- ⁶⁸ Baron AD, Brechtel G, Wallace, P, Edelman SV. Rates and tissue sites of non-insulin and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol* 1988; 255, E769–E774.
- ⁶⁹ Thong S.L. F, Bilan P, Klip A. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, Protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* 2007; 56: 414-423.
- ⁷⁰ Winder WW. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91:1017-1028.

- ⁷¹ Shimano H, Horton J, Hammer R, Shimomura I, Brown M, Goldstein J. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996; 98: 1575–1584.
- ⁷² Biddinger S, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi J, Kahn R. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2005; 54: 1314-1323.
- ⁷³ Jump, D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 155-164.
- ⁷⁴ Hulver M, Berggren J, Harper M, Miyazaki M, Ntambi J, Hoffman E, Thyfault J, Stevens R, Dohm L, Houmard J, Muoio D. Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2005; 2: 251-261.
- ⁷⁵ Ntambi J, Miyazaki M, Store J, Lan H, Kendzioriski C, Yandell B, Song Y, Cohen P, Friedman J, Attie A. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Soc USA* 2002; 99: 11482–11486.
- ⁷⁶ Ascencio A, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez F, Hernández-Pando R, Tovar A. Soy Protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr* 2004; 134: 522-9.
- ⁷⁷ Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:171–176.
- ⁷⁸ Ellis B, Poynten A, Lowy A, Furler S, Chisholm D, Kraegen E, Cooney G. Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E554-E560.
- ⁷⁹ Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev* 2007; 65: S39-46.
- ⁸⁰ Chavez J, Knotts T, Wang L, Li G, Dobrowsky R, Florant G, Summers S. A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278:10297–10303.
- ⁸¹ Noriega-López L, Tovar A, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillán-Doherty P, and Torres N, Pancreatic insulin secretion in rats fed soy protein high

fat diet depends on the interaction between amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem* 2007; 282: 20657-66.

⁸² Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007; 13: 332-9.

⁸³ Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423:762–769.

⁸⁴ Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279:30817–30822.

⁸⁵ Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271:10697–10703.

⁸⁶ Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 941–946.

⁸⁷ Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79–83.

⁸⁸ Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and

reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes* 2005; 54: 3358-70.

⁸⁹ Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8:1288–1295.

⁹⁰ Oana F, Takeda H, Hayakawa K and Matsuzawa A, Akahane S, Isasi M, Akahane M. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metab Clin Exp* 2005; 54: 995-1001.

ANEXO

Tabla 5. Ejemplo de cálculo de la expresión relativa en el modelo DIO, usando el equipo de PCR de tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems).

Muestra	Gen	Ct	Promedio Ct	Desv Std	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Expresión Relativa
Caseína	UCP3	25.1	25.25	0.09	1.22	0.00	1.00
Caseína	UCP3	25.3					
Caseína	UCP3	25.3					
Soya	UCP3	24.2	24.20	0.04	0.35	-0.87	1.83
Soya	UCP3	24.2					
Soya	UCP3	24.2					
CHF	UCP3	26.7	26.59	0.11	2.43	0.00	1.00
CHF	UCP3	26.5					
CHF	UCP3	26.6					
SHF	UCP3	25.7	25.77	0.07	1.69	-0.74	1.67
SHF	UCP3	25.8					
SHF	UCP3	25.8					
Caseína	Actina	23.8	24.02	0.18			
Caseína	Actina	24.1					
Caseína	Actina	24.2					
Soya	Actina	24.0	23.85	0.13			
Soya	Actina	23.9					
Soya	Actina	23.7					
CHF	Actina	24.2	24.16	0.05			
CHF	Actina	24.1					
CHF	Actina	24.2					
SHF	Actina	24.0	24.08	0.09			
SHF	Actina	24.1					
SHF	Actina	24.2					

El Ct (ciclo umbral o por su siglas en inglés *threshold cycle*) indica el ciclo en el cual se amplificó el gen en un umbral arbitrario. (Figura 3 y 4).

El ΔCt se obtiene por la diferencia en el ciclo umbral del gen problema y del gen constitutivo. Con el fin de obtener un valor normalizado del gen problema por el gen constitutivo. El ΔC se determinó por diferencia del promedio del Ct de UCP3 del promedio del Ct de la actina. Una vez hecha la normalización por Actina se procede a calcular el $\Delta\Delta Ct$.

El $\Delta\Delta Ct$ es la asignación del valor arbitrario de 1 al grupo que se considere control para posteriormente realizar la determinación de la abundancia relativa de los mRNA de los grupos de estudio. Para calcular el $\Delta\Delta Ct$ de los grupos de soya y soya grasa se asignó el valor arbitrario de 1 al grupo de caseína y caseína grasa respectivamente

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ del grupo control} - \Delta Ct \text{ del grupo estudio}$$

El cálculo de la expresión relativa se realizó elevando al cuadrado el $\Delta\Delta Ct$ de cada grupo

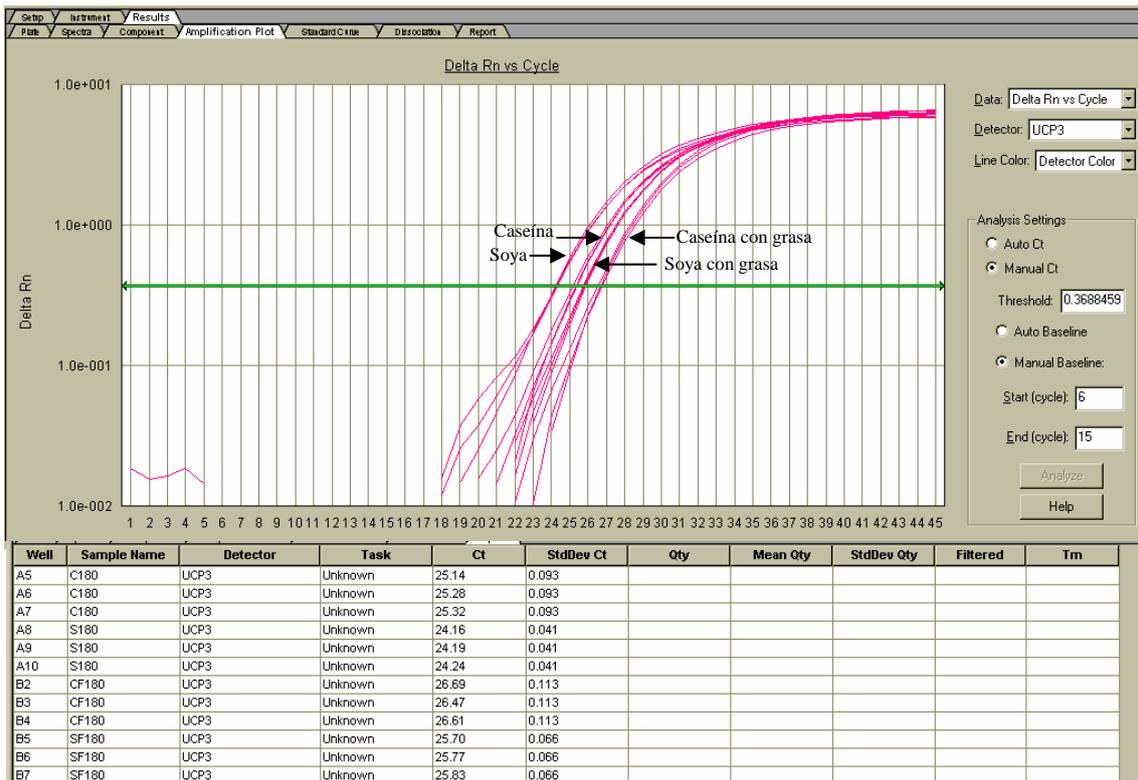


Fig 6. Curva de amplificación de UCP3 en el modelo DIO

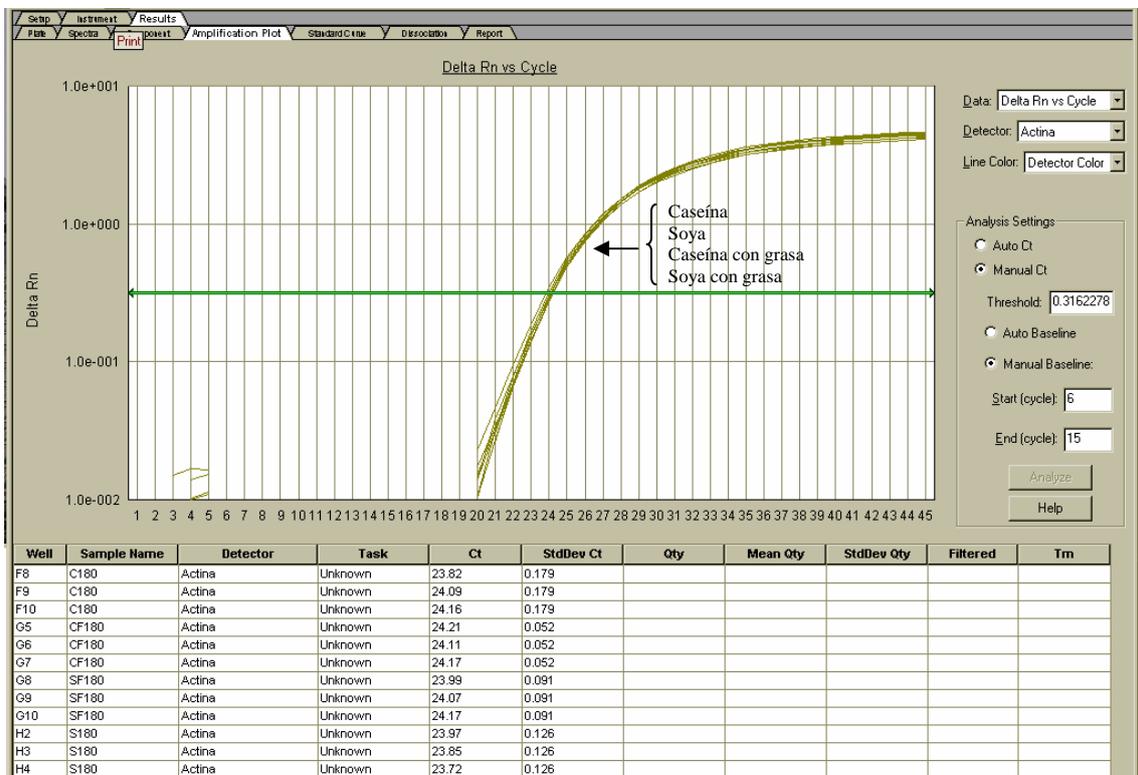


Fig 7. Curva de amplificación de actina como gen constitutivo

Tabla 6. Determinación de la abundancia relativa de mRNA de los diferentes genes, donde la expresión de los grupos de soya, soya grasa y caseína grasa se hizo relativa a la expresión del grupo de caseína.

	Caseína	Soya	Caseína grasa	Soya grasa
PPARδ	1.0 \pm 0.01 ^b	1.847 \pm 0.22 ^a	0.793 \pm 0.07 ^b	1.657 \pm 0.14 ^a
UCP3	1.0 \pm 0.01 ^b	1.537 \pm 0.07 ^a	0.413 \pm 0.003 ^d	0.713 \pm 0.03 ^c
CPT1	1.0 \pm 0.14 ^c	2.420 \pm 0.09 ^a	0.920 \pm 0.12 ^c	1.543 \pm 0.12 ^b
MCD	1.0 \pm 0.23 ^a	0.873 \pm 0.23 ^b	0.0343 \pm 0.07 ^b	2.027 \pm 0.49 ^a
GLUT4	1.0 \pm 0.15 ^b	2.693 \pm 0.49 ^{a,c}	1.577 \pm 0.33 ^{b,c}	3.170 \pm 0.49 ^a
SREBP1c	1.0 \pm 0.07 ^a	0.407 \pm 0.03 ^c	0.620 \pm 0.11 ^b	0.387 \pm 0.01 ^c
SCD1	1.0 \pm 0.07 ^b	0.628 \pm 0.17 ^{b,c}	4.944 \pm 0.99 ^a	0.225 \pm 0.02 ^{b,c}

Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de caseína y caseína grasa fueron utilizados valores relativos para los grupos de proteína de soya y soya grasa, respectivamente. Expresados como promedios \pm el error estándar de la media. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$) $a > b > c > d$
n=3