



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE
LOS ÁCIDOS BILIARES POR LA PROTEINA
DE SOYA A TRAVÉS DE LXR α .**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**MARCELA ALEJANDRA
GONZÁLEZ GRANILLO**

TUTOR: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

MÉXICO, D. F.

Octubre 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.

REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES POR LA PROTEÍNA DE SOYA A TRAVÉS DE LXR α .

RECONOCIMIENTOS:

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

Con apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al proyecto 62145 y C01-016/A-1.

Al Profesor Dr. Jan-Åke Gustafsson y Dr Knut R. Steffensen por su colaboración y por proporcionarnos los ratones LXR α ^{-/-} para la realización de este proyecto.

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

Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM.
Dr. Armando R. Tovar Palacio	Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ.

El Jurado de Exámen estuvo constituido por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM.
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM.
Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM.
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM.

Durante los estudios de maestría y estancia de posgrado en el Instituto Karolinska en el Departamento de Biociencias y Nutrición en Estocolmo, Suecia gocé de una beca otorgada por CONACYT (205651) para la realización de la presente.

**“DIOS CONCEDE LA VICTORIA
A LA CONSTANCIA”
Simón Bolívar.**

**“EL HOMBRE ENCUENTRA A DIOS DETRÁS DE
CADA PUERTA QUE LA CIENCIA LOGRA ABRIR”
Albert Einstein.**

**“LOS APASIONADOS SON LOS
PRIMOGENITOS DEL MUNDO”
José Martí.**

**Porque la pasión es el motor
en la conquista de cada sueño,
PASIÓN no me abandones en los retos
constantes que la vida me presente.**

DEDICATORIAS

A DIOS...

Por todos y cada uno de mis sueños,
por estar a mi lado a cada instante,
por todas las maravillosas personas y
grandiosos momentos que has puesto en mi camino.

Por enseñarme que la grandeza de la vida
se encuentra en las insignificancias de ella.

¡GRACIAS!

A mis guías e inspiración,
por fortalecer mis alas y
ayudarme a superar mis miedos
para conquistar mis sueños.

Gracias Papás.

Por su paciencia, comprensión, cariño y
forma muy particular de cada uno de enseñarme
que son los pequeños detalles lo que hacen la diferencia.
Los quiero mucho.

Ger, Vic y Rey.

Por tu apoyo incondicional y palabras de reto.
Te quiero y admiro.

Tío José Luis.

Por su amistad, sabias palabras, apoyo y
siempre estar ahí alentándome para llegar más lejos.

Ren, Ana, Pili, y Wen.

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de las personas
que han estado no solo en las buenas y las malas
sino que han podido compartir y alegrarse de mis éxitos.
Dios los bendiga por ser quienes son y ser tan especiales en mi vida!

¡¡GRACIAS AMIGOS!!

Dr. Armando Tovar y Dra. Nimbe Torres
Gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y sus enseñanzas.

Dr. Jan-Åke Gustafsson and Dr. Knut Steffensen
Tack så mycket för allt ni har gjort för mig. Tack vare er hjälp har min dröm gått i
uppfyllelse.

Por compartir su experiencia y actitud durante estos dos años...
... Estef, Tania, Nat, Gaby, Bere, Lilia, Paty, Martha, Claudia, Maru, Gris, Doña Gloria,
Memo, Iván, Isaac, Omar y Victor.

Agneta, Amena, Karin, Karolina, Lena, Lise-Lotte, Maria, Marion, Milica, Monica, Nina,
Paloma, Per, Thomas.

De sex månaderna var en av de bästa delarna med min Master degree.

A todos aquellos involucrados directa e indirectamente con este proyecto,
Porque el conquistar un sueño, involucra a más de un soñador...
... Gracias por permitirme hacer de este sueño una realidad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE GRÁFICAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE ESQUEMAS	4
NOMENCLATURA	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
• Síntesis y circulación entero-hepática de los ácidos biliares	9
- Síntesis de ácidos biliares	10
✓ Iniciación	11
✓ Modificación del anillo estructural	
✓ Oxidación de la cadena lateral	12
✓ Conjugación	
- Regulación de la biosíntesis de los ácidos biliares	14
• LXR	
- LXR y regulación de ácidos biliares	15
- LXR y regulación del transporte reverso del colesterol	17
- LXR y síntesis de ácidos biliares	18
Concentración hepática de ácidos biliares	19
• FXR	
- FXR y regulación del transporte de ácidos biliares	20
ANTECEDENTES	21
• Soya	
- Soya y lípidos plasmáticos	22
- Efectos del consumo de soya en la salud	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
• Objetivo general	
• Objetivos específicos	
METODOLOGÍA	27
• Diagrama de bloques	27, 28
• Poblaciones de estudio	29
• Diseño del estudio	29
- Tipo de estudio	
- Selección de la muestra	
✓ Criterios de inclusión	
✓ Criterios de exclusión	
✓ Criterios de eliminación	
- Tamaño de la muestra	29
- Variables	
✓ Dependientes	30

✓ Independientes	
- Preparación de las dietas	30
• MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
- Histologías	
✓ Tinciones histológicas	
✓ Hematoxilina y eosina	
✓ Tinción de PAS (ácidos periódico de Schiff)	32
✓ Rojo oleoso en propilen-glicol	
- Extracción de lípidos y ácidos biliares	33
✓ Método de Folch	
- Cromatografía de gases	34
- Parámetros bioquímicos	35
✓ Técnica glucómetro YSI2700	
✓ Método colorimétrico enzimático	36
✓ Sistema luminex	
- Extracción de RNA TOTAL	38
✓ Determinación de la expresión génica por PCR tiempo real	
- Ensayos de la actividad de la luciferasa.	42
✓ Transfección de células eucariotas	
ASPECTOS ÉTICOS	44
ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE DATOS	44
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	75
PERPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Rutas clásica y ácida de la biosíntesis de los ácidos biliares	13
Figura 2.	Oxisteroles producidos a partir del colesterol por reacciones de oxigenación	15
Figura 3.	Gráficas de las ratas ZDF alimentadas con soya o caseína	24
Figura 4.	Amplificación de un segmento de DNA por medio de la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)	40
Figura 5.	Paneles de los hígados representativos de los ocho grupos	57
Figura 6.	Histologías de los hígados por hematoxilina y eosina de los ratones mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	58
Figura 7.	Histologías de los hígados por hematoxilina y eosina de los ratones silvestres	59
Figura 8.	Histologías de los hígados por PAS de los ratones mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	60
Figura 9.	Histologías de los hígados por PAS de los ratones silvestres.	61
Figura 10.	Histologías de los hígados por rojo oleoso de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	62

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Ganancia de peso de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	45
Gráfica 2.	Peso de los hígados de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	46
Gráfica 3.	Concentración de glucosas séricas de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	47
Gráfica 4.	Concentración de triacilglicéridos séricos de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	48
Gráfica 5.	Concentración de colesterol sérico de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	49
Gráfica 6.	Concentración de insulina sérica de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	50
Gráfica 7.	Concentración de glucagon sérico de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	50
Gráfica 8.	Relación insulina-glucagon sérico de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	51
Gráfica 9.	Concentración de leptina sérica de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	52
Gráfica 10,11, 12, 13.	Expresión relativa del mRNA de SREBP2, SREBP1c, SCD1, FAS de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	53
Gráfica 14, 15, 16.	Expresión relativa del mRNA de ABC1, ABCG5, ABCG8 de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	54
Gráfica 17, 18, 19, 20, 21.	Expresión relativa del mRNA de FXR, CYP27, SHP, CYP7A1, BSEP de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	55, 56
Gráfica 22.	Concentración de colesterol hepático de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	63
Gráfica 23.	Concentración de triacilglicéridos hepáticos de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$.	64

Gráfica 24, 25, 26, 27.	Tasa de ácidos grasos libres en tejido hepático de los ratones silvestres y mutados LXR $\alpha^{-/-}$.	65
Gráfica 28(A), 28(B), 29.	Ácidos biliares en la vesícula biliar por grupo, bilis total en vesícula biliar y esteroides neutros de los ratones silvestres y mutados LXR $\alpha^{-/-}$.	66
Gráfica 30, 31, 32, 33.	Actividad del ensayo de luciferasa de curva de concentración de las isoflavonas.	67, 68
Gráfica 32, 33, 34.	Actividad del ensayo de luciferasa del patrón de aminoácidos de la proteína de soya y la caseína	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Contenido de nutrimentos en 100 g del aislado de la proteína soya	21
Tabla 2.	Contenido de la dieta control y experimental.	30
Tabla 3.	Patrón de aminoácidos séricos de la caseína y del aislado de la proteína de soya.	43
Tabla 4.	Porcentaje del peso del hígado (g) / el peso corporal (g) de los ratones silvestres y mutados LXR $\alpha^{-/-}$.	46
Tabla 5.	Valores de la tasa de ácidos grasos libres en tejido hepático de los ratones silvestres y mutados LXR $\alpha^{-/-}$.	65

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Circulación entero-hepática del colesterol y ácidos biliares	10
Esquema 2.	Mecanismos de acción de LXR α .	21

NOMENCLATURA

ABC (A1, G5, G8)	Cassettes transportadores de membrana unidos a ATP (A1, G5, G8).
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
BA	Ácidos biliares
BSEP	Bomba exportadora de los ácidos biliares (bile salt export pump)
C ₂₇ 3β-HSD	3β-hidroxi-Δ ⁵ -C ₂₇ -esteroide oxidoreductasa
CA	Ácido cólico (cholic acid)
CDCA	Ácido quenodeoxicólico (chenodeoxycholic acid)
CPT II	Carnitina palmitoil transferasa II
CYP3A	Citocromo P450 3 ^a
CYP7A1	Colesterol 7α-hidroxilasa (cytochrome P450 cholesterol 7α-hydroxylase)
CYP27A1	27-hidroxicolesterol-7α-hidroxilasa
FAS	Ácido grasos sintetasa
FXR	Receptor X farnesoide
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (high density lipoproteins)
IBABP	Ileal bile acid binding protein
I-BAT	Transportador iliaco de ácidos biliares (ileal bile acid transporter)
Insig	Insulin-induced gene
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins)
LRH-1	Receptor homólogo 1 del hígado (liver receptor homolog 1)
LXR	Receptor X del hígado
ME	Enzima málica
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero (Messenger Ribonucleic Acid)
NTCP	Transportador basolateral de BA (Na ⁺ taurocholate cotransporter polypeptide)
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos (phospholipid transfer protein)
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa (phenylethanolamine N-methyltransferase)
PPAR _{α, γ}	Peroxisome proliferator-activated receptor
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCD-1	Esteroil-CoA desaturasa-1 (sterol-CoA desaturase 1)
SHP	Small homolog partner
SREBP's	Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
RXR	Receptor ácido 9-cis-retinóico

RESUMEN

La hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo dentro del síndrome metabólico, lo que hace de ésta un problema de salud pública, tanto en México como a nivel mundial. La homeostasis del metabolismo del colesterol está finamente regulado, de tal manera que la concentración de colesterol plasmático se ve influida por la síntesis endógena, la ingestión de colesterol dietario y el catabolismo del mismo. Los ácidos biliares (BA), el producto final del catabolismo del colesterol, se sintetizan en el hígado y se almacenan en la vesícula biliar para posteriormente ser excretados en el duodeno como resultado de la ingestión de los alimentos. Al ser secretados en el duodeno llevan a cabo su función detergente como sales biliares permitiendo de esta forma la absorción de las grasas, colesterol y vitaminas liposolubles en el íleon; el 95% de los BA se reabsorben y el 5% restante se excreta en las heces, siendo ésta fracción reemplazada por la síntesis *de novo* lo que mantiene la reserva de BA en la circulación entero-hepática.

Se propone que la ruta principal de biosíntesis de BA, regulada por un sistema de retroalimentación, está controlada por la actividad de la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1), la cual en roedores es estimulada a través de la activación del receptor X del hígado (LXR), que es activado por los oxisteroles. Por otra parte, los BA activan al receptor nuclear X farnesoide (FXR) en el hígado, el cual activa la transcripción del receptor nuclear huérfano SHP (Small Heterodimer Partner) que junto con el receptor homólogo-1 (LRH-1), reprimen la transcripción del CYP7A1 disminuyendo la producción de los BA.

En estudios preliminares de nuestro laboratorio, se ha demostrado que el consumo del aislado de la proteína de soya, presenta parte de sus efectos hipocolesterolemiantes a través de un aumento en la excreción de BA en las heces en modelos de hipercolesterolemia por un mecanismo desconocido. Por lo tanto, el **objetivo** del presente trabajo fue estudiar el papel del LXR α en el mecanismo a través del cual el aislado de la proteína de soya aumenta la excreción de BA, empleando ratones mutados en LXR α ; por lo que la **hipótesis** del presente trabajo es: “que el consumo del aislado de la proteína de soya tiene efectos hipocolesterolemiantes a través de la activación del gen LXR α aumentándose de esta forma la excreción del colesterol dietario en heces; y/o a través de otras rutas metabólicas que no involucran al gen LXR α ”.

Materiales y Métodos: se estudiaron 40 ratones C57-BL/6 y 44 ratones C57-BL/6 LXR α ^{-/-} de ~27 g de peso, siendo los 2 grupos divididos aleatoriamente en 4 grupos alimentados con proteína: 1) Soya al 20%; 2) Caseína al 20%; 3) Soya al 20% con 2% de colesterol; 4) Caseína al 20% con 2% de colesterol por 5 semanas. Se registró la ganancia de peso 3 veces por semana; se obtuvo la vesícula biliar y el hígado para analizar la expresión génica, la determinación de lípidos y los estudios histológicos, muestras de suero para la determinación de glucosa, triacilglicéridos, colesterol, insulina, glucagon y leptina. Líneas celulares HepG2 y Huh7 se emplearon para analizar la actividad de la luciferasa al co-tranfectarlas con LXRE+LXR α y LXRE+LXR β .

Los **resultados** obtenidos en el estudio *in vivo*, demuestran que los 8 grupos experimentales, mantuvieron la ganancia de peso a lo largo del estudio. Se demuestra también un mayor peso del hígado por peso corporal en los

ratones mutados en LXR α con dietas altas en colesterol que los demás grupos. Por otra parte, se observó que el aislado de la proteína de soya, mantiene la concentración de glucosa en suero más baja tanto en grupos silvestres como mutados. Por otra lado, las concentraciones de colesterol sérico y hepático se presentaron considerablemente más elevadas en los grupos LXR $\alpha^{-/-}$ de ambas dietas altas en colesterol. Asimismo, los ratones alimentados con el aislado de la proteína de soya, mostraron una menor relación de insulina-glucagon en comparación con los alimentados con caseína. En cuanto a la expresión génica se observó que aun cuando en los grupos mutados en LXR α con dietas ya sea de caseína o de soya existió un aumento en la expresión de los SREBP's, en los transportadores ABC's y genes blancos de FXR, al haber un aumento en el colesterol dietario, la expresión relativa de mRNA de éstos genes disminuye. Al contener compuestos polifenólicos el aislado de la proteína de soya, en el estudio *in vitro*, se analizó el efecto de las isoflavonas lo cual nos permitió observar que éstas no modifican la actividad de la luciferasa.

Se concluye a partir de los cortes histológicos que el aislado de la proteína de soya influye en el metabolismo del glucógeno, en la respuesta inflamatoria y en parte del metabolismo del colesterol a través de LXR α . Por otra parte, la pérdida de LXR α causa alteraciones en la movilización de los lípidos, dando lugar a una hepato-esteatosis, especialmente con dietas altas en colesterol. Asimismo, nuestros resultados sugieren la presencia de una ruta complementaria a LXR α en la regulación de los genes lipogénicos. Con lo que el presente estudio sugiere la exploración de otros receptores nucleares que pudiesen estar interviniendo en los efectos observados al consumir el aislado de la proteína de soya, así como también la exploración *in vivo* del efecto del aislado de la proteína de soya con modelos LXR $\alpha^{-/-}$ $\beta^{-/-}$ y LXR $\beta^{-/-}$.

INTRODUCCIÓN

La hipercolesterolemia se define como la concentración por arriba de 200 mg/dL de colesterol en sangre, y cuya etiología es diversa: estilo de vida, enfermedades hepáticas, endocrinas, renales, o genéticas. Lo que hace a la hipercolesterolemia uno de los principales factores de riesgo dentro del

síndrome metabólico, donde existe una alteración en el metabolismo de lípidos que da como resultado un aumento en la concentración del colesterol y triacilglicéridos séricos lo que aumenta el riesgo de enfermedades crónicas degenerativas, entre las cuales tenemos la formación de hígado graso, resistencia a la insulina, enfermedades cerebro-vasculares, hepáticas y el establecimiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La OMS en el 2005 estimó que la hipercolesterolemia contribuye con cerca del 56% de las enfermedades coronarias causando cerca de 4.4 millones de muertes cada añoⁱ. En México el 26.5% de la población sufre de hipercolesterolemiaⁱⁱ.

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones para el tratamiento de sujetos con colesterol elevado. En los Estados Unidos un comité para el tratamiento de hipercolesterolemia ha desarrollado un programa secuencial para disminuir las concentraciones de colesterol. Este programa, denominado ATP III (por sus siglas en inglés Adult Treatment Panel III) indica que los individuos con estas alteraciones deben de modificar hábitos en su estilo de vida incluyendo ejercicio y cambios en la dieta. Dentro de los cambios en la dieta se ha sugerido una disminución en el consumo de grasa saturada, recomienda se incluya el consumo de fibra dietaria, fitoesteroles, ácidos grasos omega 3 y proteína de soya. En caso de que estas recomendaciones no funcionen, o lo hagan parcialmente los pacientes deben someterse a un tratamiento con medicamentos en los que se incluyen los fibratos y las estatinasⁱⁱⁱ.

En las últimas 2 décadas ha sido de interés por parte de la comunidad científica el conocer el mecanismo o mecanismos de acción de la proteína de soya para reducir el colesterol plasmático, ya que en varios meta-análisis estadísticos se ha demostrado que el consumo de ésta leguminosa reduce las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL^{iv}. Los estudios experimentales en modelos animales sobre la acción de la proteína de soya en el metabolismo de lípidos se explicaran adelante, sin embargo una de las conclusiones importantes de estos es que su acción la ejerce incrementando la concentración de colesterol a través de la formación de ácidos biliares. Por lo tanto, para poder entender el posible mecanismo de acción de la proteína de soya sobre la producción de ácidos biliares es necesario, primeramente conocer la regulación del metabolismo de los ácidos biliares en el organismo y

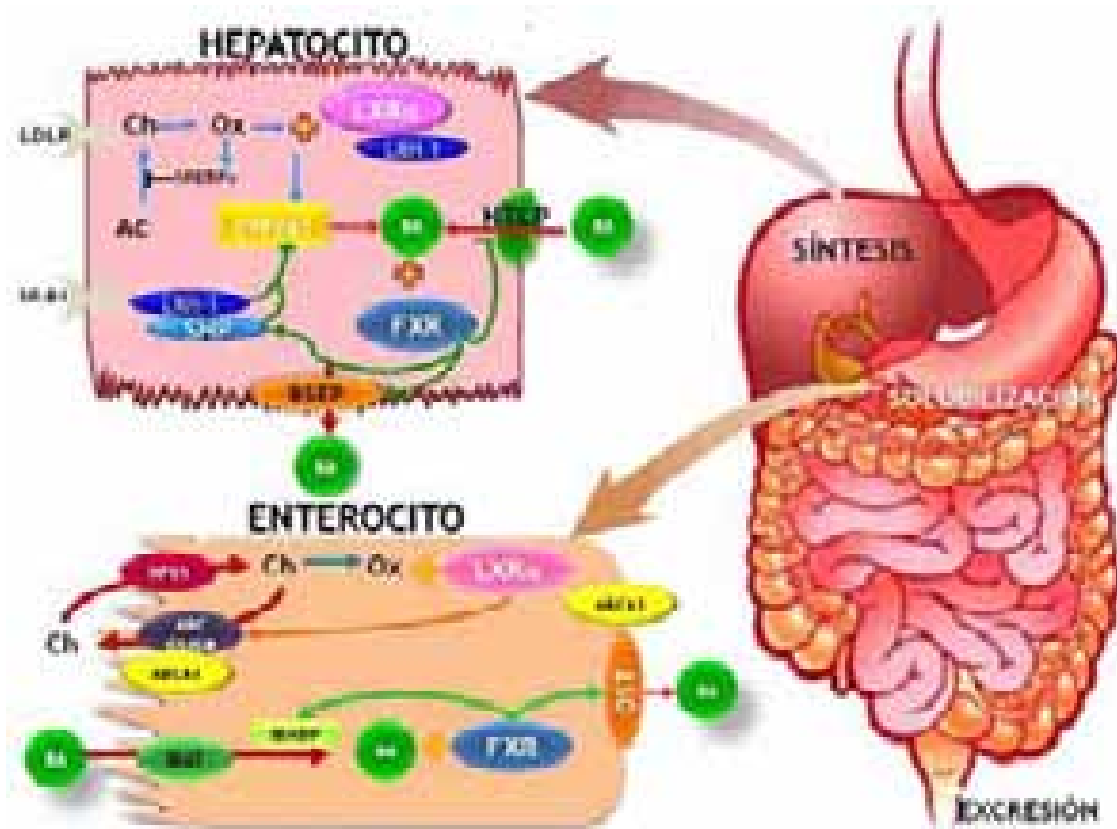
posteriormente entender los mecanismos moleculares que regulan la fisiología de los ácidos biliares.

SÍNTESIS Y CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA DE LOS ÁCIDOS BILIARES.

La síntesis de ácidos biliares (BA) se lleva a cabo en el hígado. A éste órgano le llega el colesterol remanente de la dieta, el colesterol proveniente de tejidos extra-hepáticos y el colesterol que es biosintetizado en éste órgano. El exceso de colesterol hepático debe movilizarse debido a que, aun cuando este lípido es esencial para cumplir múltiples funciones celulares (componente esencial de las membranas celulares, precursor de las hormonas esteroideas -progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralcorticoides- y precursor de los ácidos biliares y vitamina D, entre otras más), el exceso resulta tóxico para la célula, ya que éste podría cristalizarse y romper las membranas celulares; por lo que, las células hepáticas deben realizar una movilización continua del colesterol hacia las células del resto del organismo o eliminarlo a través de la formación de BA.

Los BA sintetizados en el hígado forman parte de la bilis que es una mezcla de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares. La secreción de la bilis, la cual está almacenada en la vesícula biliar, se estimula por la ingestión de grasa en la dieta; ésta se libera al intestino, en donde los BA juegan el papel de detergentes biológicos. A través de este proceso en el cual se forman micelas, las lipasas y esterasas de colesterol llevan a cabo su acción permitiendo la solubilización y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles por las células intestinales o enterocitos. Durante el proceso de reabsorción, los BA son reabsorbidos en el intestino a nivel del íleon por medio de transportadores altamente específicos para ácidos biliares como IBAT (por sus siglas en inglés ileal bile acid transporter). Intracelularmente en los enterocitos los ácidos biliares son transportados por la proteína enlazante de ácidos biliares (IBABP), y posteriormente enviados a la circulación sanguínea vía la vena porta para que sean captados por el hígado a través del transportador NTCP (por sus siglas en inglés de Na⁺ taurocholate cotransporter polypeptide) cerrando el circuito denominado circulación entero-hepática. El exceso de BA modula la biosíntesis de los propios BA en el hígado disminuyéndola. Se ha establecido

que diariamente se reabsorben ~95% de los BA por esta vía de recirculación y ~5% éstos se pierden a través de la heces.



Esquema 1: Circulación entero-hepática del colesterol y ácidos biliares.

Síntesis de ácidos biliares

La síntesis de BA que se lleva a cabo en los hepatocitos, es un proceso de hidroxilaciones y oxidaciones de la molécula del colesterol para incrementar su solubilidad. Además éstos compuestos modificados tienen la capacidad de conjugarse con el aminoácido glicina o el ácido orgánico taurina. El proceso de la biosíntesis de BA se lleva a cabo por varias etapas denominadas: iniciación, modificación del anillo estructural, oxidación de la cadena lateral y conjugación. Este proceso involucra 17 enzimas diferentes, todas ellas localizadas en el hígado. La mayoría de estas enzimas pertenecen a la familia de las enzimas de citocromo P450. En estudios iniciales se demostró que para la biosíntesis de BA, la primera enzima paso limitante para su formación, la cual se conoce como colesterol 7 α -hidroxilasa o CYP7A1 (EC: 1.14.13.17) inserta un grupo hidroxilo en la posición 7 de la molécula del colesterol. Posteriormente se

demonstró que esta enzima es el paso inicial principal en la biosíntesis los de BA denominada ruta clásica o neutra. Sin embargo, después se demostró con el uso de animales knockout para el gen de la enzima CYP7A1 que existe otra vía de formación de BA que se conoce como vía alterna o ácida, cuyo paso limitante en el inicio de la ruta es la enzima mitocontrial 27α -hidroxilasa o CYP27A1; siendo los productos finales de estas rutas el ácido cólico (CA) y quenodesoxicólico (CDCA), respectivamente.

En la ruta clásica, modificaciones en los núcleos esteroideos (hidroxilación en las posiciones 7α y 12α , epimerización del grupo 3α -hidroxilo y saturación del núcleo esteroideo) precede a la ruptura oxidativa de 3 carbonos de la cadena lateral. En la ruta alterna, la ruptura oxidativa de la cadena lateral precede las modificaciones del núcleo esteroideo. Los productos intermedios de la ruta son BA primarios, que en seres humanos y ratas son predominantemente CA y CDCA, y en ratones CA y ácido β -muricólico.

Las principales etapas de la biosíntesis de ácidos biliares las cuales se mencionaron anteriormente, se describen brevemente a continuación (figura 1):

INICIACIÓN: La síntesis de los ácidos biliares inicia cuando el colesterol se convierte en 7α -hidroxicolesterol por la CYP7A1.

MODIFICACIÓN DEL ANILLO ESTRUCTURAL: la enzima $C_{27}3\beta$ -HSD solo actúa sobre los esteroides que contienen un grupo 7α -hidroxilo convirtiendo los intermediarios 7α -hidroxilados y oxioesteroides en sus formas 3-oxo y Δ^4 ; iniciando la cascada de las 12α -hidroxilasas del colesterol y oxioesteroides. El nivel de esteroide 12α -hidroxilasa en el hígado determina las cantidades relativas de los dos BA primarios (CA y CDCA). El CA juega un papel importante en la regulación de la ruta al tener un efecto de retroalimentación sobre la misma.

Los intermediarios 12α -hidroxilados están sujetos a una reducción en la doble ligadura del anillo A por la enzima Δ^4 -3-oxoesteroide 5β -reductasa. El último paso en la modificación del anillo involucra la reducción del grupo 3-oxo a un alcohol en la configuración alfa esteroquímica y es catalizada por la 3α -hidroxioesteroide deshidrogenasa.

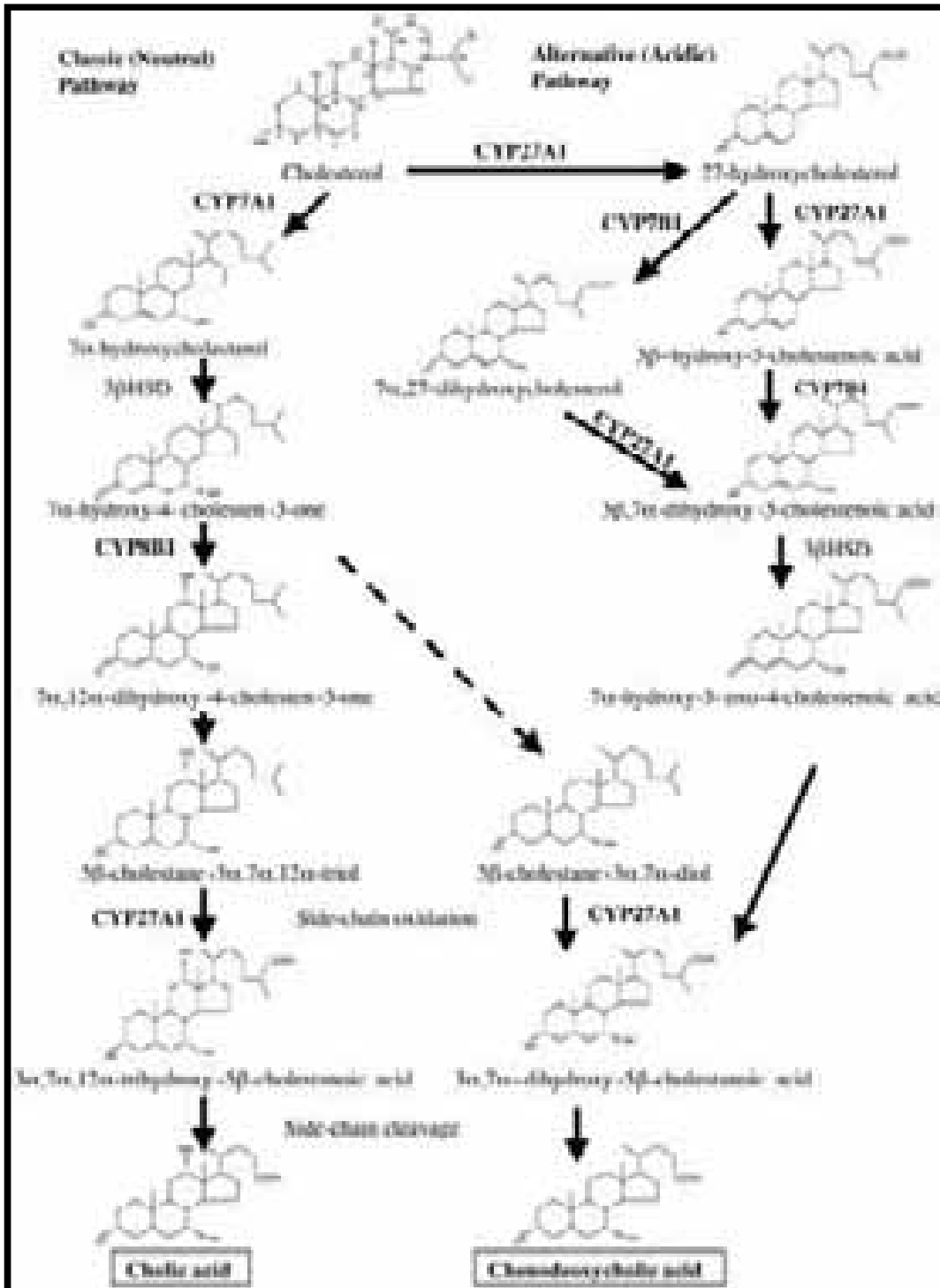
OXIDACIÓN DE LA CADENA LATERAL: hay una oxidación progresiva y un acortamiento de la cadena lateral del esteroide. Los primeros pasos son

realizados por la CYP27A1, que inicia la síntesis de BA a través de la formación del 27-hidroxicolesterol.

Los BA intermediarios oxidados que resultan de la actividad CYP27A1 salen de la mitocondria y acortan la cadena lateral. La primera reacción es catalizada por la ácido biliar coenzima A ligasa que activa a los intermediarios C₂₇ de la biosíntesis de los BA. El siguiente paso en la ruta biosintética involucra la hidratación y oxidación en el enlace Δ^{24} y es catalizada por la proteína D-bifuncional. El último paso en la oxidación de la cadena lateral de los intermediarios de los BA es catalizada por la tiolasa 2 peroxisomal, la cual parte el enlace en la posición C₂₄-C₂₅ para formar el propionil-CoA y el ácido biliar intermediario C₂₄-CoA.

CONJUGACIÓN: el paso terminal en la síntesis de ácidos biliares involucra la adición de un aminoácido o ácido orgánico, usualmente glicina o taurina, en el enlace amida del carbono 24. La reacción es catalizada por la enzima ácido biliar coenzima A: aminoácido N-aciltransferasa, la cual está localizada en los peroxisomas^v. La proporción de BA libres a conjugados estar regulada por los PPAR α^{ov} , la cual activa la enzima peroxisomal de la coenzima A tioesterasa 2 que cataliza la hidrólisis de los BA CoA tioester y coenzima A.

La conjugación de los BA aumenta la anfipaticidad y eleva la solubilidad de las moléculas, las cuales son impermeables a las membranas celulares.



Debido a que BA libres y conjugados no cruzan la membrana celular, se requiere de IBAT y transportadores de los miembros de la familia ABC para movilizar los ácidos biliares hacia adentro y fuera de las células^{vii}.

Figura 1: Rutas clásica y ácida de la biosíntesis de los ácidos biliares^{viii}

Regulación de la biosíntesis de los ácidos biliares.

La síntesis de BA depende de 2 factores: 1) la concentración hepática de colesterol y 2) la concentración hepática de BA. Cuando la concentración de colesterol aumenta en el hígado, el colesterol se convierte en oxiesteroles. Dentro de los oxiesteroles formados se encuentran: 22 (R) hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol. Los oxiesteroles formados se convierten en ligandos específicos de un miembro de los receptores nucleares conocido como LXR (por sus siglas en inglés Liver X Receptor). Este receptor juega un papel central en el metabolismo del colesterol debido a que regula la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, el transporte reverso del colesterol y la formación de BA.

LXR

Los LXR's, son receptores nucleares que juegan un papel clave en el metabolismo del colesterol, lípidos y carbohidratos; los tejidos blanco donde se observan los efectos del LXR α son principalmente el hígado y el tejido adiposo. Los LXR's permiten mantener la homeostasis del colesterol a través de la regulación del catabolismo del colesterol, absorción intestinal, almacén y transporte a los tejidos periféricos, así como también el metabolismo de triacilglicéridos y fosfolípidos, por medio del control transcripcional de los genes específicos clave involucrados en este proceso^{ix}.

Existen dos miembros de la subfamilia de los LXR's expresados en el sistema entero-hepático: LXR α (NR1H3) y LXR β (NR1H2). Mientras la expresión de LXR β se encuentra en glándulas adrenales, cerebro, grasa parda, corazón, intestino, hígado, pulmón, músculo, bazo, testículo y grasa blanca. El LXR α se expresa en tejidos involucrados en el metabolismo de los lípidos. Ambos LXR's forman heterodímeros obligados con el receptor X retinoide (RXR), el cual se une y es activado por el ácido 9-cis-retinóico. El heterodímero RXR-LXR se une al elemento de respuesta LXR (LXRE).

Los activadores de LXR, consisten en un grupo selecto de oxiesteroles derivados del metabolismo del colesterol en tejidos específicos como hígado, cerebro y gónadas. Los activadores más potentes de LXR son el 22(R)-

hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol y 24(S),25-epoxicolesterol^x. Estos oxisteroles no solamente se producen por acción enzimática de varias enzimas dependientes del citocromo P450 (CYP's), sino también por acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS)^{xi}.

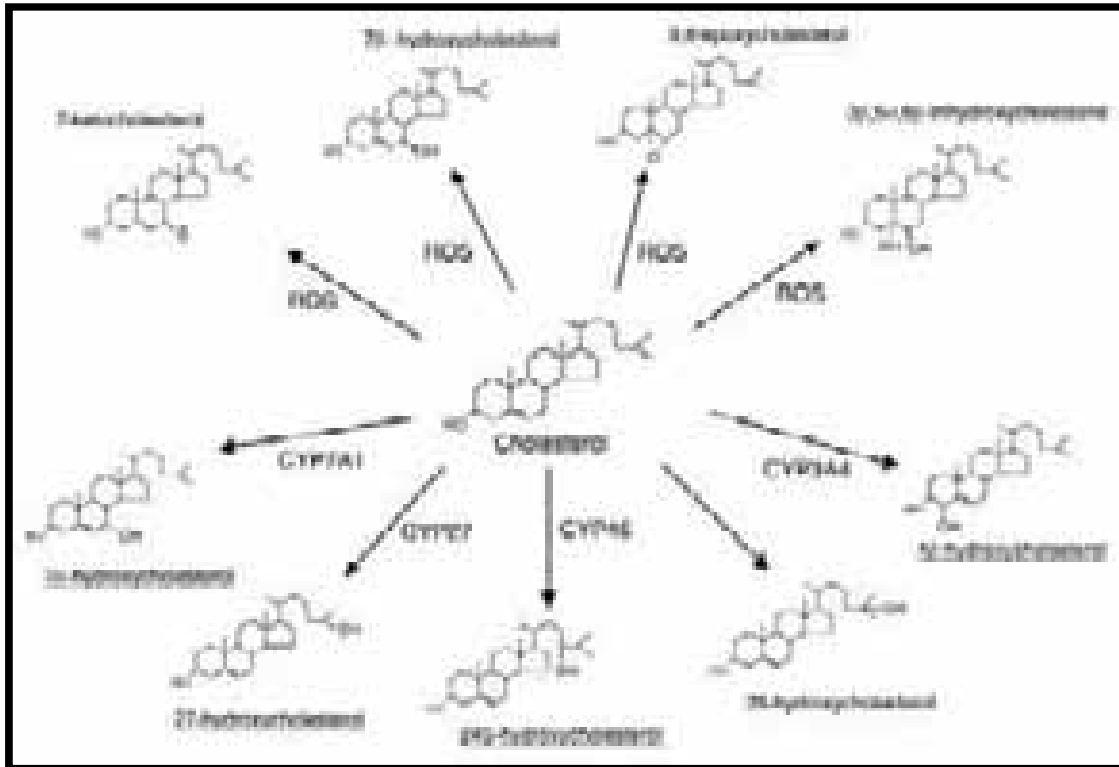


Figura 2: Oxisteroles producidos a partir del colesterol por las reacciones de oxigenación^{xii}.

LXR y regulación de ácidos grasos

Se han identificado dos elementos de respuesta (LXRE) en el promotor del factor de transcripción SREBP-1c (por sus siglas en inglés Sterol Regulatory Element Binding Protein 1-c), que regula la expresión de genes lipogénicos, y se ha demostrado que ligandos de LXR α inducen su actividad generándose ácidos grasos que son necesarios para la formación de ésteres de colesterol, los cuales estabilizan la concentración de colesterol libre^{xiii}.

Los SREBP's son factores transcripcionales que intervienen en la modulación de la transcripción de los genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos, la enzima málica (ME), etc., o para la captura y síntesis de colesterol como la HMG-CoA reductasa y el receptor LDL^{xiv,xv}. Los SREBP's se sintetizan en el retículo endoplásmico en la forma de

proteína precursora; para volverse transcripcionalmente activo el precursor de SREBP sufre una ruptura proteolítica en el aparato de Golgi liberando su dominio N-terminal; son dos las proteínas que son esenciales en este proceso de ruptura: SCAP e Insig. SCAP es una proteína integral del retículo endoplásmico que interactúa con el precursor recién sintetizado de SREBP y lo lleva al aparato de Golgi, mientras que Insig retiene el complejo SCAP-SREBP en el retículo endoplásmico^{xvi}.

Entre los SREBP's existen tres isoformas SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2.

El SREBP-1a juega un papel crucial en la regulación dietaria de la mayoría de los genes lipogénicos, el SREBP-1c controla la expresión de los genes de las enzimas lipogénicas y su expresión está regulada nutricionalmente, y el SREBP-2 juega un papel clave en la regulación de la síntesis del colesterol.

El SREBP-1 activa primeramente las rutas de los ácidos grasos, triacilglicéridos, y fosfolípidos; mientras que SREBP-2 estimula la síntesis y absorción del colesterol.

En el caso de SREBP-1c, el cual se regula principalmente por cambios en el estado nutricional, activa la transcripción de la mayor parte de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos incluyendo ACC, FAS, SCD-1 y glicerol-3-fosfato aciltransferasa, entre otras^{xvii}. Asimismo la insulina induce la transcripción del gen SREBP-1c, dando lugar a un aumento paralelo tanto en el la unión a la membrana del precursor como a la forma nuclear madura; se ha observado una marcada acción de la insulina al estimular la ruptura de la proteína precursora de SREBP-1c, siendo que la regulación en la expresión de éste gen involucra la ruta dependiente del fosfatidilinositol-3-cinasa.

LXR y regulación del transporte reverso del colesterol.

Se ha demostrado que los promotores de los genes de varios transportadores de la familia ABC (Casetes transportadores de membrana unidos a ATP) poseen elementos de respuesta para el factor de transcripción

LXR. Dentro de los transportadores que se encuentran fuertemente regulados por LXR se encuentran el ABCA1, ABCG5, y ABCG8^{xviii}.

El ABCA1 es una proteína transmembranal transportadora, entero-hepática y de macrófagos^{xix}, que contiene dos segmentos hidrofóbicos adicionales que le proveen de las características definitorias para su inclusión en su clase única A de los transportadores ABC que transportan moléculas como proteínas, lípidos, iones y azúcares a través de la membrana. Es responsable del flujo celular del colesterol libre y fosfolípidos a las apolipoproteínas aceptoras. La expresión del ABCA1 y el flujo de colesterol están fuertemente regulados a nivel transcripcional por rutas de señalización de hormonas nucleares. La transcripción de ABCA1 está directamente inducida por el heterodímero RXR-LXR. Los LXR's se requieren para la regulación inducida por colesterol de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1^{xx,xxi}.

El transportador ABCA1 se expresa ampliamente en diferentes tejidos tales como hígado, placenta, pulmones, adrenales y macrófagos; su expresión se encuentra regulada por el AMP cíclico y los esteroides^{xxii}. El ABCA1 interviene en el flujo del colesterol proveniente de los tejidos periféricos para su catabolismo hepático; así como también actúa en las membranas apicales de los enterocitos para el transporte reverso del colesterol al lumen intestinal, inhibiendo directamente la absorción del colesterol dietario. El exceso de colesterol es transportado de regreso al suero, donde es enviado al hígado por medio del transporte reverso del colesterol vía las HDL's^{ix}.

Por otro lado, los ABCG5 y ABCG8 son dos proteínas que funcionan como transportadores reversos del colesterol cuando forman un heterodímero en las membranas apicales de los hepatocitos o de los enterocitos^{xxiii}. En los hepatocitos, éste heterodímero se encarga de transportar el colesterol a la bilis, mientras que en los enterocitos su función es la de transportar el colesterol excedente al lumen intestinal para ser eliminado a través de las heces.

LXR y síntesis de los ácidos biliares.

Se ha demostrado que el gen de la enzima CYP7A1 también posee elementos de respuesta para el factor de transcripción LXR α ; se ha observado que a mayor contenido de colesterol en el hígado, mayor es la expresión de

esta enzima microsomal del citocromo P450-7A, expresada exclusivamente en el hígado. La transcripción de la CYP7A1 se encarga de la regulación de los niveles de ácidos biliares en el sistema enterohepático. Como se ha escrito previamente, esta enzima es paso limitante en la ruta clásica de la biosíntesis de los ácidos biliares^{xi}. Su actividad es reprimida por el CA y CDCA.

El gen que codifica para CYP7A1 está regulado por una variedad de pequeñas moléculas lipofílicas, incluyendo las hormonas esteroideas, tiroideas, colesterol y BA; su expresión está regulada por diversos miembros de la superfamilia de receptores nucleares cuyos factores de transcripción son activados por ligandos^{xxiv}. Una elevación en la concentración del colesterol dietario estimula la transcripción de CYP7A1 resultando en un incremento en la síntesis de los BA y excreción del colesterol. La regulación de los niveles de CYP7A1 ocurre primero a nivel transcripcional y se modula por la proporción relativa de colesterol:BA. La transcripción del gen CYP7A1 se reprime por los ácidos biliares. En estudios realizados en ratones se ha demostrado como la actividad y niveles de mRNA de CYP7A1 aumentaron en los alimentados con colesterol, siendo marginalmente mayores en las hembras que en los machos^{xxv}.

Por otra parte, el gen de la enzima CYP27A1 inicia la ruta acídica de la biosíntesis de los BA convirtiendo el colesterol al 27-hidroxicolesterol y ácido 3-βhidroxi-5-colestenoico, produciendo principalmente BA y CDC. En estudios previos se señala que la enzima esteroide 27-hidroxilasa mitocondrial está relacionada en la regulación de la señalización de LXRα^{xxvi}, mecanismo que en la actualidad se desconoce. Otros estudios realizados en ratones demuestran cómo la actividad y niveles de mRNA de la CYP27A1 no varían consistentemente en función del genotipo CYP7A1, género e ingestión de colesterol dietario. Asimismo, la interrupción de la circulación entero-hepática de los BA, tanto por tratamiento con colesteliramina como por drenado biliar, aumenta los niveles de la CYP27A1 en algunas especies^{xxv}.

Concentración hepática de BA

La actividad de CYP7A1 y CYP27A1 causa un aumento en la concentración plasmática de los BA, los cuales al regresar a través de la circulación entero-hepática al hígado tienen un efecto de retroalimentación en

el sistema disminuyendo su producción^{xxvii}, siendo así que los BA primarios, CA y CDCA, actúan como ligandos específicos de otro miembro de los receptores nucleares llamado Receptor X Farnesoide (FXR), el cual al activarse permite la transcripción del gen SHP (por sus siglas en inglés de Small Heterodimer Partner) que al interactuar con LRH-1 (por sus siglas en inglés Liver Receptor Homolog 1) funcionan como co-represores transcripcionales de la CYP7A1²⁴, manteniendo de ésta forma la homeostasis hepática de los BA a través de su biosíntesis, transporte, absorción y excreción.

FXR

El FXR es un receptor nuclear clave en la homeostasis de los BA, ya que se encarga de la regulación de su transporte y previene la sobre acumulación de los BA en el hepatocito. El FXR altera su transcripción al unirse a secuencias de DNA compuestas por dos secuencias repetidas invertidas separadas por un nucleótido (IR-1) como un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR). Los BA actúan como ligandos de FXR ejerciendo un efecto inhibitorio en el gen CYP7A1^{xxviii} por un mecanismo indirecto, a través de su gen blanco en el hígado SHP²⁴. Un incremento de la proteína SHP forma un complejo heterodimérico con LRH-1 que se une como monómero a un elemento de respuesta en el promotor CYP7A1^{xxix} que actúa como factor competitivo en la expresión específica de CYP7A1 en hígado^{xxx,xxxi}.

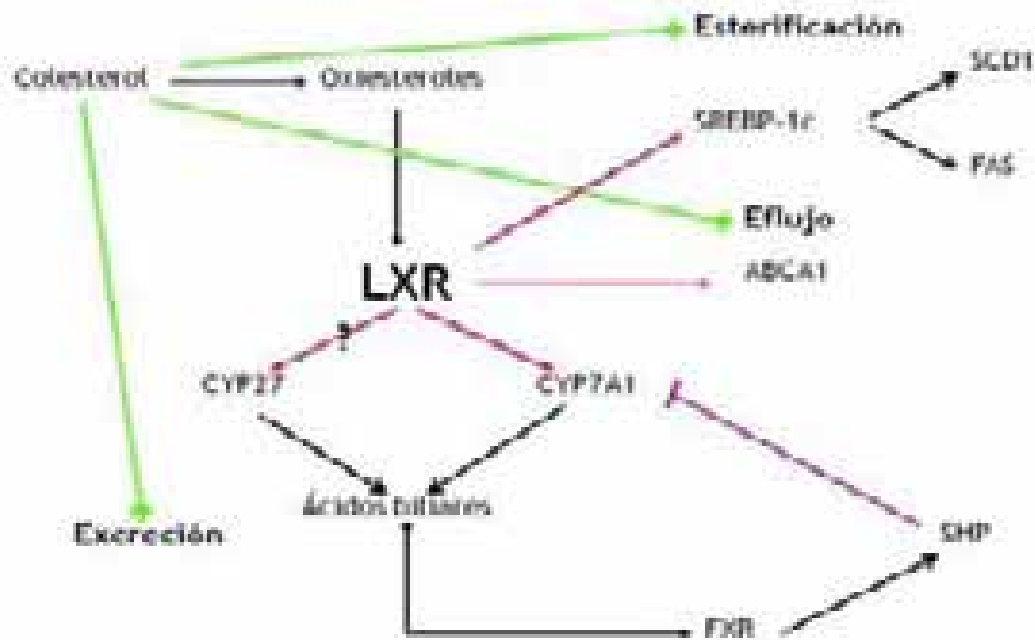
Por otra parte, en estudios previos Sinal *et al* describen el efecto de CA en la dieta utilizando ratones FXR knockout, siendo que FXR tiene un papel crucial en la homeostasis de los BA. Se observó que con una dieta al 1% de CA por 5 días los ratones knockout perdían rápidamente tejido adiposo y peso corporal, posteriormente desarrollaban hepatotoxicidad por el exceso de sales biliares acumuladas; además, presentaban un aumento significativo en el nivel sérico de BA secundario a la deficiente secreción de BA del hígado y una excreción disminuida de sales biliares en heces. Asociado con estos cambios patológicos, se presentan alteraciones en la expresión de genes^{xxxii}.

FXR y regulación del transporte de ácidos biliares.

Asimismo, en estudios previos se observó que FXR además de regular la expresión de SHP y PLTP (por sus siglas en inglés phospholipid transfer

protein), también regula la expresión de IBABP (por sus siglas en inglés ileal bile acid binding protein) y los transportadores de BA: BSEP (por sus siglas en inglés bile salt export pump) y NTCP³².

NTCP es responsable de la absorción de los BA en el hepatocito, y su expresión es regulada negativamente por FXR³². Simultáneamente, FXR regula positivamente la transcripción de BSEP, otro miembro de la superfamilia de los transportadores ABC, el cual aumenta el flujo de los BA a la bilis^{xxxiii}. Por otra parte, BSEP se relaciona con el gen resistente a múltiples drogas o las P-glicoproteínas y se expresa exclusivamente en el hígado^{xxxiii}.



Esquema 2: Mecanismos de acción de LXRα.

ANTECEDENTES

SOYA

El frijol de soya (*Glycine max*) es una leguminosa cultivada originalmente en China, donde por más de 4000 años constituyó un alimento fundamental en la dieta.

Composición de la soya

La soya se encuentra compuesta por diversos nutrimentos, entre ellos hidratos de carbono complejos, proteínas, fibra dietética soluble e insoluble, oligosacáridos, fitofenoles, minerales, un elevado porcentaje de vitaminas y un adecuado balance de ácidos grasos, con una baja concentración de grasas saturadas y no contiene colesterolⁱ.

Cada 100 g del aislado de proteína de soya contiene:ⁱⁱ

NUTRIMENTO	CONTENIDO
Proteína	38 g
Lípidos	18 g
Hidratos de Carbono	15 g
Fibra	15 g
Cenizas	14 g
Ácido fítico	1.00-1.47 g
Saponinas	0.22 - 0.33 g
Isoflavonas	1200- 4200 μ g

Tabla 1: Contenido de nutrimentos en 100 g del aislado de la proteína de soya

Asimismo, ésta tiene un menor contenido de grasas saturadas y colesterol en comparación con la proteína de origen animal. Por otra parte, el aislado de la soya contiene isoflavonas, compuestos de relevancia por su similitud estructural a los estrógenos y son los compuestos a los que se les ha atribuido la responsabilidad de los efectos benéficos que tiene la soya en la salud. Las tres principales isoflavonas del frijol de soya son la genisteína, la daidzeína y la gliceteína.

La proteína de soya es una proteína de origen vegetal con un perfil de aminoácidos que cubre con los requerimientos nutrimentales en humanos y en ratasⁱⁱⁱ. La proteína de soya por si sola o como principal fuente de proteína en la

dieta, contiene niveles adecuados de energía y otros nutrimentos esenciales que promueven el crecimiento adecuado de los infantes^{iv}.

Soya y lípidos plasmáticos

El consumo del aislado de la proteína de soya reduce el colesterol y triacilglicéridos séricos, principalmente en los pacientes con hipercolesterolemia^v. Estudios anteriores reportan una disminución significativa en la concentración de colesterol LDL y un aumento significativo del colesterol HDL^{vi}.

Existen diversos reportes que afirman cómo el consumo del aislado de la proteína de soya e isoflavonas se involucran con diversos mecanismos, tales como la reducción del colesterol total y de LDL, el aumento en el colesterol HDL y la protección contra la oxidación de las LDL^{vii}. Se ha encontrado que el efecto hipocolesterolemiante de la proteína de soya altera la expresión de genes involucrados en el procesamiento y metabolismo de los lípidos^{viii}.

Por otra parte, en estudios realizados con pacientes con DM2 se ha encontrado una mejora significativa en la concentración de lípidos al consumir suplementos de proteína y fibra de soya^{ix}. Mientras que en modelos animales ha mostrado prevenir el desarrollo anormal de valores elevados de colesterol LDL y VLDL^x. Asimismo, se encontró que el aislado de la proteína de soya tiene un efecto hipolipémico aun en presencia de hiperinsulinemia e hiperleptinemia en ratas Zucker (ZDF) fa/fa; estos resultados demostraron que SREBP1c está regulada independientemente a la disminución de insulina y la disminución en la expresión de los genes de enzimas lipogénicas, aumentando la oxidación de los ácidos grasos lo que reduce la formación de hígado graso^{xi}.

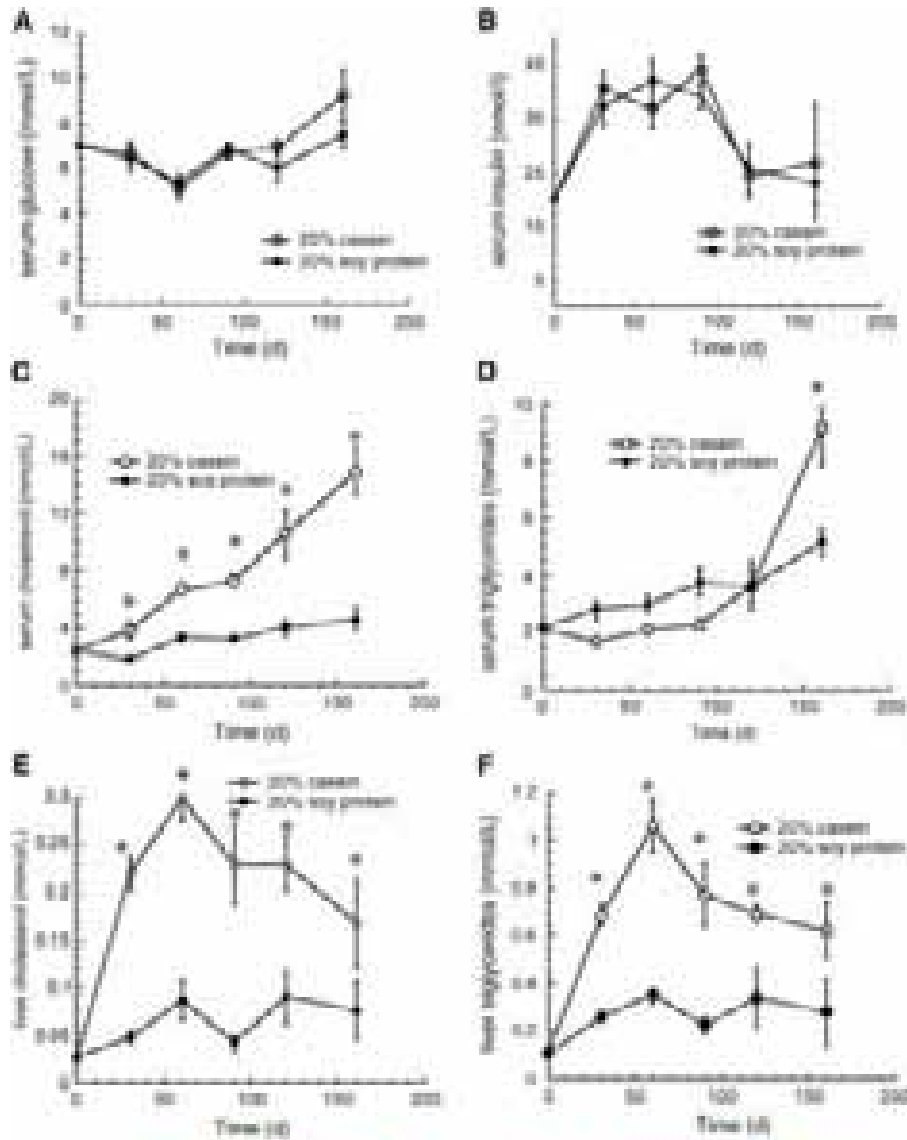


Figura 3: Gráficas de las ratas ZDF alimentadas con el aislado de la proteína de soya o caseína

Efectos del consumo de soya en la salud

La proteína de soya ha llegado a ser considerada como una alternativa para el tratamiento de muchas enfermedades crónicas^{xii,xiii}. Los efectos hipocolesterolemiantes de la proteína de soya representan efectos benéficos en pacientes con insuficiencia renal crónica, ya que la concentración elevada de colesterol puede exacerbar la progresión de la enfermedad^{xiv}.

Así mismo se han visto efectos benéficos en el sistema óseo al demostrar modificaciones cruciales en el balance del calcio y la densidad

mineral ósea^{xv}, ya que la proteína de soya causa una menor excreción urinaria de calcio^{xvi}.

El consumo de la proteína de soya ha demostrado tener efecto protector de riesgo cardiovascular y efectos anticancerígenos relacionados a la presencia de las isoflavonas^{xvii}; así como también, se han encontrado efectos de la proteína de soya en la terapia estrogénica de reemplazo hormonal.

Otra de las características importantes de la proteína de soya es el contenido de arginina y glicina, que es el doble de lo contenido en la caseína; siendo que en estudios realizados en seres humanos, la concentración sérica postprandial elevada de arginina y glicina así como bajos de tirosina^{xviii} se encuentran asociados con una menor proporción insulina/glucagon.

JUSTIFICACIÓN

En estudios realizados en modelos animales se ha de mostrado cómo el aislado de la proteína de soya influye en el metabolismo de lípidos. En nuestro laboratorio, se ha demostrado como la ingestión a corto y largo plazo del aislado de la proteína de soya mantiene concentraciones normales de insulina sérica comparada con ratas alimentadas con una dieta de caseína, y reduce el mRNA de SREBP1 en el hígado, dando lugar a una disminución en los triglicéridos y colesterol séricos por medio de una disminución en la expresión de los genes de las enzimas lipogénicas, FAS y ME^{xix}.

Con la evidencia obtenida, se sugiere que el LXR α está parcialmente involucrado en la regulación de la expresión de SREBP1c por el aislado de la proteína de soya en las ratas ZDF fa/fa. Asimismo, tanto en nuestro laboratorio como en otros, se ha demostrado que la proteína de soya aumenta la excreción de ácidos biliares. Estos resultados sugieren que los efectos de la proteína de soya en el metabolismo de lípidos hepáticos puede ser regulada por LXR α ^{xx}.

La finalidad del presente trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual la proteína de soya actúa en el metabolismo de los lípidos, así como la regulación de la proteína de soya a través de LXR α o a través de otros mecanismos involucrados en la regulación del metabolismo de lípidos.

HIPÓTESIS

El consumo de la proteína de soya tiene efectos hipocolesterolemiantes a través de la activación del gen LXR α , aumentando de esta forma la excreción del colesterol dietario en heces; y/o se llevan a cabo a través de otras rutas metabólicas que no involucran al gen LXR α .

OBJETIVOS

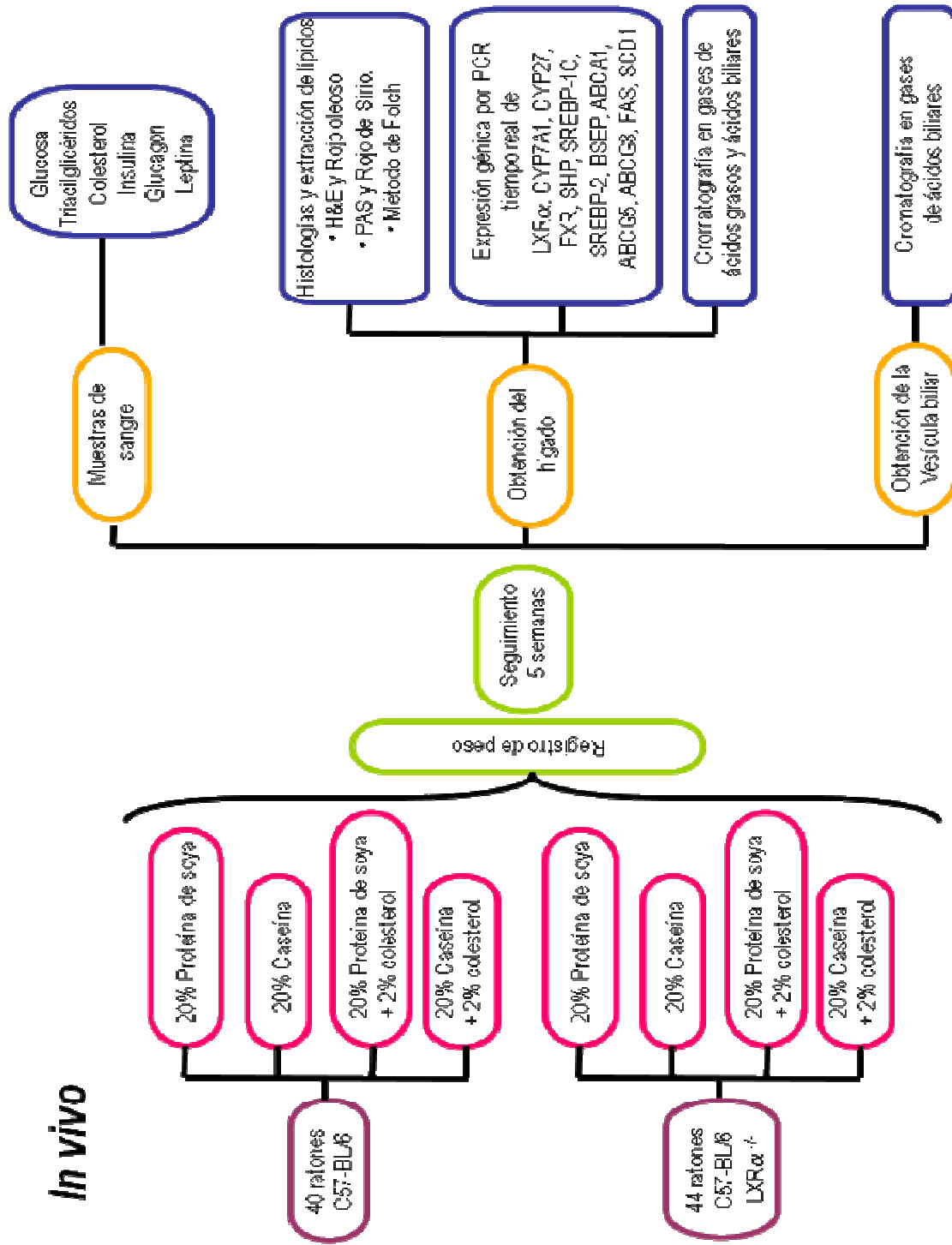
Objetivo general

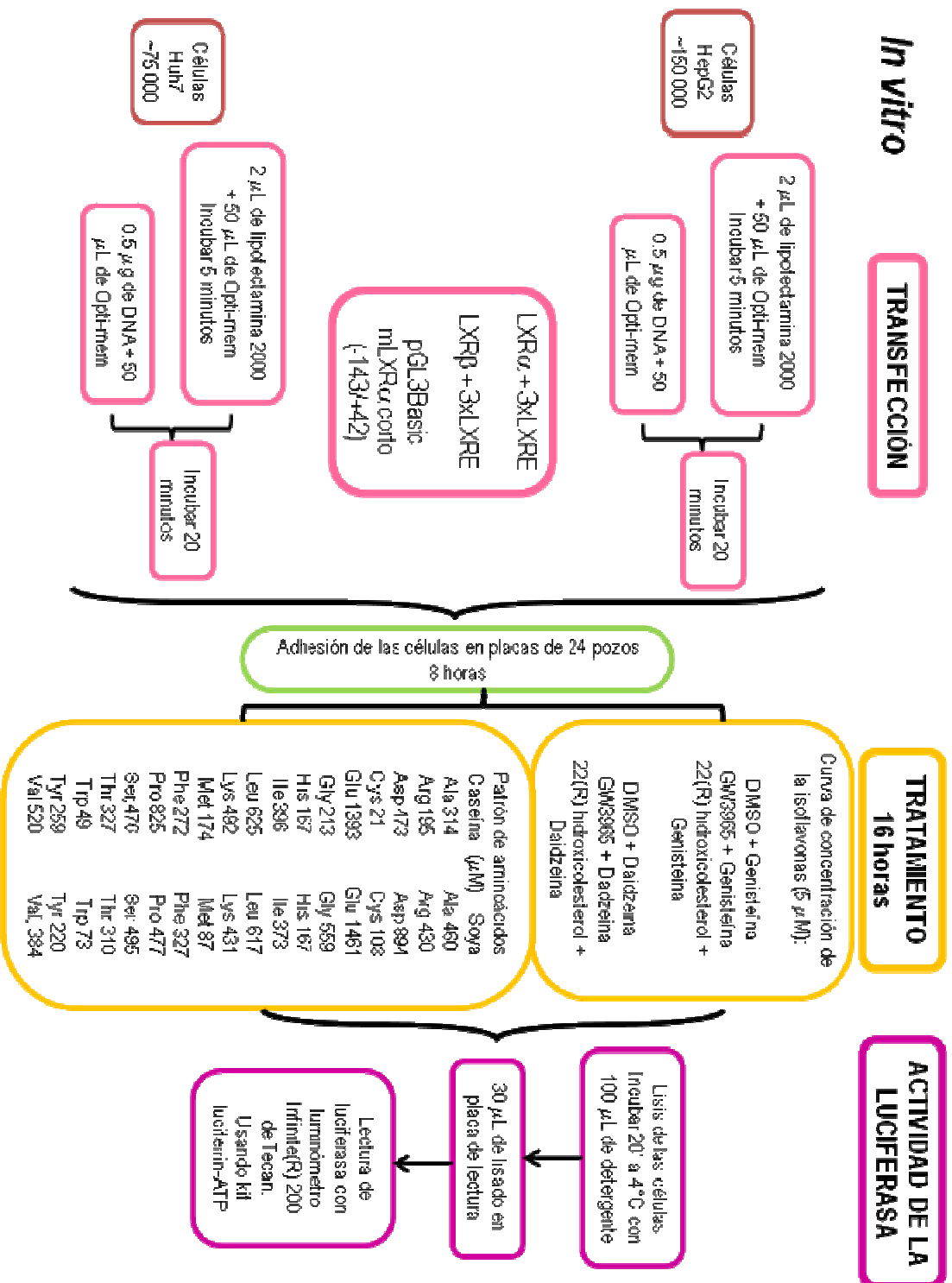
Estudiar si LXR α es parte del mecanismo a través del cual la proteína de soya aumenta la excreción de ácidos biliares empleando ratones LXR $\alpha^{-/-}$.

Objetivos específicos

- Determinar el contenido de colesterol y triglicéridos en hígado.
 - Determinar la concentración de glucosa, colesterol, triacilglicéridos, insulina, glucagon y leptina en suero.
 - Analizar el patrón de expresión de los genes blanco del factor de transcripción LXR α .
 - Medir el tipo y la concentración de ácidos biliares en la vesícula biliar.
 - Ver por medio de ensayos de luciferasa si las isoflavonas son ligandos directos o presentan alguna acción en la activación de LXR α y LXR β .
-

METODOLOGÍA





Población de estudio: Se utilizarán ratones macho de la cepa C57-BL/6 de aproximadamente 20 gramos de peso.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio: Estudio experimental. La fase de seguimiento de los ratones se dará en un periodo de 5 semanas.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Ratones de la cepa CB57BL/6
2. Macho
3. De ~20 gramos de peso

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Los ratones con las características anteriormente mencionadas no entrarán al estudio en caso de estar enfermos en apariencia, que se determinará por medio de los siguientes signos: estornudos y porfirinas.
2. Los ratones que bajen de peso sin explicación alguna

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Los ratones se eliminarán del estudio en caso de: Muerte durante la fase de seguimiento del estudio.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

- Grupo control
 - 10 ratones silvestres: aislado de proteína de soya al 22.7%
 - 10 ratones silvestres: caseína al 22.1%
 - 10 ratones $LXR\alpha^{-/-}$: aislado de proteína de soya al 22.7%
 - 10 ratones $LXR\alpha^{-/-}$: caseína al 22.7%
- Grupo experimental
 - 10 ratones silvestres: aislado de la proteína de soya al 22.7% + 2% colesterol
 - 10 ratones silvestres: caseína al 22.1% + 2% colesterol
 - 12 ratones $LXR\alpha^{-/-}$: aislado de la proteína de soya al 22.7% + 2% colesterol
 - 12 ratones $LXR\alpha^{-/-}$: caseína al 22.1% + 2% colesterol

colesterol

VARIABLES DEPENDIENTES

- Tipo de la proteína:
 - Administración de una dieta con 22.7% del aislado de la proteína de soya
 - Administración de una dieta con 22.1% de caseína
- Cantidad de colesterol contenido en la dieta:
 - Administración de una dieta alta en colesterol (2%) con 22.7% del aislado de la proteína de soya.
 - Administración de una dieta alta en colesterol (2%) con 22.1% de caseína.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Los ratones se mantendrán en jaulas de policarbonato, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h, con temperatura y humedad controladas. A los ocho grupos se les permitirá la ingestión de la dieta y de agua *ad libitum* por un periodo de 5 semanas.

PREPARACION DE LAS DIETAS

%	Caseína	Soya	Caseína alta en colesterol	Soya alta en colesterol
Dextrosa	33.4	33.05	32.4	32.05
Almidón	33.4	33.05	32.4	32.05
Minerales	5	5	5	5
Proteína	22.1	22.73	22.1	22.73
Colina	0.17	0.17	0.17	0.17
Vitaminas	1	1	1	1
Aceite	5	5	5	5
Colesterol			2	2

Tabla 2: Contenido de la dieta control y experimental.

Pureza de la caseína 90.6%

Pureza del aislado de la proteína de soya 88%

MÉTODOS DE RECOLECCION DE DATOS

HISTOLOGÍAS

Las histologías se realizaron para observar la acumulación de lípidos en hígado, empleando la técnica rojo oleoso en propilen-glicol la cual debe ser realizada en frío, por medio de la técnica hematoxilina y eosina para observar las diferencias entre los hígados de los diferentes tratamientos dietarios a los que fueron sometidos los ratones, finalmente se realizó las tinciones PAS para analizar las diferencias en los depósitos de glucógeno hepáticos y Rojo de picro-Sirio observándose la presencia de fibrosis.

TINCIONES HISTOLÓGICAS

Para realizar esta técnica, previamente el tejido se fijó en formol al 10%, se deshidrató en un gradiente de alcoholes de 70-100% en 10%, se aclaró con xilol al 100%. Se infiltró en parafina líquida para posteriormente embeberlo el tejido en parafina, se cortó con un grosor aproximado de 5 micras y se colocó en un portaobjetos. Una vez que se sacó del horno, el portaobjetos se pasa por xileno, alcohol y agua para hidratar al tejido, de forma que las células presenten afinidad por las tinciones. Se tiñeron las histologías, posteriormente se lavaron y tiñeron, finalmente se volvieron a lavar con agua, alcohol y xileno y se fijaron con el cubre-objetos.

HEMATOXILINA Y EOSINA

Esta técnica emplea el uso de dos teñidos por separado, uno tiñe los núcleos y otro de tiñe el citoplasma y los tejidos conectivos. La hematoxilina es un tinte de color púrpura oscuro que tiñe la cromatina (el material nuclear) dentro del núcleo, dejando un color púrpura-azul. Mientras la eosina es un tinte de color rosa-anaranjado a rojo, que tiñe el material citoplasmático incluyendo el tejido conectivo y el colágeno, que se contrarresta dejando un color rosa-anaranjado. Éste actúa como un contraste nítido al teñido púrpura-azul de los núcleos, ayudando a identificar otras estructuras en los tejidos, así como la membrana celular.

Los cortes se procesaron con la tinción regresiva, en donde posteriormente a desparafinar con calor y xilol al 100%, se hidrató el tejido con alcoholes graduados 100-70% en 10%. Posteriormente, se pusieron las laminillas por 5 minutos en Hematoxilina Harris después se pasó por alcohol ácido, cloruro de amonio para quitar el exceso de hematoxilina y permitió que los núcleos se tiñeran de color púrpura-azul; se tiñó con eosina amarillenta por

5 minutos y se deshidrató en un gradiente de alcoholes 70-100% en 10%. Finalmente con xilol se removió la resina y se montó.

TINCIÓN DE PAS (Ácido periódico de Schiff)

Ésta tinción permitió identificar el glucógeno acumulado en el hígado. La reacción del ácido periódico, oxidó selectivamente los residuos formando aldehídos que reaccionaron con el reactivo de Schiff dando una coloración púrpura-magenta.

La técnica se emplea principalmente para teñir estructuras que contienen grandes porciones de hidratos de carbono (glucógeno, glucoproteínas, proteoglicanos).

Las laminillas se desparafinizaron e hidrataron, se oxidaron en solución de ácido periódico por 5 minutos y posteriormente se lavaron en agua destilada. Posteriormente se colocaron en el reactivo de Schiff por 15 minutos y después se pusieron en agua por 10 minutos. Se contra tiñeron con hematoxilina de Mayer y se lavaron en agua corriente, se volvieron a deshidratar en alcoholes hasta llegar al xileno y se montaron.

ROJO OLEOSO EN PROPILLEN-GLICOL

Al extraerse el hígado se embebió el tejido con Tissue-Tek OCT (Optimal Cutting Temperature), que es un compuesto que permite la congelación del tejido para asegurar el corte a temperatura óptima y se emplea para el diagnóstico in vitro. Una vez embebido el tejido en tissue-tek se congeló. Los cortes de los tejidos para realizar las tinciones se realizaron con ayuda del criostato.

Preparación de la solución de rojo oleoso: se disuelven 0.7 g de rojo oleoso O en 100 mL de propilen-glicol absoluto con agitación constante, calentar a 100° C por 10 minutos. Se filtra en caliente y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Se hicieron cortes seccionales a 10 μm y se colocaron en agua destilada, se escurrieron las laminillas y se colocaron en propilen-glicol al 100% por 5 minutos para deshidratar completamente el tejido. Posteriormente se colocaron las laminillas en propilen-glicol al 85% por 3 minutos en agitación suave. Se lavaron las laminillas con agua destilada y posteriormente se colocaron en hematoxilina, se volvieron a lavar con agua destilada. Finalmente,

se montaron con gelatina glicerizada. El tejido que contenga lípidos se teñirá de color rojo, mientras que en color azul se observarán los núcleos.

EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS BILIARES

La extracción de lípidos en hígado nos permitió determinar el contenido de colesterol y triglicéridos. Los lípidos se extrajeron empleando el método de Folch. Posteriormente se determinó colesterol y triglicéridos por medio de un método colorimétrico enzimático empleando el Kit DiaSys de Diagnostic Systems International con el analizador automatizado Technicon ames RA-50 Chemistry Analyzer. Asimismo se determinará el tipo de los ácidos biliares que se encuentran en la vesícula biliar y en heces.

MÉTODO DE FOLCH

Esta técnica permite la obtención del contenido de colesterol y triglicéridos en tejidos. El tejido es homogenizado con una solución de metanol:cloroformo (1:2) y agua destilada, seguido de mezclar con el cloroformo.

TÉCNICA

- Se pipetea 3 mL de solución $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2) y 800 μL de agua destilada en un tubo esmerilado.
- Se agregan de 0.088 – 0.092 g de hígado, se homogeniza manualmente con un émbolo.
- Una vez homogenizado se le añade con una pipeta de vidrio 1 mL de CHCl_3 y se agita en el vórtex.
- Se centrifuga a 3500 rpm a 4 °C por 5 minutos.
- Se elimina la fase superior con una pipeta pasteur.
- Con una micropipeta se retira la fase inferior y se almacena en un tubo con rosca.
- Se evapora con nitrógeno.
- Se almacena a -18 °C.

Posteriormente para poder cuantificar la concentración de colesterol y triacilglicéridos de las muestras, éstas se rehidrataron con isopropanol/tritón.

CROMATOGRAFIA DE GASES

Para la obtención de la bilis, se rompió la vesícula biliar y se recuperó la bilis. La bilis se diluyó en 500 μL de solución salina y se le adicionaron 125 μg de ácido hiodesoxicólico (estándar interno). Posteriormente, se adiciona 1 mL de KOH 1M y se incuba a 90° C por espacio de 4 h.

La primera extracción es de los esteroides neutros, a través de dos extracciones con 2 mL de hexano cada una, se mezcla y elimina la fase orgánica. La fase acuosa se acidifica con HCl concentrado (500 μL) y los ácidos biliares se extraen a través de tres extracciones con dietileter con 2 mL cada uno, recuperando la fase éter.

Se evaporó bajo corriente de nitrógeno. A continuación se metila adicionando 650 μL de dimetoxipropano, 950 μL de metanol y 50 μL de HCl metanólico 3M. Se incubó a 50°C por 45'. Se remueven los solventes con nitrógeno y se disolvió el residuo en 150 μL de Sylon (HMDS - hexametildisilazano-, TMCS -trimetilclorosilano- y piridina).

Posteriormente, se incubó a 90°C por 1h y se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, se disolvió en 250 μL de decano y mezcló por 10'. Se centrifugó por 10' a 4000 rpm y se traspasó el sobrenadante a un inserto para inyectar 1 μL en el cromatógrafo.

Las condiciones cromatográficas se realizaron con base a la técnica reportada por Keller y Jahreis¹, haciendo algunas modificaciones para nuestros propósitos.

Columna: HP-1: 30m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor. Marca J&W Scientific.

Se inyectó 1 μL , con inyección tipo split en una relación 68:1. El flujo de la columna fue de 1.5 mL/min empleando helio como gas acarreador.

CONDICIONES

Inyector: 280°C

Horno: Rampa

150°C por 5'

240°C → 40°C/minuto

255°C → 1°C/minuto

270°C → 4°C/minuto

278°C → 1°C/minuto

278 °C por 9'

290 °C → 40 °C/minuto

290 °C por 5'

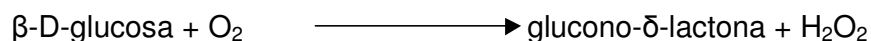
Detector: 300 °C

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

La concentración de glucosa en sangre, se analizó por medio del glucómetro (YSI2700, Yellow Spring). Las determinaciones en suero de colesterol y triacilglicéridos se realizaron por un método colorimétrico enzimático empleando el Kit DiaSys de Diagnostic Systems International con el analizador automatizado Technicon ames RA-50 Chemistry Analyzer. La concentración de insulina, leptina y glucagon, se analizó por medio sistema Luminex empleando la técnica xMAP.

TÉCNICA GLUCÓMETRO YSI2700

El glucómetro YSI2700 se basa en uso de tres membranas, de las cuales una de ellas contiene enzimas inmóviles en donde se lleva a cabo la reacción de oxidación para determinar la concentración de glucosa de la muestra. La determinación de la glucosa se lleva a cabo a través dos reacciones, la primera reacción la glucosa es oxidada por la oxidasa, obteniéndose glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como se observa en la siguiente reacción.



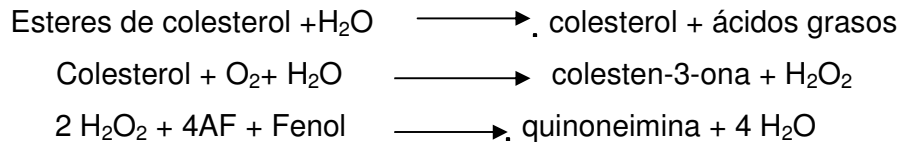
Una vez que se obtiene el H_2O_2 , es oxidado en el ánodo de platino produciéndose iones de hidrógeno, oxígeno y electrones (como se observa en la siguiente reacción), siendo este flujo de electrones lo que permite la determinación de la concentración de glucosa.



MÉTODO COLORIMÉTRICO ENZIMÁTICO

El principio para la determinación de triacilglicéridos, es que el glicerol liberado en la hidrólisis de triacilglicéridos por la acción de la lipoproteína lipasa se convierte por la acción de la glicerol cinasa en glicerol-3-fosfato, éste se oxidó por la glicerolfosfato oxidasa en fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrogeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida el cromógeno (4-aminoantipirina/p-clorofenol) en un compuesto de color rojo.

La determinación de colesterol se basa en que los ésteres de colesterol se hidrolizan por la acción de la colesterol éster hidrolasa liberándose colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente junto con el producido por esta reacción se oxida por la acción de colesterol oxidasa en Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de la peroxidasa, oxida el sistema cromógeno (4-aminoantipirina/fenol) en un compuesto de color rojo. La reacción que se lleva a cabo es como la que se muestra a continuación:

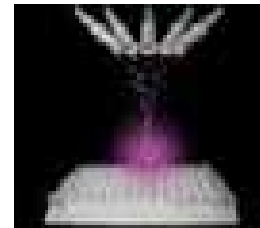


SISTEMA LUMINEX

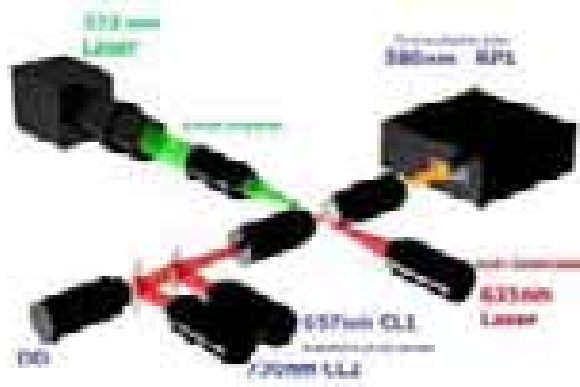
El sistema de Luminex es una combinación de tres tecnologías esencialmente xMAP. La primera es de microesferas xMAP, una familia de 100 microesferas de poliestireno de 5.6 micras teñidas fluorescentemente, que actúan como indentificadores y superficies sólidas para construir el ensayo. La segunda es un instrumento basado en un flujo de citometría, analizador Luminex, el cual integra las claves de la detección de los componentes xMAP como: láser, óptico, fluidos avanzados y procesadores de señales de velocidad digital. El tercer componente es el software IS 2.3, el cual está diseñado para la adquisición de información basada en un templado con una información de análisis de regresión.

El xMAP es una técnica que emplea microesferas de poliestireno de 5.6 micras, las cuales se encuentran teñidas internamente con fluoróforos rojos e infrarrojos. Empleando diferentes intensidades de los dos colorantes para los diferentes lotes de microesferas, cada microesfera tiene una marca determinada por su mezcla rojo/infrarrojo.

La superficie química de las microesferas de xMAP permiten un acoplamiento químico simple de reactivos tales como, anticuerpos, oligonucleótidos, péptidos o receptores. En la detección del multicomplejo xMAP se emplea el sistema Luminex 200, utilizando una plataforma de 96 pozos. Ésta

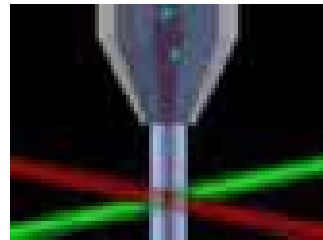


técnica
fluidos se basa
de citometría de
causan el
las
suspendidas
solo archivo
pasen por la
detección, permitiendo así que las partículas puedan ser medidas discretamente.



avanzada de
en los principios
flujo, que
movimiento de
microesferas
alineadas en un
antes de que
cámara de

La mezcla de microesferas están acopladas a la captura específica de anticuerpos que se encuentran en cada pozo de la placa. Durante la primera incubación, los analitos blanco son capturados por las microesferas en suspensión. Posteriormente al lavado, se añade a la placa un cóctel de anticuerpos de detección acoplados a biotina, y finalmente se añade el reactivo reportero (ficoeritrina-estreptavidina).



Las microesferas diluidas en una cubierta líquida cruzan dos rayos de luz láser, uno a la vez. Excitadas por el láser rojo a 635 nm, los dos colorantes embebidos en las microesferas emiten a diferentes ondas de luz: 657 nm y 730 nm. El tercer colorante fluorescente, ficoeritrina se excita a 532 nm por el reportero láser verde y emite a 580nm.

El aparato reporta en MFI la mediana de 50-80 microesferas de cada grupo para calcular la concentración de cada analito en la muestra.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El RNA total de hígado se aisló por el método de Chomczynski y Sacchiⁱⁱ. Para comprobar la integridad se realizó una electroforesis 5 µg de RNA en un gel de formaldehído-agarosa al 1%.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR TIEMPO REAL

Se cuantificó la expresión de los genes involucrados en la transcripción de las enzimas reguladoras de la excreción de los ácidos biliares en hígado: LXR α , CYP7A1, CYP27, FXR, FAS, SHP, BSEP, ABCA-1, SCD1, SREBP-1c y SREBP-2, se realizará empleando la técnica PCR tiempo real usando el equipo de sistema de detección de secuencias ABIPRISM 7000 de Applied Biosystems. La detección se realizó con ensayos multiplex usando sondas TaqMan para cada gen y actina y 18S como control endógeno.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La importancia de la PCR (Polymerase Chain Reaction) radica en la posibilidad de amplificar millones de veces una secuencia específica de DNA. El principio de la PCR consiste en determinar la secuencia específica y seleccionar oligonucleótidos o indicadores complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a la secuencia específica, a partir de los cuales se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador.

La PCR es una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA en particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de DNA y así poder analizar el RNA mensajero con el fin de estudiar la expresión de un gen específico. La PCR se fundamenta en la propiedad de la DNA polimerasa para replicar las hebras de DNA, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación, a continuación se deja que vuelvan a unirse a la DNA Taq polimerasa, para que vuelvan a duplicarse. La técnica de PCR considera los siguientes parámetros:

1. Sustrato abundante de iniciadores y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)
2. Fuente renovada de DNA polimerasa.

3. Ciclos periódicos de cambio de temperatura.

Éstos permitirán la desnaturalización del DNA a 100%, alineamiento de los iniciadores con la secuencia de interés entre 50-65°C, y la síntesis del DNA a 72°C. Estas temperaturas pueden variar de acuerdo a las condiciones de la reacción.

Los ciclos de amplificación del DNA son limitados por la concentración de los sustratos y la actividad enzimática, por lo que la amplificación durante 30 a 50 ciclos tiene una eficiencia del 60 al 85%. El poder de amplificación es tan alto que los más pequeños contaminantes pueden dar resultados falsos-positivos, por lo que el material y las soluciones se deben estar bajo controlⁱⁱⁱ.

En la reacción de la transcriptasa reversa (RT), se sintetiza una cadena de DNA complementario (DNAc) a partir de una cadena simple de RNA, se emplea oligo dT que es una secuencia de 12-18 nucleótidos de Timina que se une por complementariedad a la cola de poli-A del RNAm, formándose una orquilla que es reconocida por la transcriptasa reversa, transcribiéndose el RNAm a DNAc.

En la PCR se amplifica un fragmento de DNA utilizando indicadores específicos y la Taq polimerasa, que es estable al calor, capaz de sintetizar DNA a partir de un templado de DNAc. El PCR se compone de 3 pasos que se repiten n número de veces, hasta que el DNA queda amplificado

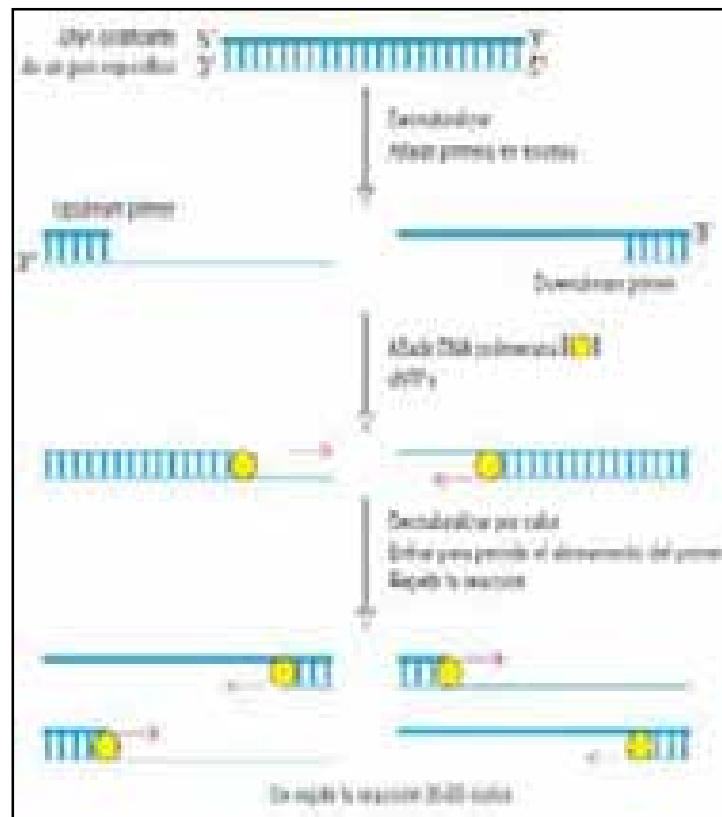
✓ **Desnaturalización:** la doble hebra de DNA se desnaturaliza a 95°C.

✓ **Alineamiento:** se lleva a cabo la hibridación, se baja la temperatura a 55°C para que se de un reconocimiento y apareamiento específico entre iniciadores y cadenas sencillas de DNA que se han separado.

✓ **Extensión:** la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores específicos a 72°C, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria.

La PCR es fundamentalmente cualitativa, debido a que llega a una meseta de amplificación por limitantes que no suelen la concentración del templado

Figura 4:
Amplificación
segmento de
medio de la
en Cadena de
Polimerasa



de un
DNA por
Reacción
la
(PCR).

La
tiempo real,
cuantificar
cantidad de

PCR
permite
la
DNA o

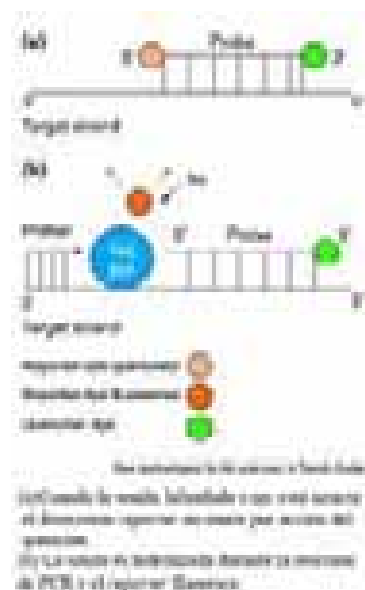
RNA amplificado, sigue la cinética de amplificación permitiendo comparar las fases logarítmicas de amplificación entre sí, y así cuantificar con precisión los templados frente a una referencia o estándar. Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de PCR, se basa en:

- Detectar y cuantificar un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

- Emplear un termociclador, que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero final de cada ciclo para cada muestra.

Se emplea una sonda que tiene unidos un fotocromo reportero y un fotocromo quencher, que híbrida en la zona intermedia entre el primer directo y el inverso. Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero cuando la sonda híbrida con la secuencia de interés/objetivo durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa separa al fotocromo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente.

Se monitorea la señal fluorescente del reportero que se va acumulando en los sucesivos ciclos de la PCR. Se consideran los datos cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido del fondo; este número de ciclo se llama ciclo umbral (Ct: threshold cycle). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es más confiable que las mediciones convencionales a punto final. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del objetivo templado: a mayor concentración de templado, menor es el valor Ct medido.



EFFECTOS DE LAS ISOFLAVONAS DE LA PROTEÍNA DE SOYA EN LA EXPRESIÓN DE LXR α .

Basándonos en los resultados previos *in vivo*, se realizaron ensayos de luciferasa para identificar si las isoflavonas tenían algún efecto en la actividad transcripcional de LXR α o LXR β . Se cuantificó la actividad de la luciferasa para

ver, por medio de estudios *in vitro*, si las isoflavonas -genisteína y dadzeína- tenían un efecto transcripcional de LXR α y LXR β ; y por otra parte, también se observó si el patrón de aminoácidos del aislado de la proteína de soya y la caseína tenían algún efecto en la actividad de los vectores de expresión y el vector reportero corto.

La transfección se realizó empleando el reactivo Lipofectamine™ 2000 de Invitrogen el cual es una fórmula con propiedad lipídica catiónica que permite una alta eficiencia de transfección. La actividad de la luciferasa se midió usando el luminómetro Infinite® 200 de Tecan. La detección se realizó con el kit de luciferrina-ATP.

Las líneas celulares que se emplearon son las HepG2 y HuH7 (células de carcinoma humano hepatocelular), las cuales se mantuvieron en cajas de cultivo celular hasta alcanzar una confluencia entre el 80-90% con un medio DMEM (por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa, al cual se le añadió antibiótico (PEST) y suero bovino fetal. Para separar las células se les agregó tripsina y se dejaban reposar por 5 minutos en el incubador, posteriormente se separaban con más medio DMEM y parte de las células se transferían a un nuevo frasco y el resto se empleaban para realizar la transfección.

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

La transfección de células eucariotas permite la introducción del material genético, de los vectores de expresión previamente clonados LXR α + 3xLXRE y LXR β + 3xLXRE, así como también nos permitió la transfección de los vectores reporteros pGL3Basic mLXR α corto (-143/+42) y pGL3Basic mLXR α largo (-4757/+1464). La cantidad de células que se colocaron en cada pozo de las placas de cultivo de 24 pozos para ser transfectadas fueron ~150 000 células HepG2 y ~70 000 células HuH7.

Las transfecciones se realizaron utilizando placas de cultivo de 24 pozos, en las cuales requieren 2 μ L de lipofectamina 2000 en 50 μ L de Opti-mem (5 minutos de incubación) y 0.5 μ g de DNA en 50 μ L de Opti-mem, se mezclaron Opti-mem/Lipofectamina 2000 y Opti-mem/DNA y se incubaron por 25 minutos. Una vez pasado este tiempo de incubación se procedió a trasfectar las células y sembrarlas en las placas de 24 pozos.

Una vez transfectadas las células se dejaron reposar por ocho horas para que se adhirieran las células posteriormente se les añadió el tratamiento respectivo, dejando las células por 16 horas con el tratamiento. Al término de éste tiempo se recolectaron las células, lisándolas con 100 μ L de detergente, se dejaban las placas en agitación por 20 minutos en el cuarto frío y posteriormente se tomaban 30 μ L de lisado celular para ponerse en la placa para la posterior lectura de la actividad de la luciferasa con ayuda del luminómetro.

Se hicieron las co-transfecciones de LXR α + 3xLXRE y LXR β + 3xLXRE, y la transfección del pGL3Basic mLXR α corto. Una vez co-transfectadas las células con los vectores de expresión se realizaron las curvas de concentración de las isoflavonas genisteína y daidzeína, y del pGL3Basic mLXR α corto con el patrón de aminoácidos de caseína y la proteína de soya.

Caseína (μ M)			Soya (μ M)		
Ala 314 473	Arg 195	Asp	Ala 460 894	Arg 430	Asp
Cys 21 213	Glu 1393	Gly	Cys 108 559	Glu 1461	Gly
His 167 625	Ile 396	Leu	His 167 617	Ile 373	Leu
Lys 492 272	Met 174	Phe	Lys 431 327	Met 87	Phe
Pro 825 327	Ser 476	Thr	Pro 477 310	Ser 495	Thr
Trp 49 520	Tyr 259	Val	Trp 73 384	Tyr 220	Val

Tabla 3: Patrón de aminoácidos séricos de la caseína y la proteína de soya.

Siendo que con el tratamiento del patrón de aminoácidos se trató de imitar el tratamiento dietario dado en los estudios *in vivo*.

ASPECTOS ÉTICOS

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 (INCMNSZ). El comité de ética del INCMNSZ se basa en la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, del Public Health Service National Institute of Health (1990).

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE DATOS

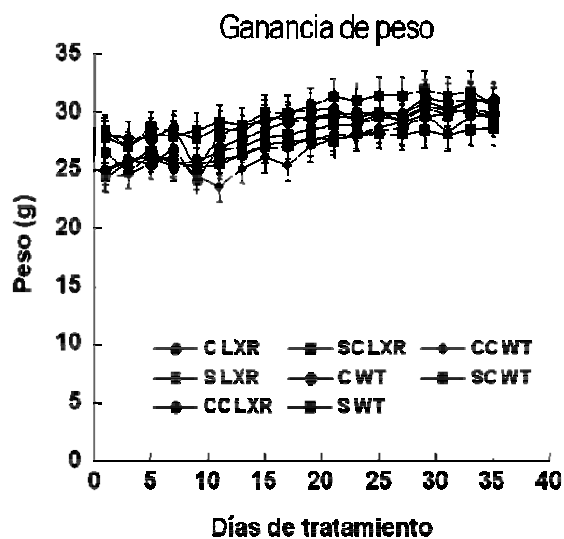
Los resultados se expresarán como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, ingestión de alimento, así como los valores obtenidos de las histologías, la extracción de lípidos y ácidos biliares, los parámetros bioquímicos y hormonales, y la determinación de la expresión génica por PCR tiempo real, serán evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La diferencia significativa entre los grupos control y experimentales será determinada mediante la prueba de Fisher usando el programa StatView (Abacus Concepts) para Macintosh.

RESULTADOS

Estudio *in vitro*

Ganancia de peso

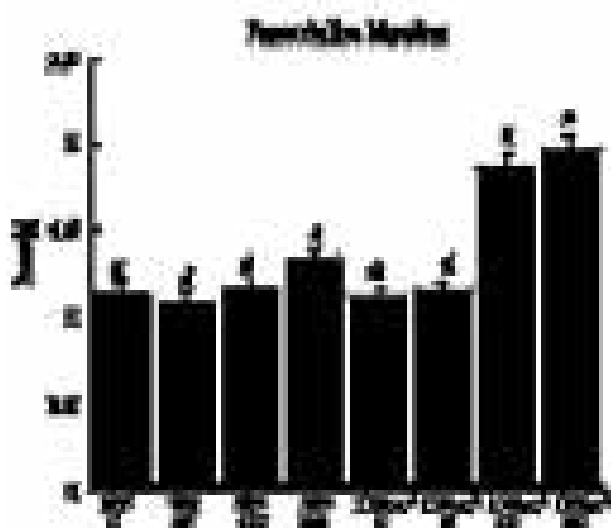
Al inicio del estudio los ratones comenzaron con un peso promedio de 26.18 ± 0.764 g, 27.63 g en $LXR\alpha^{-/-}$ y 24.72 g en los ratones silvestres (WT). Hacia el final del estudio (35 días) los dos grupos ($LXR\alpha^{-/-}$ y WT) presentaban una ganancia de peso promedio y alcanzaron los siguientes pesos 30.10 ± 0.773 g, 30.47 g entre los $LXR\alpha^{-/-}$ y 29.72 g de los WT's. Cabe notar que desde el inicio del estudio los $LXR\alpha^{-/-}$ presentaban un mayor peso que los WT's, tendencia que se mantuvo hacia el final del estudio pero la diferencia de pesos entre los grupos disminuyó; pudiéndose observar que los únicos grupos que presentaron diferencia significativa fueron los grupos $LXR\alpha^{-/-}$ y WT alimentados caseína con el grupo de WT de soya colesterol que presentaba una menor ganancia de peso.



Gráfica 1: Ganancia de peso de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se presentan como el promedio \pm error estándar de la ganancia de peso de cada uno de los grupos los grupos durante los 35 días de estudio. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$.

Peso de los hígados

Los pesos registrados de los hígados, de los diferentes grupos ($LXR\alpha^{-/-}$: Caseína, Soya, Caseína colesterol y Soya colesterol, y WT: Caseína, Soya, Caseína colesterol y Soya colesterol) se observa que los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con una dieta elevada en colesterol (+2%) presentaron un mayor peso, lo cual nos podría estar indicando una hepatomegalia



Gráfica 2: Peso de los hígados de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar del peso de los hígados por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

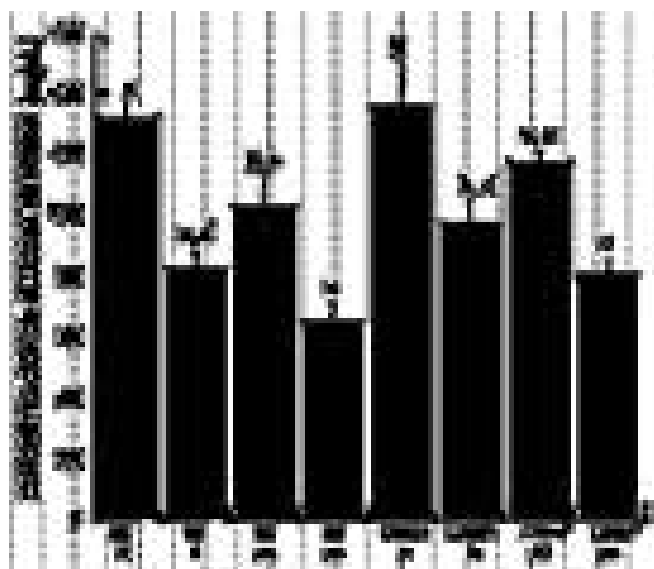
Porcentaje peso del hígado (g) / peso corporal (g)	WT C	WT S	WT CC	WT SC	$LXR\alpha^{-/-}$ C	$LXR\alpha^{-/-}$ S	$LXR\alpha^{-/-}$ CC	$LXR\alpha^{-/-}$ SCL
		3.66 ± 0.91^c	3.74 ± 0.15^c	3.94 ± 0.13^c	4.69 ± 0.14^b	3.68 ± 0.25^c	3.84 ± 0.19^c	6.28 ± 0.21^a

Tabla 4: Porcentaje del peso del hígado (g) / el peso corporal (g) de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Se presenta la relación del peso del hígado con respecto al peso corporal de los animales. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Concentración de glucosa, triacilglicéridos, colesterol, insulina, glucágon y leptina séricas

En la siguiente gráfica (3) se observa la concentración de glucosa plasmática en ayuno entre los grupos silvestres (caseína, soya, caseína colesterol y soya colesterol) y en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ (caseína, soya, caseína

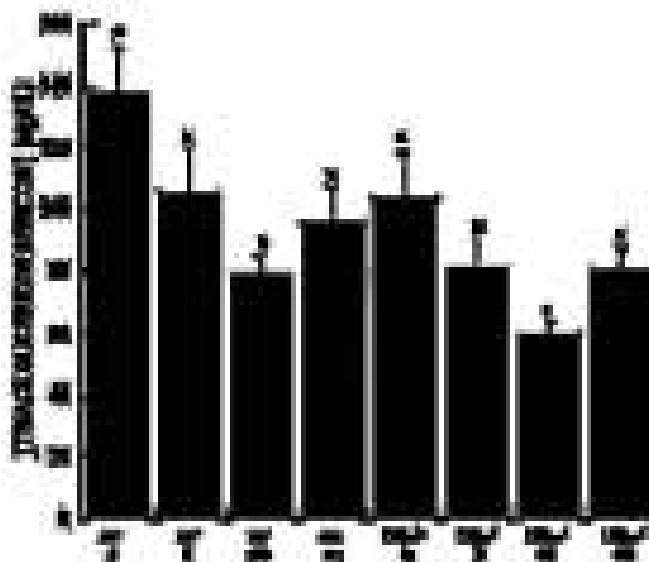
colesterol y soya colesterol). Como se puede observar entre los grupos alimentados con caseína tanto WT como $LXR\alpha^{-/-}$ presentan glucosas más elevadas con respecto a su subgrupo -silvestres y mutados- (133.1 ± 5.66 mg/dL y 136.9 ± 13.93 mg/dL, respectivamente), mientras que los ratones alimentados con soya colesterol, WT y $LXR\alpha^{-/-}$, demuestran la concentración de glucosas séricas más bajas (65.82 ± 5.33 mg/dL y 81.3 ± 4.5 mg/dL, respectivamente). Siendo que en los ratones silvestres y los mutados, no existe diferencia significativa entre los alimentados con caseína y caseína colesterol (133.1 ± 5.66 mg/dL y 136.9 ± 13.93 mg/dL), así como entre los de soya y soya colesterol (82.84 ± 5.65 mg/dL y 98.29 ± 7.23 mg/dL), respectivamente.



Gráfica 3: Concentración de glucosas séricas de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de glucosa sérica por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

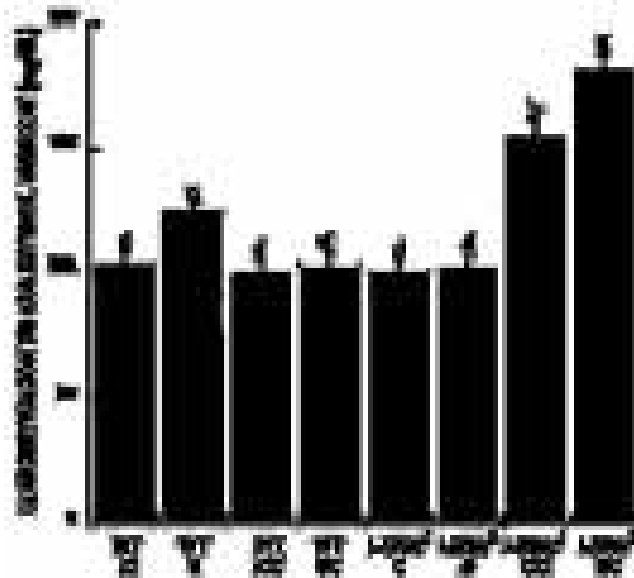
En la gráfica 4, la concentración de triacilglicéridos séricos demuestran diferencias significativas en los 8 grupos. En promedio, se puede observar como los grupos alimentados con caseína, WT y $LXR\alpha^{-/-}$, presentaron las concentraciones de triacilglicéridos en suero más elevadas (137.54 ± 22.49 mg/dL y 102.66 ± 15.28 mg/dL, respectivamente); mientras que en los grupos alimentados con una dieta de caseína+colesterol, tanto silvestres como mutados (79.13 ± 6.41 mg/dL y 59.45 ± 3.6 mg/dL, respectivamente), don una menor concentración de triacilglicéridos en suero en comparación con el resto de los grupos. Siendo que entre WT y $LXR\alpha^{-/-}$, en promedio los $LXR\alpha^{-/-}$

presentaron de ~19.05 a 26.29% una menor concentración de triacilglicéridos en suero con respecto al tratamiento dietario dado.



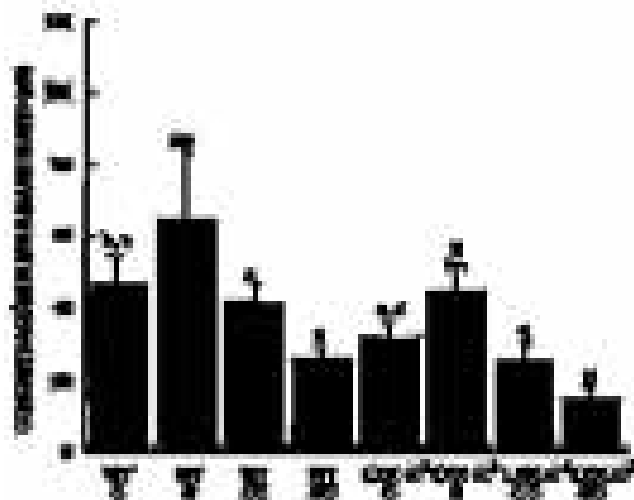
Gráfica 4: Concentración de triacilglicéridos séricos de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se presentan como el promedio \pm error estándar de la concentración de los triacilglicéridos séricos por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

La gráfica 5 demuestra la concentración de colesterol sérico de los ocho grupos registrados. Como se puede observar, solo los grupos $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con una dieta rica en colesterol demostraron un incremento es significativamente mayor al resto de los grupos, siendo que el grupo alimentado con caseína+colesterol registraron 153.89 ± 6.26 mg/dL, mientras que en el grupo alimentado con soya+colesterol fue de 180.46 ± 7.24 mg/dL. Cabe notar que la concentración de colesterol sérico, no sobre paso los 200 mg/dL. No obstante, el resto de los grupos registraron valores ~ 100 mg/dL a excepción del grupo silvestre alimentado con soya el cual presentó una concentración de 123.62 ± 4.12 mg/dL.



Gráfica 5: Concentración de colesterol sérico de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$
: Los valores se presentan como el promedio \pm error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

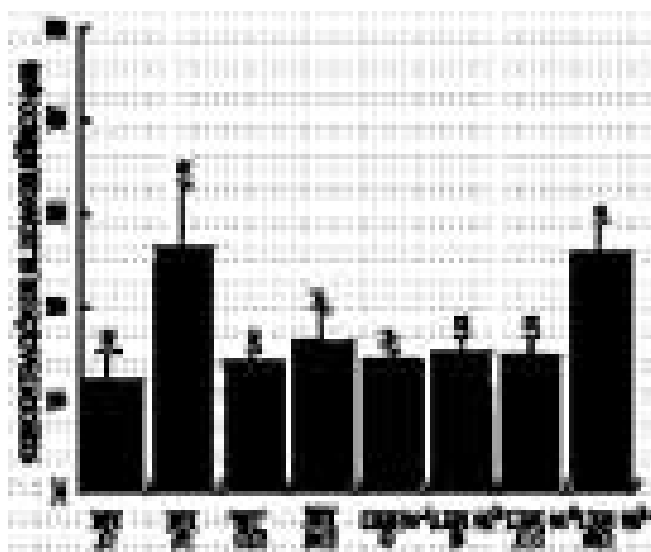
La gráfica 6 se observa la concentración de insulina en suero de los ocho grupos registrados. Como se puede observar, que no existió una gran diferencia entre los valores registrados. Siendo que ambos grupos de ratones silvestres y $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con una dieta soya registraron los valores más altos en sus respectivos grupos, y los más bajos cuando contaban con una dieta de soya más colesterol.



Gráfica 6: Concentración de insulina en suero de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$
: Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de

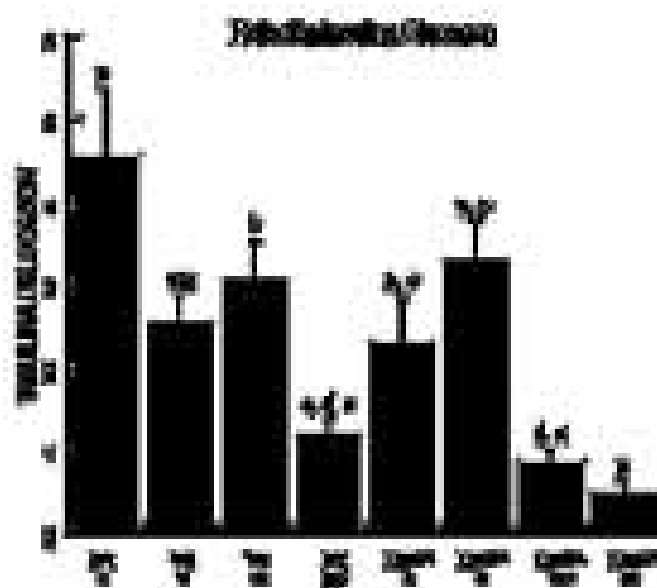
colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

La gráfica 7 se presentan las concentraciones en suero del glucagon, en donde se puede observar un aumento significativo del glucagon sérico en el grupo de ratones silvestres alimentados con la proteína de soya, así como también se observa este aumento significativo en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con una dieta soya más colesterol.



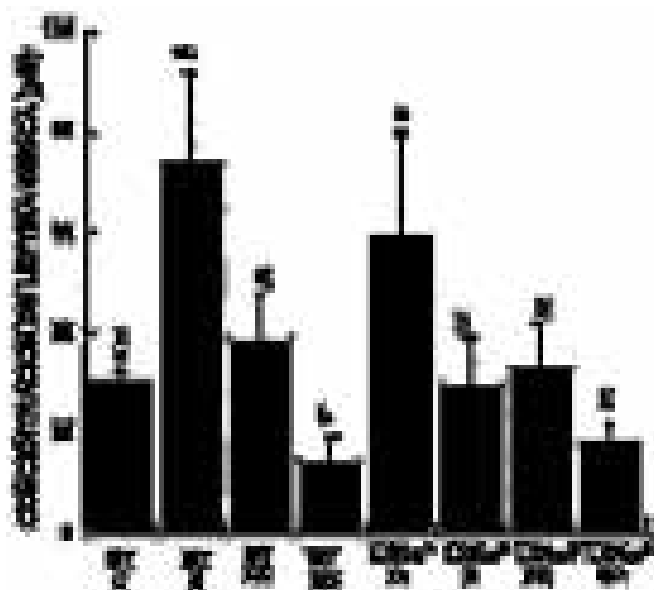
Gráfica 7: Concentración de glucagon sérico de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$
: Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de glucagon sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

La gráfica de relación insulina-glucagon nos demuestra como en los ratones silvestres alimentados con la proteína de soya presentan una diferencia significativa, en los ratones alimentados con proteína de soya ésta relación es menor en comparación con los ratones alimentados con caseína de los respectivos tratamientos, dietas normales y altas en colesterol. En los ratones mutados en $LXR\alpha$ la relación insulina-glucagon que presentan respectivos grupos, dietas normales y dietas altas en colesterol, no se observan diferencias estadísticas dependiendo el tipo de proteína.



Gráfica 8: Relación Insulina-Glucagon sérico de los ratones silvestres y mutados LXRα^{-/-}. Los valores se presentan como el promedio ± error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una p<0.05 donde a>b.

En la siguiente gráfica se presenta la concentración de leptina sérica de los ocho grupos. Se puede observar una diferencia significativa en los ratones silvestres alimentados con proteína de soya siendo menor en los ratones alimentados con dietas altas en colesterol. Mientras que en los ratones mutados en LXRα estas diferencias significativas desaparecen entre los grupos con dietas normales y dietas altas en colesterol con los diferentes tipos de proteína.



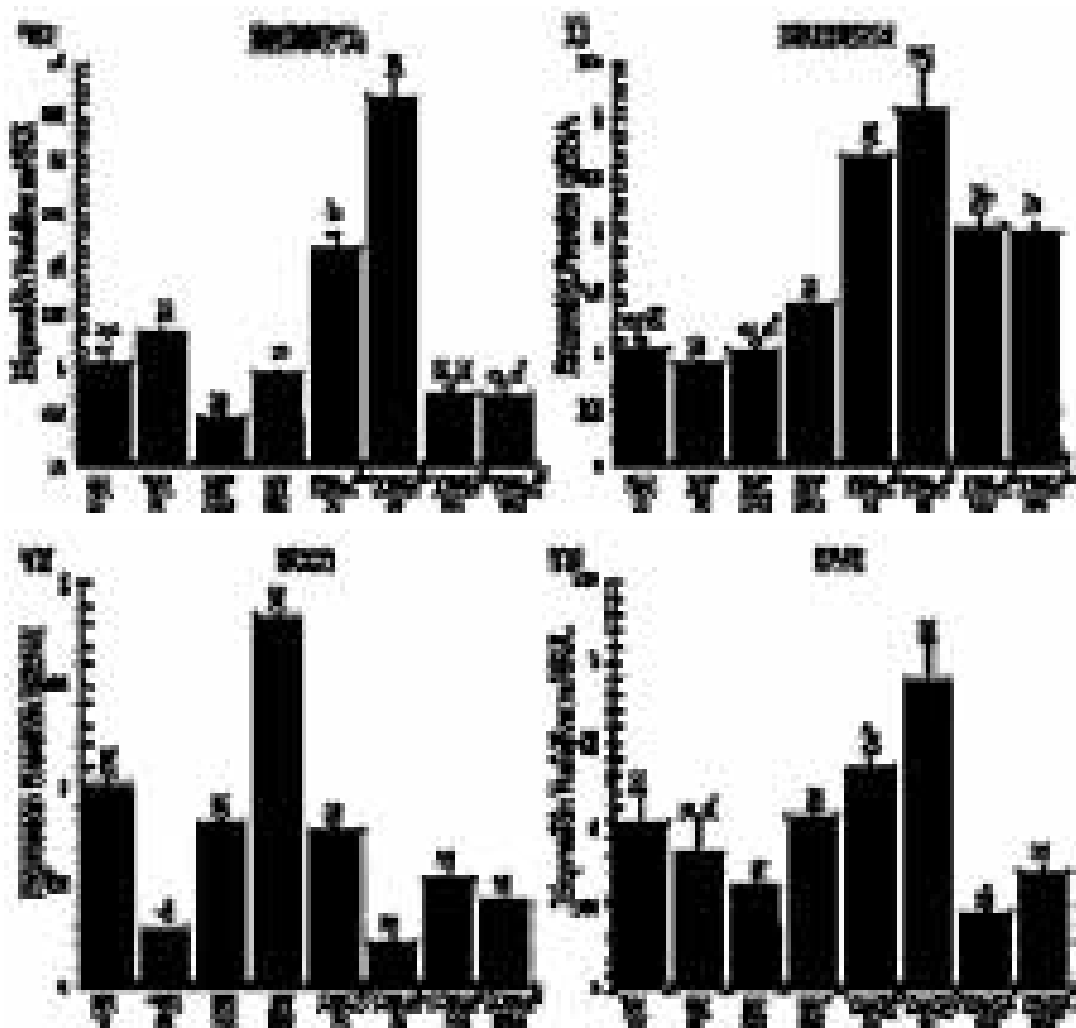
Gráfica 9: Concentración de leptina sérica de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Expresión relativa de mRNA de los genes relacionados con $LXR\alpha$.

Las gráficas que se presentan a continuación demuestran la expresión relativa del mRNA que se obtuvo en los diferentes genes involucrados en el metabolismo de lípidos y colesterol, en este bloque se demuestra la expresión relativa de los genes bajo el control de $LXR\alpha$. Como se puede observar el tratamiento dietario altera la expresión génica de los genes analizados, en el caso de SREBP2 se observa como en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ la soya aumenta significativamente la expresión relativa de éste así como también la caseína aunque en una menor grado, así mismo en el caso de las dietas altas en colesterol, se observó como esta expresión relativa disminuyó por debajo del grupo control (ratones silvestres con caseína) y las dietas sin colesterol.

Por otro lado, observamos que en el caso de SREBP-1c la ausencia de $LXR\alpha$ aumentó la expresión de éste en los cuatro grupos, mientras que en los ratones silvestres presentaron una expresión relativa similar al grupo control. En el caso de SCD1, podemos observar que la ausencia de $LXR\alpha$ ocasiona una disminución en la expresión relativa, principalmente en los grupos

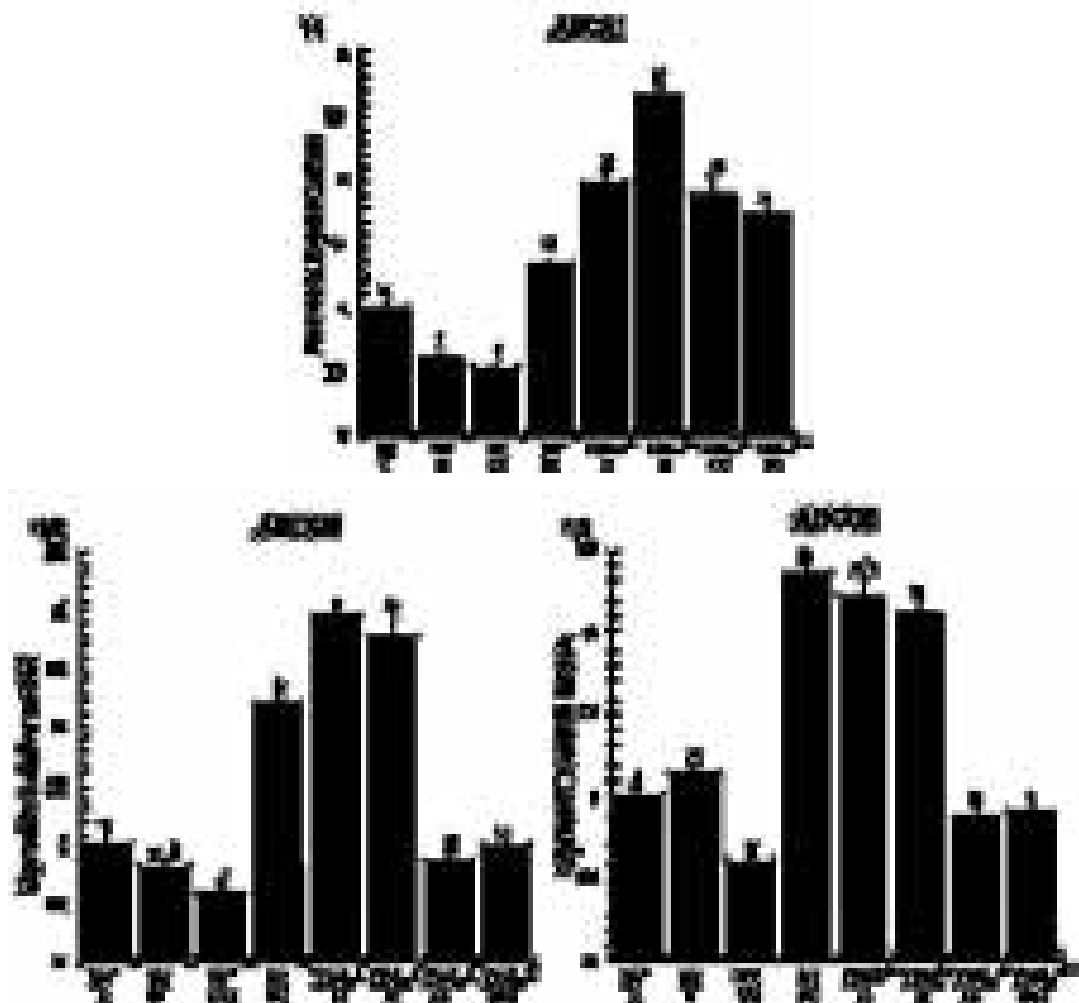
alimentados con soya y soya+colesterol. Asimismo, en el caso de FAS se puede observar que en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ existe un aumento en la expresión relativa en los grupos alimentados con caseína y principalmente con soya, mientras que en los grupos alimentados con una dieta alta en colesterol la expresión relativa de FAS se disminuye significativamente.



Gráfica 10, 11, 12, 13: Expresión relativa del mRNA de SREBP2, SREBP1c, SCD1, FAS de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se presentan como el promedio \pm error estándar de la expresión relativa del mRNA de los genes analizados por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Las siguientes gráficas demuestran la expresión relativa de mRNA de los genes involucrados en el transporte del colesterol. Como se puede apreciar en los ratones mutados en $LXR\alpha$ la expresión del mRNA de ABCA1 se encontró aumentada a comparación de los ratones silvestres. Asimismo, en el caso de

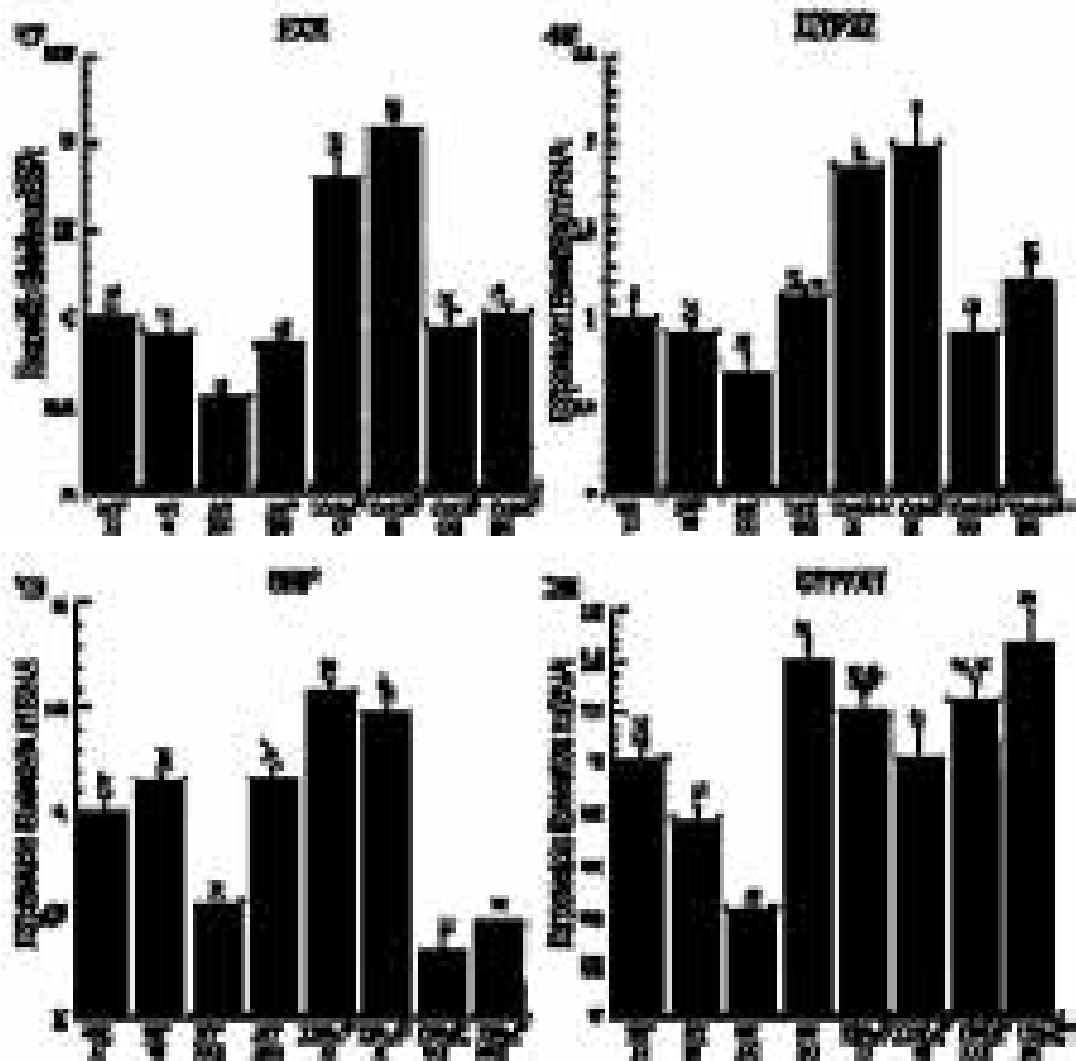
los transportadores ABCG5 y ABCG8 se puede observar como en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ hay un aumento en la expresión relativa de los grupos alimentados con soya y colesterol, así como en el grupo de los ratones silvestres alimentados con soya+colesterol; como se puede observar el patrón de expresión de estos dos genes es similar ya que estos funcionan como heterodímeros.

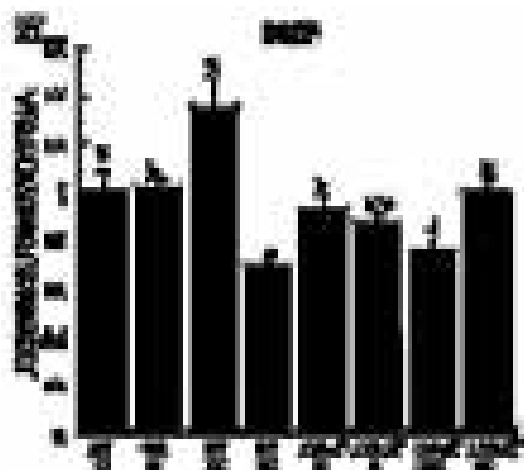


Gráfica 14, 15, 16: Expresión relativa del mRNA de ABCA1, ABCG5, ABCG8 de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la expresión relativa del mRNA de los genes analizados por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Finalmente, el siguiente bloque de gráficas presenta los genes que tiene regulación a través de FXR. Aquí se aprecia como entre los diferentes tratamientos dietarios existen diferencias significativas, el patrón observado en la expresión relativa del mRNA de FXR también se presenta en el mRNA de

CYP27 y SHP. Por otra parte, la expresión relativa del mRNA de SHP presenta una relación inversa con la expresión relativa de CYP7A1. La expresión relativa de BSEP se mantiene cercanos a la expresión relativa del grupo control en los diferentes tratamientos tanto en los ratones silvestres como en los $LXR\alpha^{-/-}$.





Gráfica 17, 18, 19, 20, 21: Expresión relativa del mRNA de FXR, CYP27, SHP, CYP7A1, BSEP de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la expresión relativa del mRNA de los genes analizados por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

A continuación se presentan las imágenes de los hígados tanto de los ratones knockout $LXR\alpha^{-/-}$ como de los ratones silvestres con los diferentes tratamientos dietarios: Caseína, Soya, Caseína Colesterol y Soya Colesterol. En cuanto a tamaño no hubo diferencia significativa, no obstante en cuanto a color y consistencia si se observó una clara diferencia, especialmente en los grupos alimentados con una dieta rica en colesterol y principalmente en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$. Una de las diferencias más notables que se observó al extraer los hígados de los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con una dieta de caseína colesterol, es que los hígados eran más grasosos presentaban una textura muy suave y esponjosa, mientras que los alimentados con una dieta de soya colesterol también se observaban bastante blancos pero presentaban un poco más de consistencia.

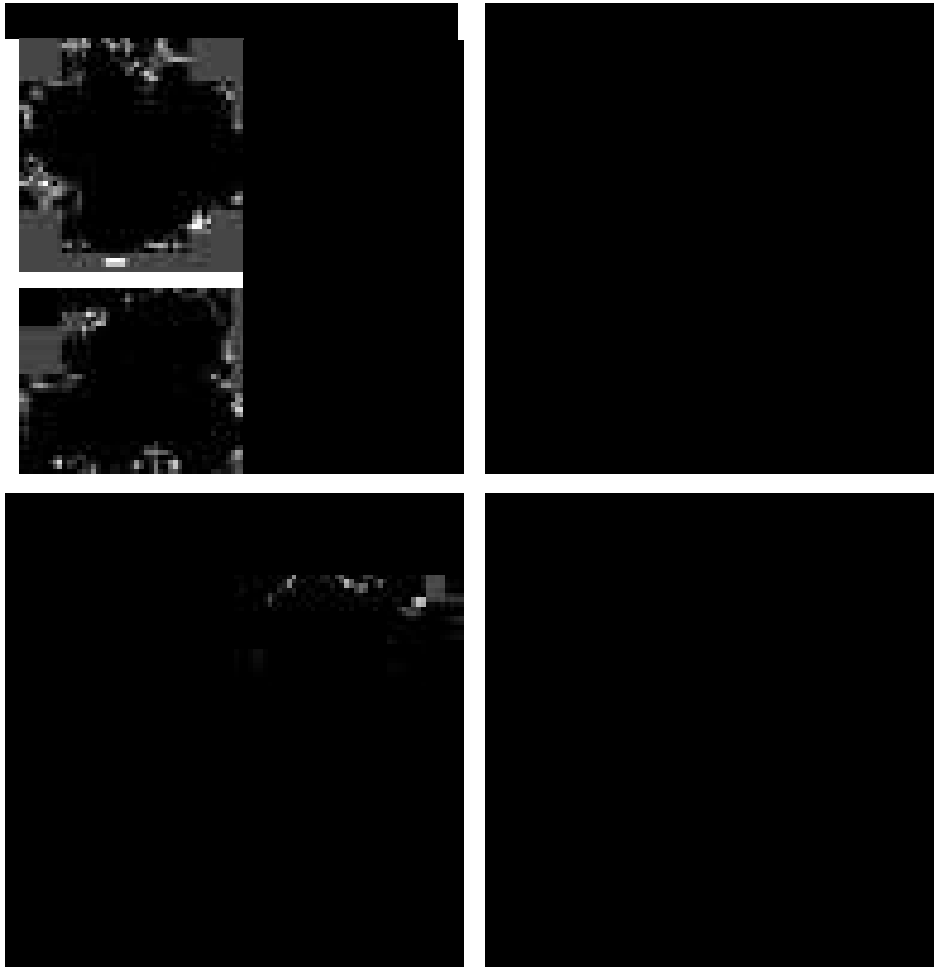


Figura 5: Paneles de los hígados representativos de los ocho grupo. Se pueden observar las diferencias que se aprecian a simple vista entre los hígados de un grupo y otro.

Como se pudo apreciar en las imágenes anteriores existieron diferencias a simple vista entre los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los ratones silvestres y los ratones mutados, a continuación se exhiben fotografías a 3 diferentes aumentos de las histologías realizadas por hematoxilina y eosina del hígado representativo de cada grupo.

Asimismo en los grupos mutados en el gen $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con los diferentes tratamientos existen diferencias en el contenido lipídico, los hígados de los ratones alimentados con caseína + colesterol demostraron un mayor contenido lipídico así como un infiltrado inflamatorio considerable indicándonos la presencia tanto de esteatosis como de cirrosis a comparación de los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con soya + colesterol que también presentan esteatosis pero una infiltración inflamatoria significativamente menor a los de caseína + colesterol.

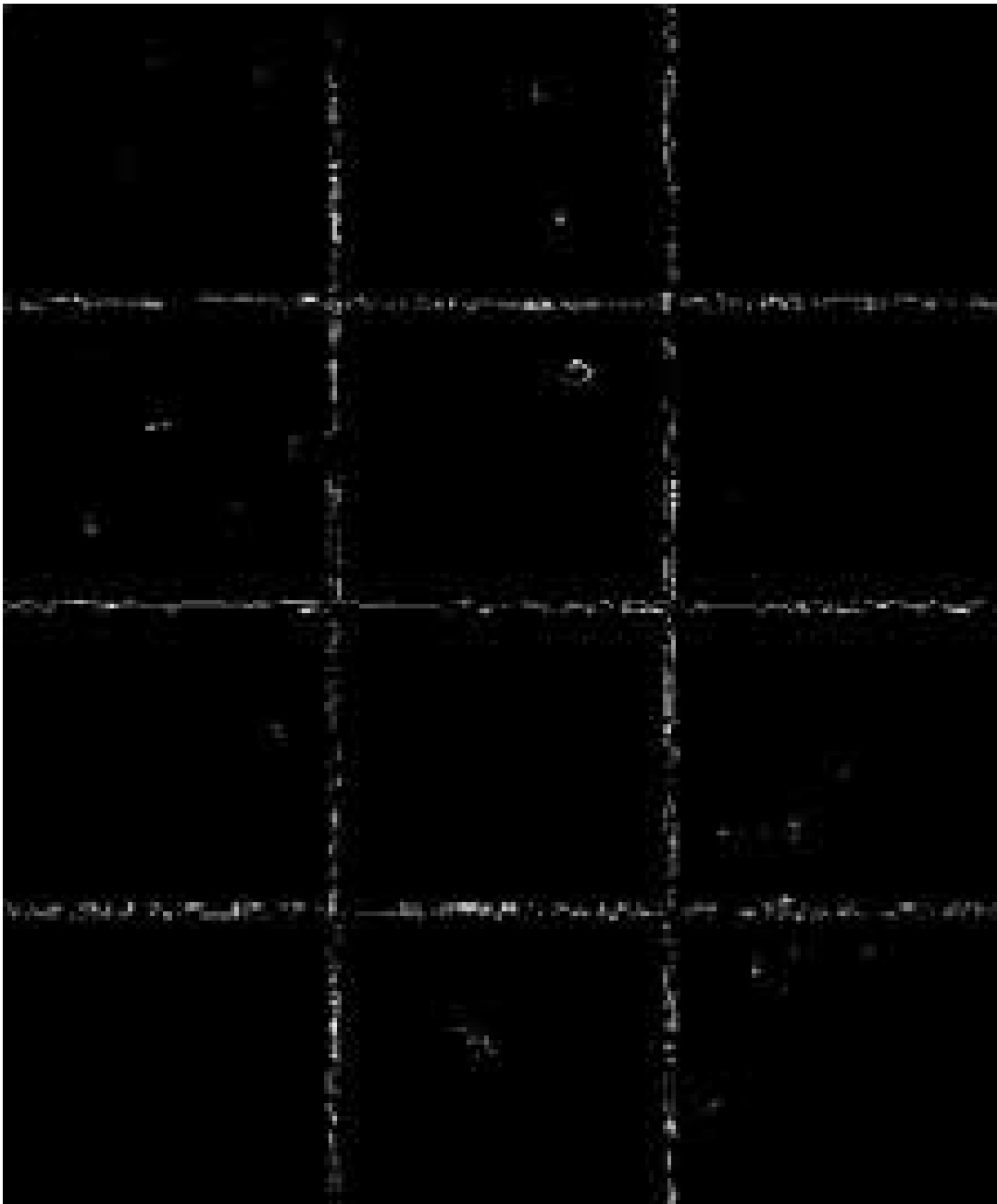


Figura 6: Histologías de los hígados por hematoxilina y eosina. Cada línea demuestra diferentes aumentos a los que se observaron las histologías, observando las diferencias entre cada corte.

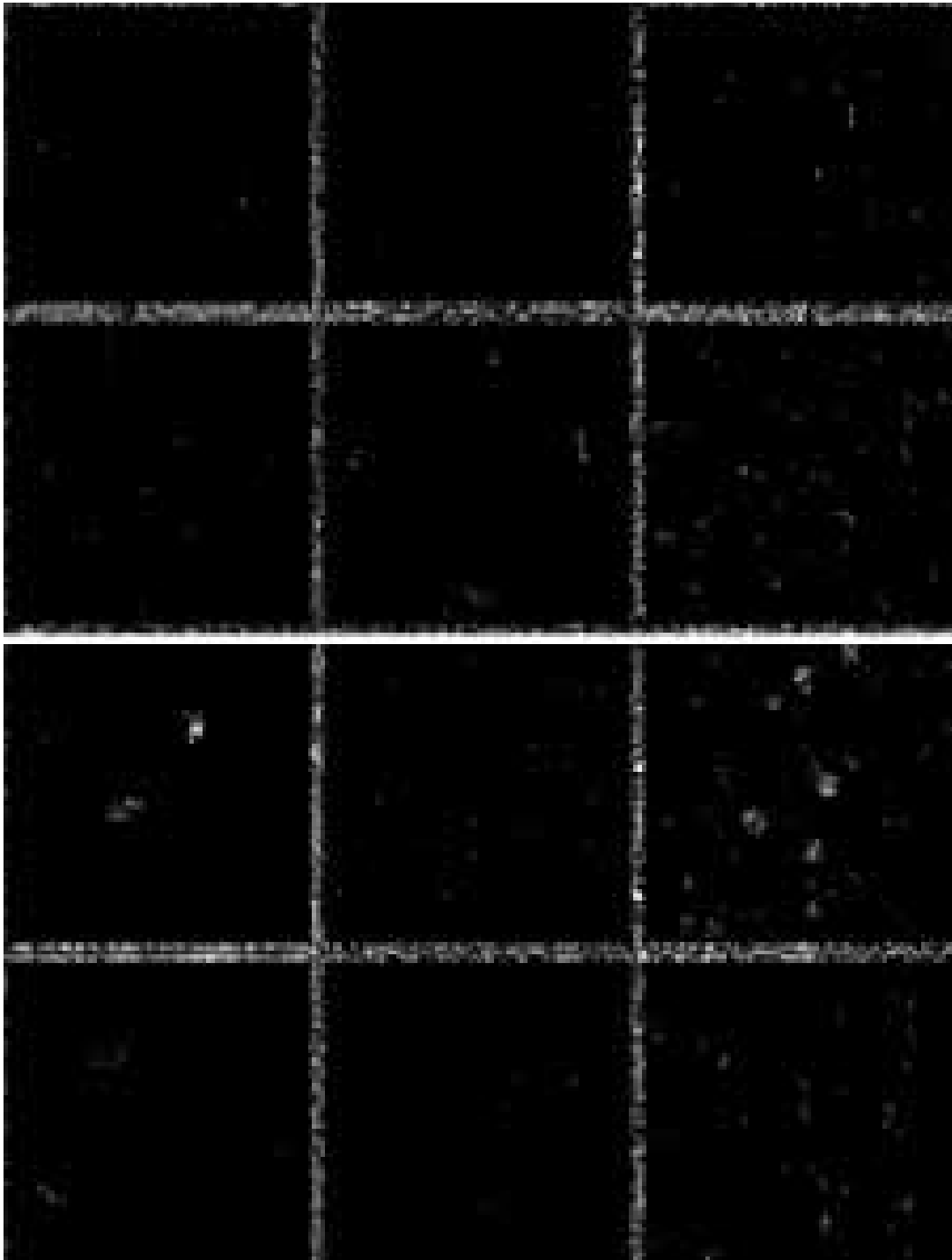


Figura 7: Histologías de los hígados por hematoxilina y eosina. Cada línea demuestra diferentes aumentos a los que se observaron las histologías, observando las diferencias entre cada corte.

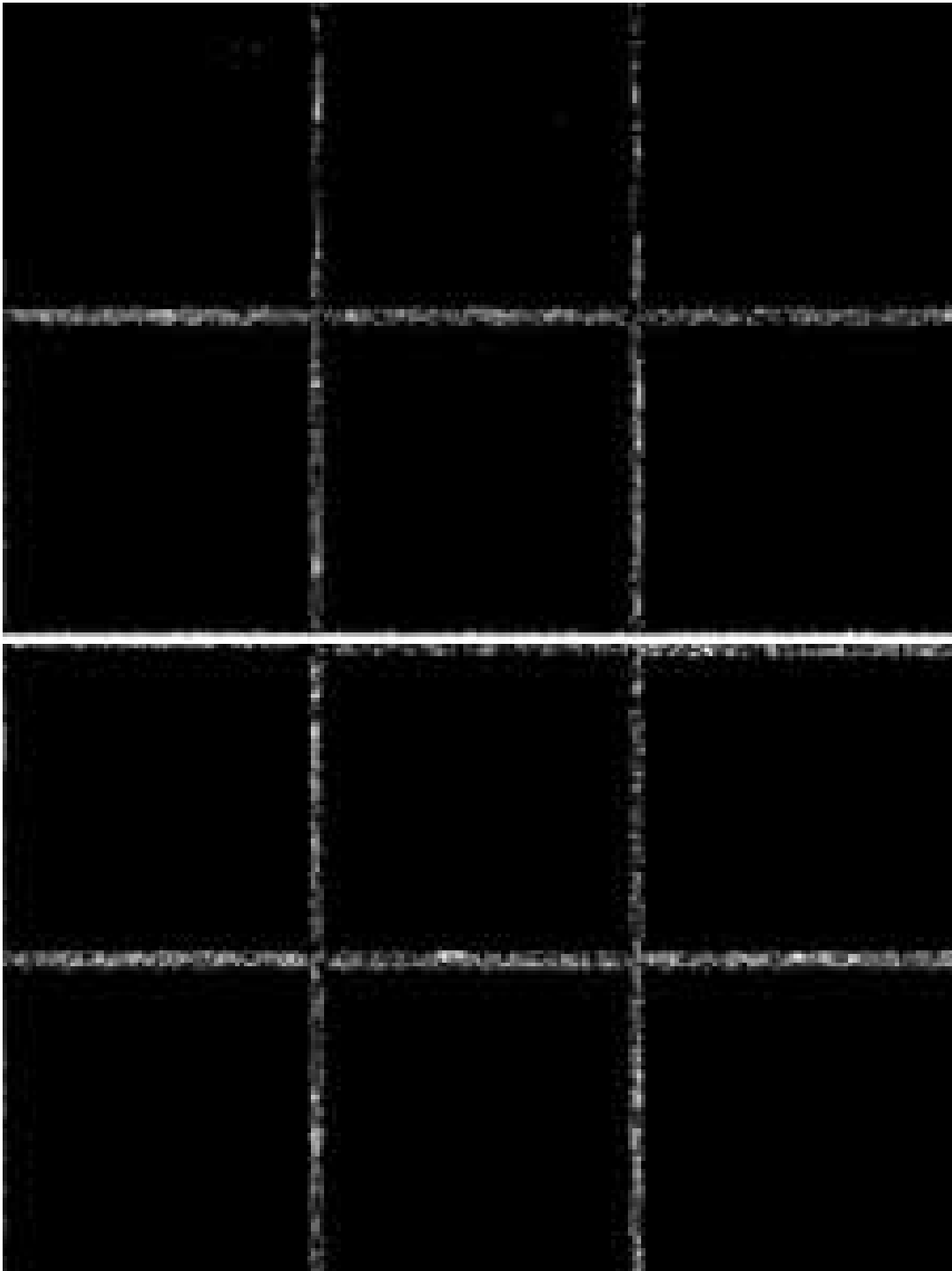


Figura 8: Histologías de los hígados por PAS. Cada línea demuestra diferentes aumentos a los que se observaron las histologías, observando las diferencias entre cada corte.

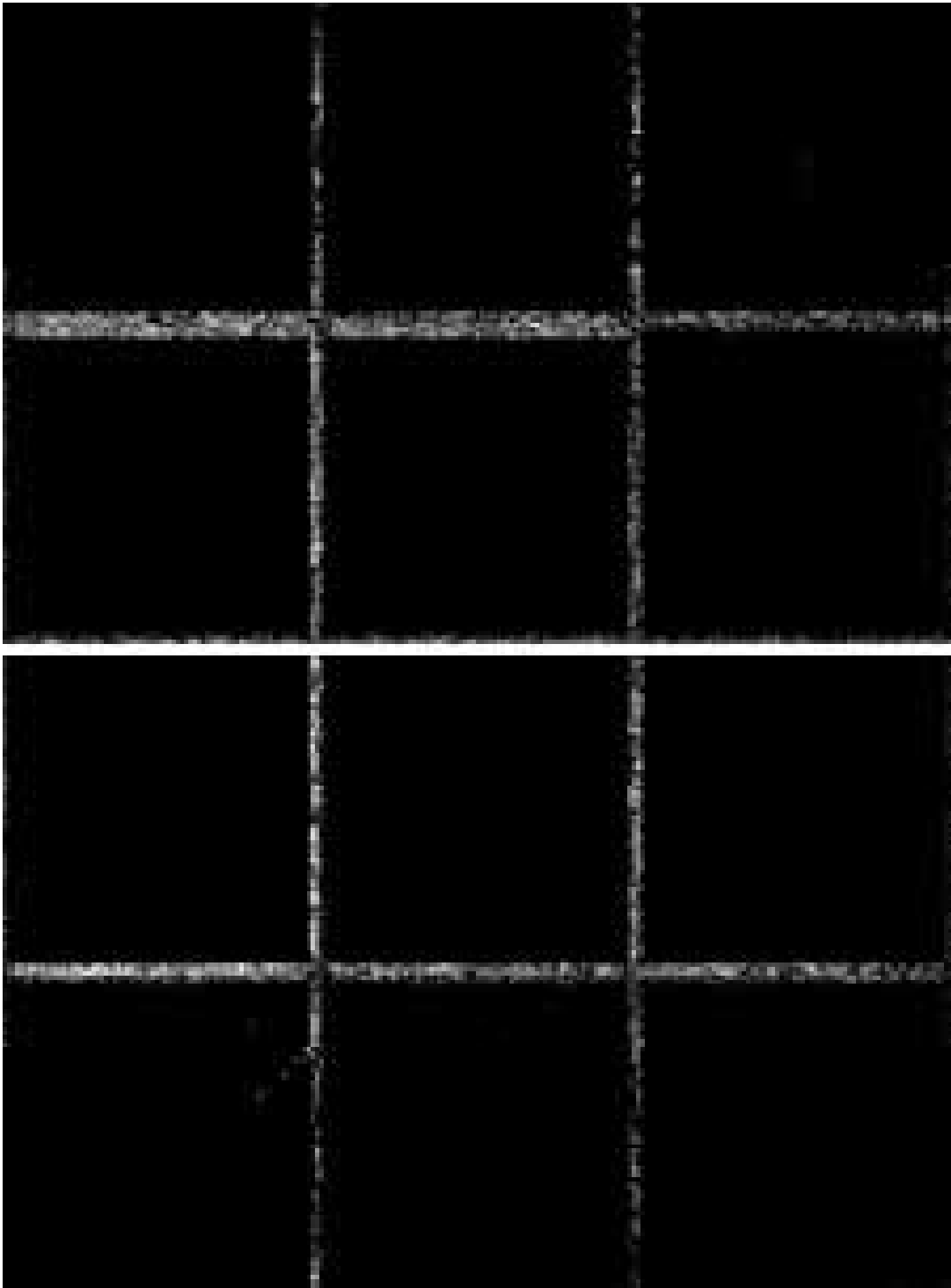


Figura 9: Histologías de los hígados por PAS. Cada línea demuestra diferentes aumentos a los que se observaron las histologías, observando las diferencias entre cada corte.

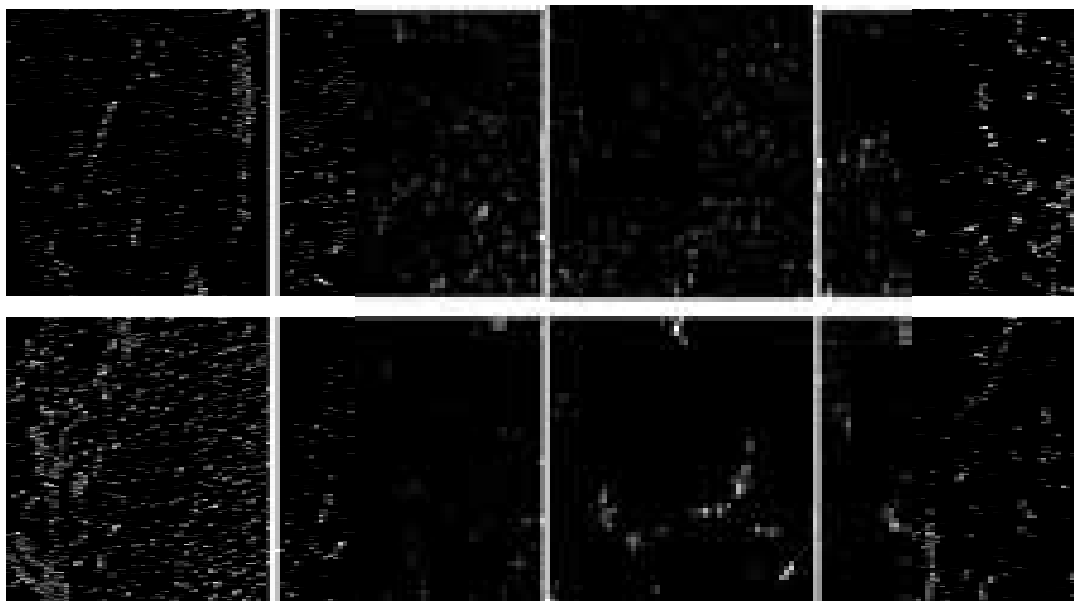


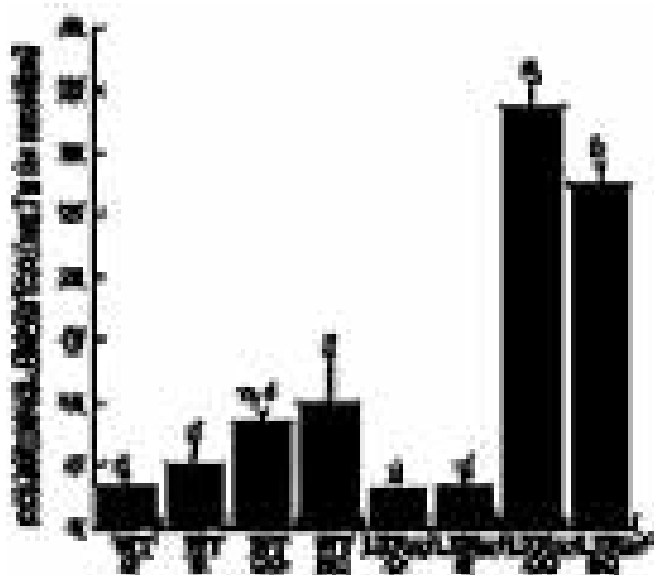
Figura 10: Histologías de los hígados por rojo oleoso. Cada bloque demuestra el aumento 10x al que se observaron las histologías, observando las diferencias entre cada corte.

Como se puede observar en los ratones silvestres, los diferentes tratamientos dietarios demostraron diferencias entre el tipo de proteína, siendo que en mientras en los ratones alimentados con caseína, se observa una mayor acumulación microvesicular de lípidos en los hepatocitos a comparación de los ratones alimentados con el aislado de la proteína de soya. Por otro lado, se observa que en los ratones alimentados con una dieta rica en colesterol, los alimentados con caseína presentan una acumulación macrovesicular de lípidos en los hepatocitos mientras que los alimentados con soya demuestran una acumulación microvesicular aun con el exceso de colesterol en la dieta.

Asimismo se puede observar las diferencias entre los diferentes tratamientos dietarios por la técnica de PAS, la cual demuestra los depósitos de glucógeno en el tejido hepático, observándose como los grupos de ratones silvestres alimentados con la proteína de soya aun con el 2% colesterol hay depósitos de glucógeno en los tejidos, lo cual no se presenta de igual forma en los ratones mutados.

Concentración de colesterol y triglicéridos hepáticos

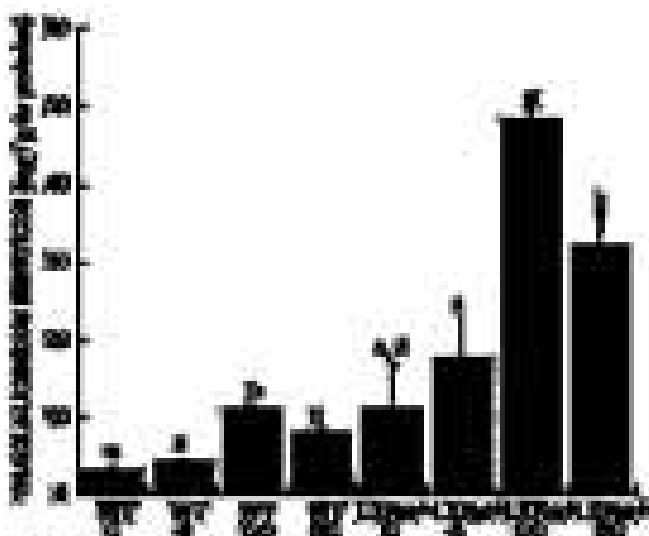
La gráfica 17 demuestra la concentración de colesterol sérico de los ocho grupos registrados. Como se aprecia en la gráfica, no hay diferencia significativa entre los ratones silvestres y mutados alimentados con caseína; asimismo se observó un aumento de ~58% en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con el aislado de la proteína de soya a comparación de los silvestres. No obstante, las diferencias significativas que se observaron entre los ratones silvestres y los mutados en $LXR\alpha$ con dietas altas en colesterol, demostraron un incremento notorio en las concentraciones de colesterol hepático por gramo de proteína, siendo que en los ratones alimentados con caseína+colesterol en los silvestres se registró $2.995\pm.22$ mg/g de proteína mientras que en los $LXR\alpha^{-/-}$ fue 33.5 ± 2.13 mg/g de proteína, por otra parte en los ratones alimentados con soya+colesterol la concentración de colesterol por gramo de proteína fue de 3.34 ± 0.61 mg/g de proteína y 27.3 ± 1.9 mg/g de proteína, respectivamente.



Gráfica 22: Concentración de colesterol hepático de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

En la gráfica 18, se presenta la concentración de triacilglicéridos hepáticos por gramo de proteína de los ocho grupos. Entre los grupos caseína, soya y soya+colesterol se puede observar que los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ presentaron ~33 a 46% menor concentración de triacilglicéridos hepáticos por gramo de proteína en comparación con los ratones silvestres. En el caso de los ratones alimentados con caseína+colesterol los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ demostraron un

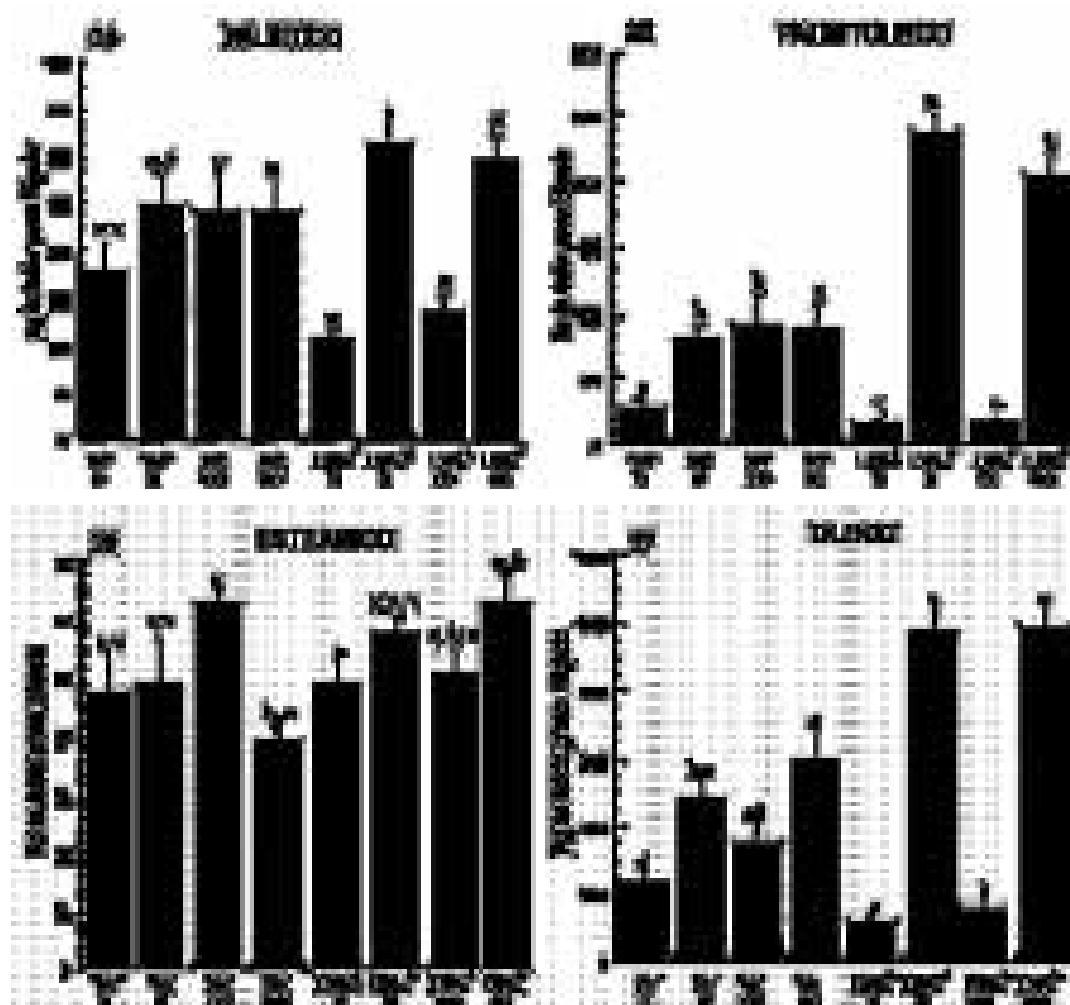
aumento significativo ~35% en comparación con los silvestres (silvestres 35.37 ± 1.65 mg/g de proteína y mutados 48.46 ± 1.48 mg/g de proteína).



Gráfica 23: Concentración de triglicéridos hepáticos de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Tasa de ácidos grasos libres en tejido hepático

En las siguientes gráficas se presenta la tasa de ácidos grasos libres en el tejido hepático de los ocho grupos experimentales. Se puede observar que el patrón de instauración del palmítico y el esteárico es el mismo en los ratones silvestres y $LXR\alpha^{-/-}$. Sin embargo, cuando se analiza el índice de instauración podemos observar que es mayor en los grupos en ausencia de colesterol, independientemente del grupo control y los transgénicos. A pesar de ello, en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ el índice de instauración entre los grupos con colesterol es el mismo no importando el tipo de proteína, mientras que en los ratones silvestres los alimentados con soya+colesterol presentan un índice de insaturación menor a los animales alimentados con caseína+colesterol.



Gráfica 24, 25, 26, 27: Tasa de ácidos grasos libres en tejido hepático de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la concentración de colesterol sérico por cada uno de los grupos al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

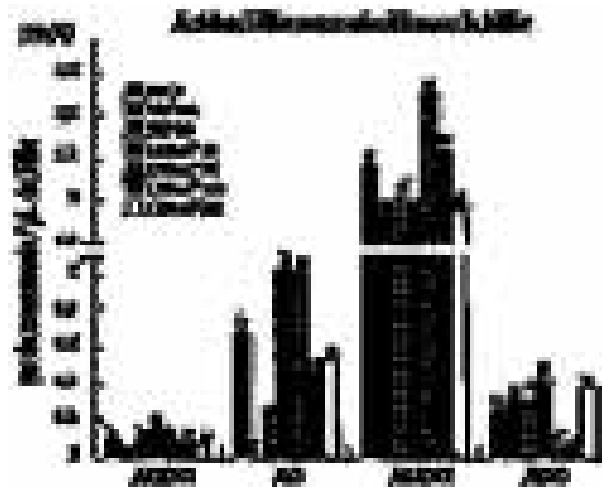
	WT C	WT S	WT CC	WT SC	$LXR\alpha^{-/-}$ C	$LXR\alpha^{-/-}$ S	$LXR\alpha^{-/-}$ CC	$LXR\alpha^{-/-}$ SCL
$SAT/INSAT$	0.85	0.68	0.52	0.41	1.24	1.11	0.31	0.3
$C^{16}/C_{16:1}$	6.67	2.62	3.08	2.73	7	8.53	1.32	1.44
$C^{18}/C_{18:1}$	0.2	0.18	0.1	0.07	0.44	0.33	0.06	0.06

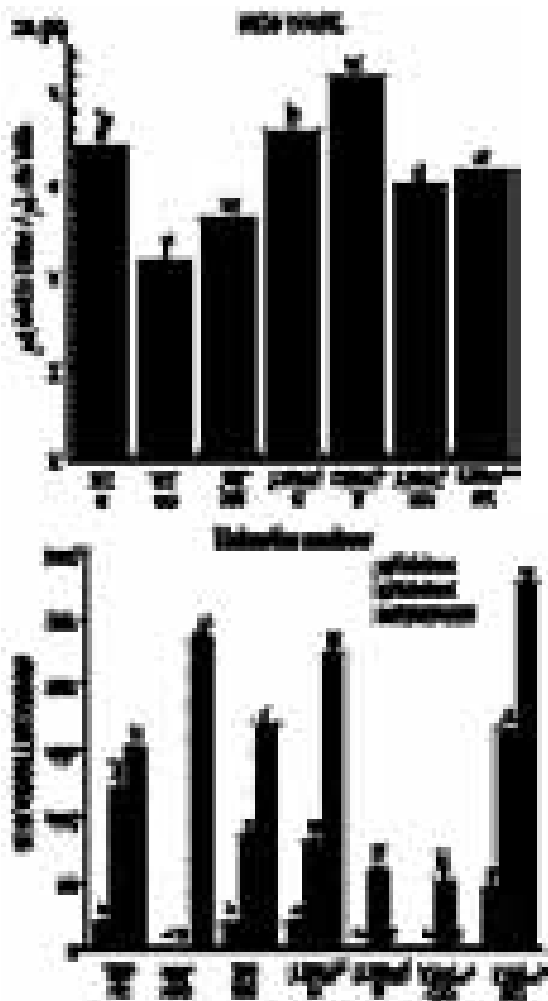
Tabla 5: Valores de la tasa de ácidos grasos libres en tejido hepático de los ratones silvestres y mutados $LXR\alpha^{-/-}$. Se presenta la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados totales, así como el palmítico entre el palmitoléico y estearico entre oleico.

Concentración de ácidos biliares y esteroides neutros en bilis

En las gráficas 28 y 29 se observan las concentraciones de los ácidos biliares primarios (CDCA y CA) y secundarios (ácido ursodesocólico -UCDA- y DCA) contenidos en la vesícula biliar, así como de los esteroides neutros de

grupos experimentales. Se puede observar en la gráfica de los ácidos biliares que todos los grupos presentan una mayor concentración de ácido ursodesoxicólico, seguido de DCA. Por otra parte tenemos la concentración de esteroides neutros, en donde el estigmaesterol en los ratones silvestres se presenta una mayor concentración de éste, mientras que en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ alimentados con soya y caseína+colesterol no se encontró presencia de estigmaesterol.





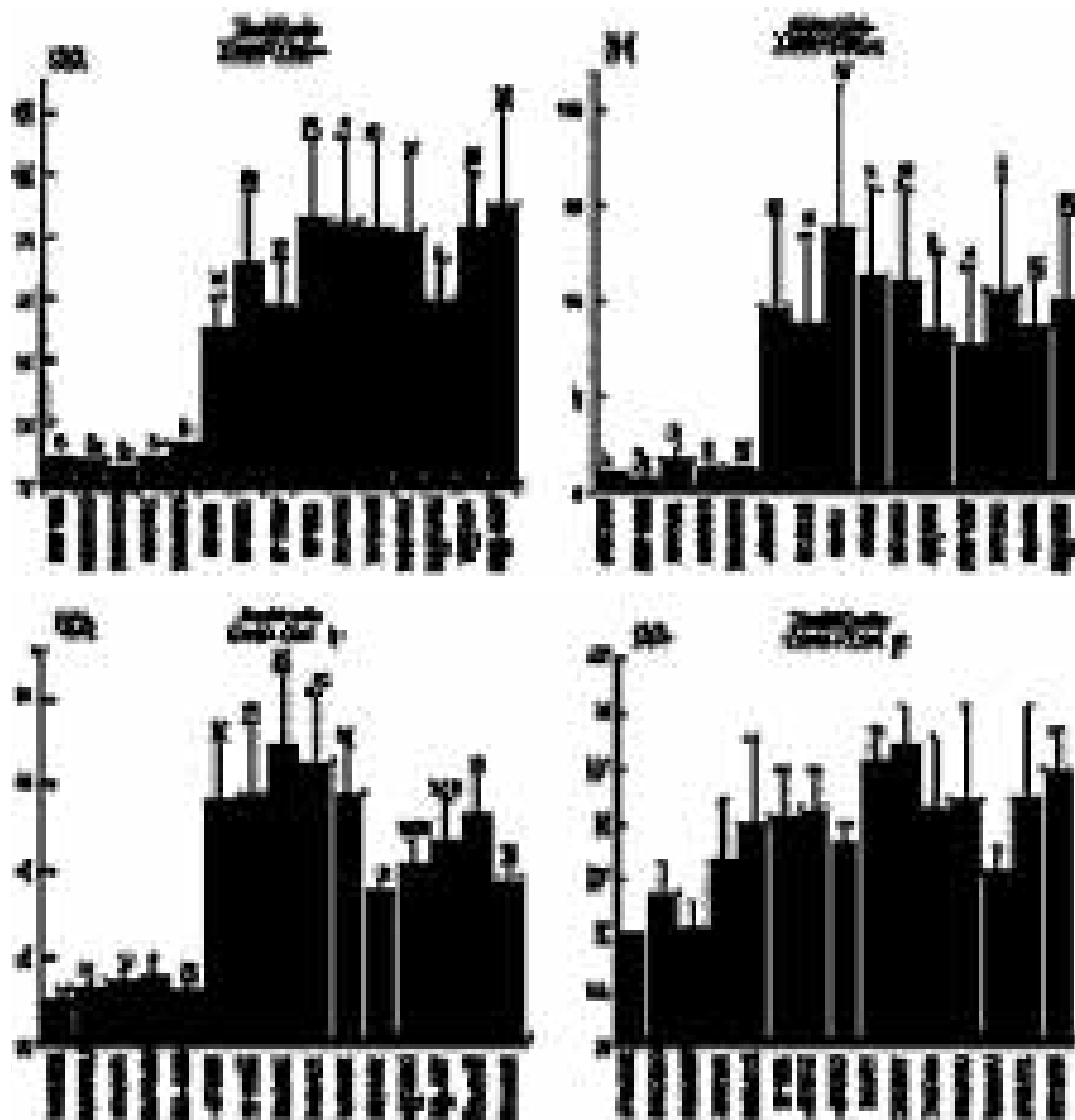
Gráfica 28(A), 28(B), 29: Ácidos biliares en la vesícula biliar por grupo, bilis total en vesícula biliar y esteroides neutros de los ratones silvestres y mutados LXRα^{-/-}. Los valores se muestran como el promedio \pm error estándar de los ácidos biliares por cada uno de los grupos, bilis total y esteroides neutros de la vesícula biliar al final del tratamiento. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Estudio *in vitro*

Efecto de las isoflavonas del aislado de la proteína de soya en la actividad de LXRα y LXRβ

Como se observa en las siguientes gráficas las isoflavonas no son potentes activadores o inhibidores de LXR, siendo que al realizar la curva de concentración tanto con el grupo control con DMSO, así como con el ligando sintético GW3965 y el ligando natural el oxisterol 22(R) se puede observar que no existe diferencia estadística entre las diferentes concentraciones de las

isoflavonas. Por otra parte, para demostrar que la transfección se está llevando a cabo correctamente, se empleo tanto el ligando natural como el sintético observándose en ambos casos que la actividad de LXR α y LXR β no se ve alterada, ni aumentada ni disminuida, con la presencia de las diferentes concentraciones de las isoflavonas pero si existe un aumento en la actividad de ambos por la presencia de los ligandos.

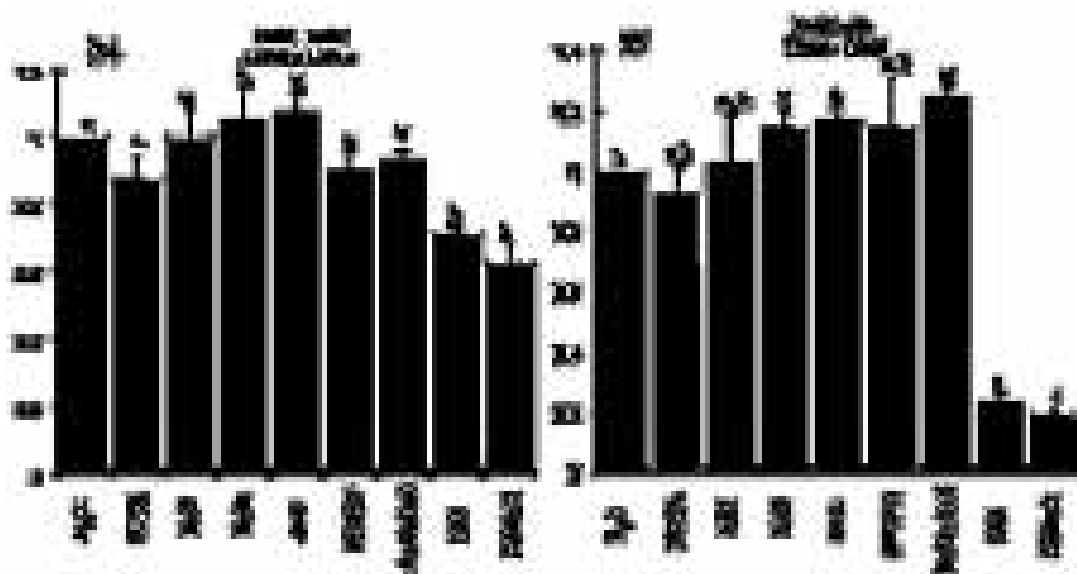


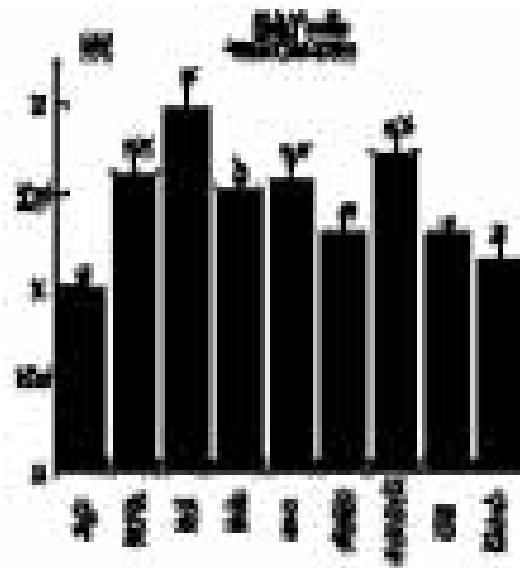
Gráfica 30, 31, 32, 33: Actividad del ensayo de luciferasa de la curva de concentración de las isoflavonas: Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la actividad de la luciferasa de los vectores de expresión LXR α + 3xLXRE y LXR β + 3xLXRE. Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

Efecto del patrón de aminoácidos del aislado de la proteína de soya y la caseína en la actividad de LXR α y LXR β .

Finalmente, a continuación se presenta como el patrón de aminoácidos de la proteína de soya y la caseína presenta una diferencia significativa en la actividad de la luciferasa, siendo que en los vectores de expresión (LXR α +3LXRE y LXR β + 3LXRE) se puede observar las diferencias más notorias entre los dos patrones de aminoácidos.

Este ensayo de luciferasa trato de imitar a nivel *in vitro* los tratamientos dietarios que se proporcionaron a los ratones en el estudio *in vivo*. Pudiéndose observar que las diferencias significativas que se aprecian en las gráficas presentan una disminución en la actividad de la luciferasa en los vectores de expresión cuando son tratados con el patrón de aminoácidos de caseína. Observándose un efecto inhibitorio del patrón de aminoácidos de la caseína más marcado en el vector de expresión LXR β + 3xLXRE.





Gráfica 34, 35, 36: Actividad del ensayo de luciferasa del patrón de aminoácidos de la proteína de soya y la caseína: Los valores se demuestran como el promedio \pm error estándar de la actividad de la luciferasa de los vectores de expresión LXR α + 3xLXRE, LXR β + 3xLXRE y el promotor corto mLR α . Las diferencias significativas se expresan con una $p < 0.05$ donde $a > b$.

DISCUSIÓN

El síndrome metabólico engloba una serie de factores de riesgo, de los cuales la hipercolesterolemia es uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad. Con el fin de comprender como es que la distribución de los nutrimentos en la dieta modula la homeostasis del colesterol, se han realizado diversos estudios que tratan de relacionar el efecto de éstos con el metabolismo reverso del colesterol.

El aislado de la proteína de soya, de origen vegetal cubre con los requerimientos nutrimentales permitiendo un crecimiento adecuado de los animales como lo demuestran las curvas de crecimientos de los animales del presente estudio. Sin embargo, el tipo de proteína influyó en la concentración de glucosas plasmáticas en ayuno; siendo que las dietas de soya tanto isoenergéticas como altas en colesterol de los ratones silvestres como de los $LXR\alpha^{-/-}$, demuestran valores inferiores a los registrados por los ratones alimentados con caseína, lo cual nos indica que el efecto hipoglucemiante de la soya es independiente de la expresión del $LXR\alpha$.

El análisis de los parámetros bioquímicos demostraron que a pesar que no hubo diferencias significativas entres los grupos de animales alimentados con caseína o con aislado de la proteína de soya, los animales con una dieta a base del aislado de la proteína de soya presentaron una concentración de triacilglicéridos séricos menor que los animales con una dieta con caseína tanto en los ratones silvestres como en los $LXR\alpha^{-/-}$ no importando si las dietas eran o no altas en colesterol, lo cual demuestra los efectos benéficos de la soya en la reducción de triacilglicéridos séricos en seres humanos observados por otros investigadores (Bhathena *et al.*)ⁱ. Sin embargo, se observó en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ un aumento considerable en la concentración de colesterol sérico en los animales alimentados con una dieta alta en colesterol, no importando el tipo de proteína, desarrollando hipercolesterolemia.

Por otro lado, en las características morfológicas de los hígados se apreciaron claras diferencias entre los tratamientos dietarios en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ con una dieta alta en colesterol presentaron hígados de aspecto grasoso y color blanco, pero los hígados de los ratones alimentados con caseína tenían consistencia como de pâtè mientras que los alimentados con

soya presentaban mayor consistencia. Con respecto a los pesos de los hígados, los ratones $LXR\alpha^{-/-}$ con dietas altas en colesterol fueron de mayor tamaño, coincidiendo con las observaciones realizadas por Alberti *et al.*ⁱⁱ(2001), en donde se demuestra una diferencia significativa entre los grupos WT y $LXR\alpha^{-/-}$ con dietas altas en colesterol.

Para entender el mecanismo molecular por el cual el aislado de la proteína de soya produce los efectos anteriores, se realizó el análisis de la expresión génica de los genes involucrados en metabolismo del colesterol.

Se observó que la expresión de SREBP2 en WT y $LXR\alpha^{-/-}$ con una dieta alta en colesterol disminuye, en contraste la expresión de SREBP2 se ve aumentada en aquellos animales alimentados con dietas sin exceso de colesterol en los ratones $LXR\alpha^{-/-}$. Como se sabe SREBP2 regula la síntesis y absorción del colesterolⁱⁱⁱ, nuestros resultados demuestran que la expresión negativa de SREBP2 por una parte depende de la presencia de colesterol en la dieta, así como también de la concentración esteroides neutros, los cuales se cuantificaron de la vesícula biliar, como lo menciona Yang *et al.*^{iv} que el estigmasterol interfiere con el procesamiento de SREBP2, interrumpiendo así la ruta de SREBP.

La regulación génica de los genes lipogénicos están dirigidos por la expresión de SREBP-1c, el cual a su vez es activado por $LXR\alpha$ observamos que en los ratones silvestres no presentan cambios en la expresión frente a los diferentes tratamientos dietarios, mientras que los ratones mutados en el gen de $LXR\alpha$ presentan un incremento significativo en la expresión de SREBP-1c, ésta misma tendencia se observa en la expresión relativa de FAS, en blanco de SREBP-1c.

Sin embargo, a pesar de que SCD1 también es un gen blanco de la actividad de SREBP-1c nuestros resultados demuestran que en los animales silvestres alimentados con el aislado de la proteína de soya y exceso de colesterol aumentan la expresión de SREBP1c así como la de SCD1, lo cual no se observa con una dieta con caseína. Indicándonos probablemente que el aislado de la proteína de soya este regulando la expresión de $LXR\alpha$. Sin embargo, en los animales $LXR\alpha^{-/-}$ la expresión de SCD1 en todos los

tratamientos dietarios la expresión de SCD1 disminuye, esto puede deberse a que en ratones alimentados con aceite de soya y 2% de colesterol se observó que la expresión de SCD1 es independiente de la expresión de SREBP1c^v.

Por otro lado, se ha determinado que dentro del promotor de SCD1 existen elementos de respuesta a ácidos grasos poliinsaturados observándose que los ácidos grasos oleico y linoléico disminuyen la transcripción de SCD1, el ácido estéarico lo incrementa^{vi}, lo cual se correlaciona con las concentraciones de oleato y estearato en el hígado de los animales del presente estudio.

Asimismo, con respecto a la expresión génica de los genes involucrados en el transporte del colesterol, se observó como la ausencia de LXR α causa un aumento en la expresión relativa del mRNA de ABCA1, como se reporta en el artículo por Zelcer y Tontonoz^{vii}, donde mencionan que la pérdida de LXR resulta en un aumento de ABCA1 debido a la pérdida en la represión de éste gen. En cuanto a la expresión relativa del mRNA de ABCG5 y ABCG8, se puede observar como ambos genes siguen un mismo patrón de expresión el cual se ve modificado dependiendo el tipo de dieta indicándonos que efectivamente estos transportadores funcionan como heterodímeros.

Por otra parte, se aprecia como en los ratones LXR α ^{-/-} en las dietas isocalóricas existe un incremento significativo en la expresión relativa del mRNA de ABCG5 y ABCG8 lo cual se complementa con el aumento que también se observa en los genes lipogénicos (SREBP's, SCD1 y FAS), por otra parte ésta expresión disminuye en la presencia de colesterol corroborándose su efecto en las histologías donde se aprecia una acumulación de lípidos en el hígado, indicándonos que pudiese existir otra ruta complementaria a LXR para la regulación de éstos genes.

Al analizar la expresión génica de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos biliares, se pudo apreciar un mismo patrón de expresión de los genes FXR, SHP y CYP27, lo cual nos sugiere el efecto regulatorio de FXR sobre estos genes. Sin embargo, la expresión de BSEP gen blanco de FXR, no presentó cambios significativos en su expresión. En contraste, la expresión relativa de CYP7A1 presentó un patrón inverso a la expresión de SHP, indicándonos el efecto inhibitorio que tiene SHP sobre CYP7A1, el cual posiblemente se este llevando a cabo a través de la interacción de LRH-1 y

LXR, como lo reporta Matsukuma *et al.*^{viii} que ocurre con otros genes blancos de SHP.

Por otro lado, podemos observar como en los ratones silvestres alimentados con el aislado de la proteína de soya, existe un aumento en la expresión de CYP7A1 y CYP27, indicándonos que el exceso de colesterol en la dieta posiblemente este siendo eliminado por medio de la síntesis de ácidos biliares.

Asimismo, se realizaron análisis histológicos para determinar el grado de hepatotoxicidad, observándose diferencias fisiológicas entre los diferentes tratamientos dietarios. En los ratones mutados en el gen de LXR α se observó que el tejido presentaba una mayor acumulación de lípidos, así como, infiltrado inflamatorio en los ratones alimentados con dietas altas en colesterol, apreciándose una mayor infiltrado en las alimentas con caseína, lo cual nos indica tanto una esteatosis como hepatitis. Estudios realizados por Bensinger *et al.*^{ix}, señalan que la disponibilidad intracelular de esteroides está íntimamente ligada a la respuesta transcripcional mediada por LXR y SREBP durante la activación de las células T, observándose en nuestras histologías que ambos grupos de ratones LXR α ^{-/-} con dietas altas en colesterol presentan un filtrado inflamatorio, siendo que en el grupo soya+colesterol este infiltrado disminuye en comparación con el grupo de caseína+colesterol, sugiriéndonos que el aislado de proteína de soya presenta otros mecanismos de señalización para la regulación de la respuesta inflamatoria.

La tinción de PAS (sus siglas en inglés de Periodic Acid-Schiff) sirvió para observar depósitos de glucógeno. Mostrándonos como en lo ratones silvestres alimentados con soya y soya+colesterol no existe una depleción de los depósitos de glucógeno, siendo que en los ratones LXR α ^{-/-} éstos depósitos se encuentran disminuidos; sugiriéndonos que posiblemente el aislado de proteína de soya necesita de la intervención de LXR α para tener un efecto en el metabolismo del glucógeno, lo cual coincide con el reporte realizado por Mitro *et al.*^x, donde se afirma que LXR α está involucrado en el metabolismo de la glucosa.

La acumulación de lípidos en el tejido hepáticos fue corroborada a través de la extracción de lípidos hepáticos. Observándose en ambos grupos LXR α ^{-/-}

existió marcado incremento en el contenido de colesterol hepático con una dieta alta en colesterol, sin embargo los ratones alimentados con soya+colesterol se observa un menor contenido de colesterol hepático pero un aumento en la concentración sérica indicándonos que posiblemente el aislado de proteína de soya ayuda a la movilización del colesterol retardando el daño esteatótico.

El análisis del patrón de ácidos grasos libres en tejido el hepático, para determinar el cociente de desaturación en los diferentes grupos experimentales. Nos permitió determinar que el grado de desaturación en los animales alimentados con el aislado de proteína de soya disminuye tanto con la presencia de colesterol como en la ausencia de LXR α . Sin embargo, esta tendencia se revierte en los animales alimentados con caseína. Estos resultados concuerdan con el patrón de expresión de SCD1 observados en este estudio.

Finalmente los resultados obtenidos en el estudio *in vitro*, demuestran que las isoflavonas contenidas en el aislado de proteína de soya no presentan un efecto a través del receptor LXR α , siendo que los efectos observados en el estudio *in vivo* nos sugiere que las isoflavonas están presentando su efecto a través de otro mecanismo. Por otra parte, los resultados observados en el ensayo de luciferasa de las células tratadas con el patrón de aminoácidos nos demuestran cómo este patrón de aminoácidos tiene un efecto sobre la actividad de LXR α , inhibiendo o estimulando ligeramente la actividad de la luciferasa, lo cual nos sugiere otro mecanismo de acción.

CONCLUSIONES

El consumo del aislado de proteína de soya permitió el adecuado crecimiento de los ratones.

El efecto hipoglucemiante e hipotrigliceridémico del aislado de proteína de soya es independiente de la expresión de LXR α .

La pérdida de LXR α altera la movilización de los lípidos debido a la influencia que tiene LXR α en la actividad de los transportadores hepáticos ABC's (A1, G5, y G8) causando una acumulación de lípidos en el hígado.

La regulación de SREBP2 depende de la presencia de colesterol en la dieta así como también de la concentración de estigmaesterol más que de la presencia o no de LXR α .

La expresión de SCD1 no solo se encuentra regulada por SREBP1-c sino que el ácido estéarico incrementa la transcripción de SCD1.

El consumo del aislado de proteína de soya disminuye el coeficiente de desaturación de los ácidos grasos libres, sugiriéndonos otros mecanismos de regulación por los cuales presenta sus efectos.

El aislado de proteína de soya ejerció un efecto anti-inflamatorio en el hígado mediado principalmente por LXR α , sin embargo este efecto debe involucrar otros mecanismos de señalización independientes a LXR α .

Nuestros resultados sugieren la presencia de una ruta complementaria a LXR α en regulación de los genes lipógenicos.

El efecto del aislado de proteína de soya en el metabolismo de lípidos, se está llevando a cabo a través de otras vías de señalización, que posiblemente estén involucrando la regulación de genes blanco de otros receptores nucleares.

El aislado de la proteína de soya influye en el metabolismo del glucógeno a través de la expresión de LXR α .

Los datos *in vitro*, demuestran que los efectos del aislado de la proteína de soya observados *in vivo* no son exclusivos, ni altamente influidos por LXR α ; sugiriéndonos que no solo el patrón de aminoácidos es importante para ver los efectos del aislado de la proteína de soya sino que también las isoflavonas, que muy probablemente están llevando a cabo su efecto a través de otro receptor nuclear.

PERSPECTIVAS

Analizar el efecto del aislado de la proteína de soya sobre la activación de LRH-1.

Explorar otros receptores nucleares, en donde la proteína de soya puede estar teniendo una mayor efecto.

Medir la expresión génica implicados en el transporte de colesterol en el intestino, entre la que encontramos la aquaporina 1, FGF15 y otros transportadores, involucrados principalmente en el sistema digestivo.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Organización Mundial de la Salud. Prevención de enfermedades crónicas: una inversión vital. Public health agency of Canada. 2005. Canada.
http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/contents/en/index.html
- ¹ Instituto Nacional de Salud Pública. ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. México: <http://www.insp.mx/ensanut/>
- ¹ National Heart, Lung and Blood Institute and National Institutes of Health. Third report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). 2002. USA: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/>
- ¹ Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(2): 397-408.
- ¹ Solaas K, Ulvestad A, Soreide O, Kase BF. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1154-62.
- ¹ Solaas K, Kase BF, Pham V, Bamberg K, Hunt MC, Alexson SE. Differential regulation of cystolic and peroxisomal bile acid amidation by PPARalpha activation favors the formation of unconjugated bile acids. *J Lipid Res.* 2004; 45 (6): 1051-60.
- ¹ Love MW, Dawson PA. New insights into bile acid transport. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9: 225-9.
- ¹ Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev.* 2002; 23(4):443-63. Review
- ¹ Lu TT, RepaJJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as elixirs and fixers of sterol metabolism. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37735-8
- ¹ Janowski BA, Willy PJ, Rama-Devi T, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996; 383: 728-31.
- ¹ Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: The oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res.* 2008. In press.
- ¹ Björkhem I. Do oxysterol control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest.* 2002; 110(6): 725-30.
- ¹ Zhang Y, Mangelsdorf DJ. Luxuries of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. *Mol Interv.* 2002; 2(2):78-87.
- ¹ Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* 1996; 7: 1575-84.
- ¹ Manzano N, Torres N, Tovar AR, Mecanismo de acción de las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBPs) en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos. *RIC* 2002; 2:145-53.
- ¹ Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P, Fougère F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Med Sci.* 2005; 102: 791-6.
- ¹ Bennett MK, Lopez JM, Sanchez HB, Osborne TE. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med.* 1996; 355: 848-54.
- ¹ Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2001; 98: 507-12
- ¹ Lu TT, RepaJJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as elixirs and fixers of sterol metabolism. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37735-8
- ¹ Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JMA, MedinaJC, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000; 289: 1524-9.
- ¹ Wade DP, Owen JS. Regulation of the cholesterol efflux gene, ABCA1. *Lancet.* 2001; 357: 161-3.
- ¹ Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB, Santamarina-Fojo S. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001; 108: 303-9.

- ¹ Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48275-82.
- ¹ Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of nuclear receptors FXR, SHP- α , and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000; 6: 517-26.
- ¹ Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res.* 2001; 42: 1594–1603.
- ¹ Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Rühl R, Molnar S, Csiba L, Garuti R, Calandra S, Larsson H, Diczfalusy U, Nagy L. Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signalling in macrophages. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(18): 8154-66.
- ¹ Hofmann AF. Bile acids. In the liver: biology and pathobiology. 3rd edition. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. New York, NY: Raven Press, Ltd. 1994; 20: 199-223.
- ¹ Chiang JYL, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene.* 2000; 262(1-2): 257-65.
- ¹ Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 194: 1371-9.
- ¹ Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY, Shan B. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 6660-5.
- ¹ Lu TT, Maishma M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000; 6: 507-15.
- ¹ Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, González FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell.* 2000; 102: 731-44.
- ¹ Ananthanarayanan M, Balasubramanian NV, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38857-65.
- ¹ Messina M. Modern applications for an Ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *Suppl. First international symposium on the role of soy in preventing and treating disease.* 1994; 20-3.
- ¹ Anderson R, Wolf W. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavons related to soybean processing. *J. Nutr.* 1995; 125:581S-8S.
- ¹ Tovar AR, Murguía F, Cruz C, Torres N. A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephritic syndrome. *Nutrient-Genes Interactions* 2002: 2562-72
- ¹ Young VR. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J Am Diet Assoc.* 1991; 91: 828-35.
- ¹ Anderson JW, Johnstone BM and Cook-Newell ME. Metanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995. 333: 276-82.
- ¹ Wang MF, Yamamoto S, Chung HM, Chung SY, Miyatani S, Mori M, Okita T, Sugano M. Antihypercholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1995; 41: 187 - 95.
- ¹ Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens, and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2002; 132: 5665 - 95.
- ¹ Manzano N, Torres N, Tovar AR. Mecanismo de acción de las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBPs) en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos. *RIC.* 2002; 2: 145 - 53.
- ¹ Hermansen K, Sondergaard M, Hale L, Carstensen M. Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipids levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes care.* 2001; 24: 228 - 33.

- ¹ Maddoz DA, Alavi FK, Silbernack EM, Zawada ET. Protective effects of a soy diet in preventing obesity-linked renal diseases. *Kidney Int* 2002; 61 (1): 96 - 104.
- ¹ Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, Elías AL, Ortiz V, Aguilar-Salinas CA, Torres N. 2005. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J. Lipid Res.* 46: 1823-32.
- ¹ Tonstad S, Smerud K, Hoie L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2002;76:78-84
- ¹ Crouse 2I J, Morgan T, Terry J, Ellis J, Vitolins M, Burke G. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on the plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 1999;159:2070-76
- ¹ Gröne EF, Walli AK, Gröne HJ, Miller B, Seidel D. The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis.* 1994; 107: 1 - 13.
- ¹ Abelov BJ, Holford TR, Insogna KL. Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture: a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1992; 50: 14 - 8.
- ¹ Breslau NA, Brinkley L, Hill KD, Pak CYC. Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66: 140 - 6.
- ¹ Saint Martin Posada BI. Biodisponibilidad de isoflavonoides de soya y sus implicaciones en la salud. *Nutrición humana.* 1998.
- ¹ Sánchez A, Filler KM, Hubbard RW, Shavlik GW. Plasma amino acids after single soy, casein or protein-free meals in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Nutr Rep Int.* 1988; 38: 117
- ¹ Ascencio, C., N. Torres, F. Isoard-Acosta, F. J. Gómez-Pérez, R. Hernández-Pando, and A. R. Tovar. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* 2004; 134: 522-9.
- ¹ N. Torres, I. Torre-Villalvazo and Tovar, A. R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in disease mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem.* 2006; 17: 365-73.
- ¹ Keller S and Jahreis G. Determination of underivatized sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;813(1-2):199-207.
- ¹ Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 1987; 162: 156-9.
- ¹ Hanson RW, Hatzoglou M, Mc Grane MM, Wynshaw-Boris A. Molecular Biology and Nutrition Research. *J Nutr.* 1989; 119: 954-7.
- ¹ Bhatthana SJ, Ali AA, Haudenschild C, Latham P, Ranich T, Mohamed AI, Hansen CT, Velasquez MT. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(2): 157-64.
- ¹ Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Björkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRBeta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001; 107 (5): 565-73.
- ¹ Chu K, Miyazaku M, Chi Man W, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol.* 2006; 26 (18): 6786-98
- ¹ Yang C, Yu L, Li W, Xu F, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest.* 2004; 114: 813-22.
- ¹ Kim HJ, Miyazaki M, Ntambi JM. Dietary cholesterol opposes PUFFA-mediated repression of stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J Lipid Res.* 2002; 43: 1750-7.
- ¹ Zhang L, Ge T, Tran T, Stenn K, Prouty SM. Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem J.* 2001; 357: 183-93.
- ¹ Zelcer N and Tontonoz P. Liver X receptor as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *Rev. J Clin Invest.* 2006; 116(3): 607-14.

¹ Matsukuma KE, Wang L, Bennett MK, Osborne TF. A key role for orphan nuclear receptor homolog-1 in activation of fatty acids synthase promoter by liver X receptor. *J Biol Chem.* 2007; 282(28): 20164-71.

¹ Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB, Zelcer N, Janssen EM, Hausner MA, Shih R, Parks JS, Edwards PA, Jamieson BD, Tontonoz P. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell.* 2008; 134: 97-111.

¹ Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Moteni V, Kreuzsch A, Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 2007; 445(7124): 219-23.