



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Fisiología de la Nutrición

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

“Salvador Zubirán”

**Efecto de la proteína de soya dietaria sobre las
alteraciones metabólicas del hígado y tejido adiposo
en ratas alimentadas con dieta alta en grasa**

T E S I S

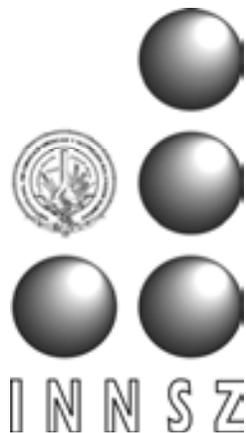
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Biol. Ivan Torre Villalvazo

Directora de Tesis: Dra. Nimbe Torres y Torres



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE MEDICINA



PDCB/grad/030/Jun/2008

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión 222a del 28 de mayo del 2008, designó el siguiente jurado para examen grado de DOCTOR EN CIENCIAS de IVAN TORRE VILLALVAZO, con número de cuenta 50300463-1, con la tesis titulada "EFECTO DEL CONSUMO DE PROTEÍNA DE SOYA SOBRE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS DEL HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA", dirigida por la Dra. Nimbe Torres y Torres.

Presidente: Dr. David Kershenobich Stalnikowitz
Vocal: Dr. Carlos Aguilar Salinas
Vocal: Dra. María Cristina Fernández Mejía
Vocal: Dra. Elia Martha Pérez Armendariz
Secretario: Dra. Nimbe Torres y Torres

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, a 03 de junio de 2008.



DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA



DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dra. Nimbe Torres y Torres.
Coordinación de PDCB

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la asesoría de la Dra. Nimbe Torres y Torres y la co-asesoría de la Dra. Elena Zambrano González y la Dra. Maria Teresa Tusié Luna.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 46135-M

La beca para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas fue otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Registro No. 173789 y complementada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos

Ale: Por soportar conmigo este difícil período de nuestras vidas, con el nacimiento de dos hijos, múltiples mudanzas, las fricciones familiares y para colmo un marido neurótico con su posgrado

Avril y Eliseo: Por recordarme que la ciencia es 90% juego.....y la vida también !!

Mamá y Papá: Por permitirme tener conejos, lagartijas, tarántulas, serpientes, tortugas..y luego disecarlas. Por permitirme tener mi colección de piedras, huesos, plumas y pulgas. Por pasar horas conmigo leyendo mis libros de animales y de Jaques Cousteau. Por llevarme a los partos, cesareas y cirugías mil...en fin, por desarrollar en mí el gusto por la ciencia

Abuelita Dalia: Por compartirme los secretos del aprendizaje y la enseñanza

Tío Hugo, Mirta, Cocó, Chiquis, Diana y Sergio: Por darme ánimo y consejo

Abuelita Tere, Tío Toño, Elena, Jandro, Blanca, Nena y Germán: Por apoyarme tanto

Julio y Mariana, Rodrigo y Popis, Chris y Julia, Kapes y Kary, Toño y Becky: Por estar con Ale y conmigo en todo momento, por su amistad, consejo y exhortación (por no decir regaño), por evitar que nos matáramos el uno al otro jajaja

Nimbe: Porque juntos logramos terminar este accidentado recorrido

Armando: Por confiar en mi

Memo: Por hacer divertida la vida en el lab, por haberme evitado meter la pata numerosas veces, por haber desarrollado conmigo nuestros dotes de fotografos, cineastas y compositores !!!

Lilia: Por tu paciencia para con tu compañero loco, por escuchar mis debrayes científicos y por compartir el Nobel que vamos a ganar ehh?

Gaby A, Maru, Omar, Gris, Paty, Vic, Adri, Gloria, Vicky, Marce, Faby, Gaby Q, Bere, Martha, Estefanía (Conciencia), Tere E, Lidia, Maggie, Nat y Claudia: Por tolerarme durante las largas horas que pasamos juntos en el lab. Es verdad que tus compañeros de trabajo se convierten en tu familia (porque compartes el lloro, las peleas, los consejos y lo más importante: las fiestas)

Hector Orozco: Por toda tu ayuda y enseñanza, por hacerme apreciar las maravillas de la célula

Octavio: Por tu tiempo y ayuda. Por recordarme que los animales requieren respeto y cariño

Caro Ariza, Vicky, Pawis, Erika, Norma, Tino, Mario, Euclides, Caro, Eulises, Lupita, Lucy, Adri, Angelina: Por todo su apoyo, por prestarme todos esos reactivos y material (...que espero haber devuelto...) y por tantas horas de sabrosa plática

Diana y Brenda: Aun les debo las horas de trabajo forzado por todos los destrozos que hice en su lab !!

Gaby, Jaime, Irma, Maru, Blas, Jorge: Por enseñarme el arte de las histologías

Maricela: Por tu ayuda con los licuados de rata y tu amistad

Elena: Por estar conmigo todo este tiempo, por oír mis quejas y frustraciones y evitar que saliera corriendo del posgrado

Alí Halhalí, Marco Cerbón, Cristina Fernández: Por sus consejos, apoyo y su amistad

Dra. Tere Tusié, Dr. Carlos Aguilar, Dr. Jaime Mas, Dr. Felix Recillas, Dr. Diego Gonzalez-Halphen, Dra. Martha Pérez, Dr. David Kershenobich: Por sus valiosos comentarios para enriquecer mi trabajo...y mi vida

Evita: Por todo el tiempo y paciencia para lograr que uno más de tus chicos haya logrado salir triunfante de la mar de trámites del posgrado

Al PDCB, a la UNAM, a CONACYT y al INCMNSZ: Por permitirme estudiar un doctorado de excelencia en mi país, por el apoyo económico y el aprendizaje técnico y práctico

Agradezco nuevamente a los integrantes del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo:

Dra. Nimbe Torres y Torres
Dra. María Cristina Fernández Mejía
Dr. Carlos Aguilar Salinas
Dra. Elia Martha Pérez Armendariz
Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Finalmente, el mayor agradecimiento que pueda tener es para mi Dios, que a través de su palabra me dio seguridad, paz y fuerza para seguir adelante. Su palabra dice:

Veo yo al Señor siempre delante de mí, porque él está a mi derecha para que no caiga. Por eso se alegra mi corazón y canta con gozo mi lengua; mi cuerpo también vivirá en esperanza, porque no dejarás que mi vida termine en el sepulcro, ni permitirás que el fin de tu santo sea la corrupción. Me has dado a conocer los caminos de la vida; me llenarás de alegría en tu presencia. (Hechos 2:25-28)

Bueno y recto es el Señor; por tanto, El enseñará a los pecadores el camino. Encaminará a los humildes en la justicia y enseñará a los mansos su carrera. Todas las sendas del Señor son misericordia y verdad para los que guardan su pacto y sus testimonios. (Salmo 25:8-10)

El principio de la sabiduría es el temor del Señor; los insensatos desprecian la sabiduría y la enseñanza. Porque el Señor da la sabiduría y de su boca proceden el conocimiento y la inteligencia. Él provee de sana sabiduría a los rectos: es escudo para los que caminan rectamente. Él es quien guarda las veredas del juicio y preserva el camino de sus santos. Entonces comprenderás qué es justicia, juicio y equidad, y todo buen camino. Cuando la sabiduría penetre en tu corazón y el conocimiento sea grato a tu alma, la discreción te guardará y te preservará la inteligencia. (Proverbios 1:7, 2:6-11)

Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque El Señor, tu Dios, estará contigo dondequiera que vayas. (Josué 1:9)

La justicia de Dios viene por medio de la fe en Jesucristo, para todos los que creen en El. Porque no hay diferencia, por cuanto todos pecaron y están destituidos de la gloria de Dios, y son justificados gratuitamente por su gracia, mediante la redención que es en Cristo Jesús. (Romanos 3:22-24)

Bendito sea el Dios y Padre de nuestro Señor Jesucristo, que nos bendijo con toda bendición espiritual en Cristo, según nos escogió en El antes de la fundación del mundo, para que fuéramos santos y sin mancha delante de El. Por su amor, nos predestinó para ser adoptados hijos suyos por medio de Jesucristo, según el puro afecto de su voluntad, para alabanza de la gloria de su gracia, con la cual nos hizo aceptos en el Amado. En él tenemos redención por su sangre, el perdón de pecados según las riquezas de su gracia, que hizo sobreabundar para con nosotros en toda sabiduría e inteligencia. Él os dio vida a vosotros, cuando estabais muertos en vuestros delitos y pecados, en los cuales anduvisteis en otro tiempo, siguiendo la corriente de este mundo. Pero Dios, que es rico en misericordia, por su gran amor con que nos amó, aun estando nosotros muertos en pecados, nos dio vida juntamente con Cristo, porque por gracia sois salvos por medio de la fe; y esto no de vosotros, pues es don de Dios. No por obras, para que nadie se gloríe. (Efesios 1:4-8, 2:9)

Índice

	Página
1. Abreviaciones	1
2. Resumen	2
3. Introducción	
a. Epidemiología y prevalencia de la obesidad:	3
b. SREBP's y las alteraciones metabólicas del hígado en la obesidad	4
c. PPAR γ y las alteraciones metabólicas del tejido adiposo en la obesidad	10
d. Lipotoxicidad, vínculo entre obesidad y sus alteraciones metabólicas	15
e. Papel de la dieta en el desarrollo y tratamiento de la obesidad	18
4. Antecedentes	
a. Proteína de soya y metabolismo de lípidos	20
5. Justificación	24
6. Hipótesis	25
7. Objetivos	
a. Objetivo general	25
b. Objetivos particulares	25
8. Métodos	
a. Animales y diseño experimental	26
b. Composición corporal	27
c. Hormonas y metabolitos en suero	28
d. Contenido de mRNA	28
e. Análisis de proteínas	29
f. Contenido de lípidos en hígado	30
g. Glucógeno en hígado	30
h. Análisis histológico	30
i. Fraccionamiento de lipoproteínas	31
j. Análisis estadístico	31
9. Resultados	
a. Ganancia de peso, consumo de alimento y composición corporal	31
b. Insulina, glucagon y glucosa en suero y glucógeno en hígado	33
c. Contenido de SREBP-1 en hígado	34
d. Contenido de lípidos en hígado	36
e. Colesterol y TG en suero, perfil de lipoproteínas y mRNA de SCD-1 en hígado	37
f. Contenido de SREBP-2 y mRNA de LDLr en hígado	38
g. Morfología del tejido adiposo blanco y ácidos grasos libres en suero	39
h. Contenido de mRNA de PPAR γ y perilipinas en TAB	41
i. Leptina en suero y deposición de colágeno en hígado	42
j. mRNA de TNF α y SOCS-3 en TAB	43
k. Morfología del TAP y contenido de mRNA de PPAR γ y UCP-1	44
10. Discusión	46
11. Conclusiones	57
12. Bibliografía	57

Indice de Figuras y Tablas

	Pág
Figura 1: Relación entre la obesidad, el síndrome metabólico y enfermedades crónicas.	3
Figura 2: Genes activados por SREBP-1 y SREBP-2.	6
Figura 3: Función de la SCD-1 en el destino metabólico de los lípidos en el hígado.	8
Figura 4: Diferencia morfológica y funcional entre los adipocitos blancos y pardos.	11
Figura 5: Participación de PPAR γ en los adipocitos blancos y pardos.	13
Figura 6: Papel de la leptina en la regulación del balance energético.	14
Figura 7: Hipertrofia y alteraciones metabólicas de los adipocitos en la obesidad.	15
Figura 8: Alteraciones metabólicas en el hígado y tejido adiposo en la obesidad.	18
Figura 9: Sitios de acción de la proteína de soya en el metabolismo de lípidos.	23
Figura 10: Diseño experimental y composición de las dietas experimentales.	27
Figura 11: Ganancia de peso, consumo de alimento, contenido de grasa y proteína corporal	32
Figura 12: Concentración de insulina, glucagon, glucosa en suero y glucógeno en hígado	34
Figura 13: Contenido de mRNA y de proteína precursora y madura de SREBP-1	35
Figura 14: Contenido de colesterol y triglicéridos en hígado	36
Figura 15: Concentración de colesterol y TG en suero y mRNA de SCD-1 en hígado	38
Figura 16: Contenido de mRNA y proteína precursora y madura de SREBP-2 en hígado	39
Figura 17: Área de adipocitos y concentración de AGL en suero	40
Figura 18: Contenido de mRNA de PPAR γ y de perilipinas en tejido adiposo blanco	41
Figura 19: Concentración de leptina en suero y deposición de colágeno en hígado	43
Figura 20: Contenido de mRNA de TNF α y SOCS-3 en tejido adiposo blanco	44
Figura 21: Histología de tejido adiposo pardo y contenido de mRNA de PPAR γ UCP-1	45
Figura 22: Mecanismo propuesto para la acción de la proteína de soya en la obesidad.	56
Tabla1: Genes analizados, tejido en donde se detectaron y ensayo TaqMan	29

Abreviaciones

Como la mayoría de las abreviaciones son de palabras en inglés, se definen las siglas en inglés y entre paréntesis su significado en español

AGL: ácidos grasos libres

CAS: Dieta control con caseína

CAS-AG: Dieta alta en grasa con caseína

CPT: Carnitine Palmitoyl-CoA Transferase (Transferasa de carnitina palmitoil-CoA)

IRS: Insulin receptor substrate (sustrato del receptor a insulina)

LDL: Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de baja densidad)

LDLr: LDL receptor (Receptor para las lipoproteínas de baja densidad)

LXR: Liver X Receptor (Receptor X hepático)

mRNA: messenger Ribonucleic Acid (Acido ribonucleico mensajero)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PPAR: Peroxisome Proliferators Activated Receptor (Receptor activado por proliferadores de peroxisomas)

RT-PCR: Reverse Transcriptase-PCR (Transcripción reversa de la PCR)

SOY: Dieta control con soya

SOY-AG: Dieta alta en grasa con soya

SCD: Stearoyl-CoA Desaturase (Estearil-CoA desaturasa)

SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein (Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides)

TAB: Tejido adiposo blanco

TAP: Tejido adiposo pardo

TNF: Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)

TG: Triglicéridos

UCP: Uncoupling protein (Proteína desacoplante)

VLDL: Very Low Density Lipoproteins (Lipoproteínas de muy baja densidad)

Resumen

La obesidad es una enfermedad con alta prevalencia en el mundo que produce alteraciones metabólicas en el hígado y tejido adiposo favoreciendo el desarrollo de dislipidemia y resistencia a la insulina. En el hígado la obesidad incrementa la actividad del factor de transcripción SREBP-1 y la síntesis de lípidos, mientras que en el tejido adiposo la actividad del receptor nuclear PPAR γ disminuye, incrementando la liberación de ácidos grasos libres y la producción de leptina y TNF α . Estos últimos exacerban el daño hepático a través de un proceso denominado lipotoxicidad. En el tejido adiposo pardo la reducción de PPAR γ disminuye su actividad termogénica favoreciendo la acumulación de energía. Estudios en humanos y roedores han demostrado que el desarrollo de obesidad se asocia al consumo elevado de hidratos de carbono y grasa, sin embargo existe poca información sobre el papel que juega el tipo de proteína en el desarrollo de la obesidad. Por lo que el **OBJETIVO** del presente estudio fue evaluar el efecto del consumo de dieta alta en grasa con proteína de soya por 180 días sobre el desarrollo de alteraciones metabólicas en hígado y tejido adiposo respecto a ratas alimentadas con dieta alta en grasa con caseína. Los **RESULTADOS** mostraron que el consumo prolongado de proteína de soya en ratas alimentadas con dieta alta en grasa reduce el peso corporal al disminuir el contenido de grasa corporal sin modificar el contenido de masa magra, en asociación con el aumento en la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo. También redujo la esteatosis hepática mediada por SREBP-1 al reducir la proporción insulina/glucagón circulante. Evitó la dislipidemia al disminuir la concentración de triglicéridos en las lipoproteínas VLDL en asociación con menor contenido de mRNA de SCD-1 en hígado y reducir la concentración de colesterol en las lipoproteínas LDL asociado a un aumento en el contenido de SREBP-2 y mRNA del LDLr en hígado. El consumo de proteína de soya evitó el desarrollo de adipocitos disfuncionales al reducir la respuesta inflamatoria local mediada por TNF α y SOCS-3 en el tejido adiposo blanco de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa. Este efecto en el tejido adiposo se vió reflejado en una reducción en el daño hepático al evitar la hiperleptinemia y el aumento en el flujo de ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo. En **CONCLUSIÓN** el consumo de proteína de soya redujo la lipogénesis hepática, evitó la hipertrofia del tejido adiposo blanco y aumentó la termogénesis en el tejido adiposo pardo, previniendo el desarrollo de lipotoxicidad hepática en ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

Introducción

Epidemiología y prevalencia de la obesidad

La obesidad se define como el aumento en el peso corporal debido al incremento en el contenido de tejido adiposo. Pero mas allá de ser un problema estético, la obesidad es un padecimiento grave debido a que produce una serie de alteraciones metabólicas en órganos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, generando hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión e hígado graso [1]. Estas alteraciones conforman al síndrome metabólico y se asocian con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 [2, 3] **(Figura 1)**. Es por esta razón que la obesidad ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como un problema grave de salud pública [4].

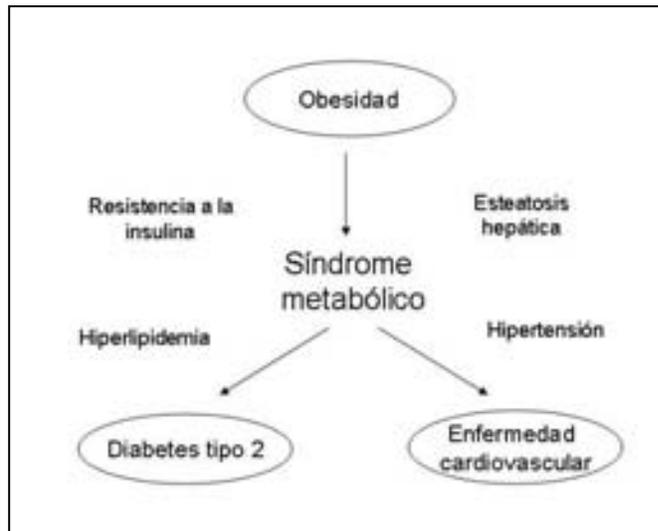


Figura 1: Relación entre la obesidad, el síndrome metabólico y enfermedades crónicas.

La obesidad es causada principalmente por una modificación en el ritmo de vida en las sociedades modernas como la urbanización, automatización del trabajo y el consumo de alimentos con un alto contenido de energía. Esto genera una

disminución progresiva en la cantidad de energía gastada en trabajo físico y a su vez el aumento en el ingreso de energía al organismo, dando como resultado un balance energético positivo y un aumento en el peso corporal [5].

A través del siglo veinte se ha observado un aumento constante en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en la mayoría de los países industrializados e incluso en países en vías de desarrollo [5]. La Organización Mundial de la Salud estima que un billón de personas en el mundo tiene sobrepeso y la mitad de éstas son obesas [4]. En México la Encuesta Nacional de Nutrición 2006 revela una prevalencia de sobrepeso y obesidad de un 65% en hombres y mujeres mayores de 20 años [6]. Estos resultados indican que la obesidad al igual que la desnutrición y las enfermedades infecciosas es un problema de salud pública en el mundo y todas las perspectivas apuntan a que si no se diseñan nuevas y mas eficientes medidas de control, este problema se agravará aún más en las décadas venideras.

SREBP´s y las alteraciones metabólicas del hígado en la obesidad

La obesidad se acompaña de alteraciones metabólicas en tejidos como el hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y pardo [7]. Las alteraciones en la función del hígado en la obesidad ejercen un fuerte impacto en la actividad metabólica del resto de los tejidos, debido a que el hígado regula numerosos aspectos del metabolismo energético en el organismo. El hígado mantiene la concentración circulante de glucosa dentro de un rango estrecho a corto y largo plazo, provee continuamente a los tejidos periféricos de ácidos grasos y colesterol a través de la producción y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), recibe el colesterol excedente del organismo por medio del transporte reverso del colesterol mediado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lo elimina a través de la bilis [8].

La mayor parte de las actividades metabólicas del hígado son controladas principalmente a nivel hormonal por la insulina y glucagon [9]. Ambas hormonas circulan de manera coordinada al consumo de alimento y la producción de una

reprime a la otra, sin embargo los efectos netos en el metabolismo resultan de la concentración relativa de una hormona respecto a la otra denominada relación insulina/glucagon. Por lo que la determinación de este parámetro resulta de gran utilidad en el diagnóstico de alteraciones metabólicas como enfermedades cardiovasculares y dislipidemias [10, 11]. La señalización inducida por estas hormonas produce efectos a corto y largo plazo en la velocidad de las rutas metabólicas en el hígado. El efecto a corto plazo involucra cambios en el estado de fosforilación de las enzimas metabólicas modificando su actividad, mientras que el efecto a largo plazo involucra cambios en la velocidad de transcripción y traducción de los componentes de las vías, los cuales pueden durar horas a días. El control transcripcional ha recibido mucha atención en los últimos años debido al desarrollo de nuevas tecnologías de biología molecular, las cuales han podido revelar el importante papel que juega el control transcripcional en el mantenimiento de la homeostasis energética [12-14].

El control transcripcional del metabolismo energético en el hígado, es mediado por numerosos factores de transcripción, pero entre ellos sobresalen reguladores “maestros” cuya actividad se ha demostrado que ejerce mayor control sobre los demás factores. Entre ellos se encuentra el receptor nuclear hepático (LXR) que controla la transcripción de la mayoría de las enzimas del catabolismo del colesterol y su eliminación a través de la bilis [15], el factor que se une a elementos de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP) que controla la transcripción de la mayoría de las enzimas glicolíticas [16] y la familia de factores de transcripción SREBP (proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides) que controlan la síntesis de ácidos grasos y colesterol [17].

Las SREBPs son factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican enzimas y receptores involucrados en la síntesis y transporte de ácidos grasos y colesterol [17] (**Figura 2**).

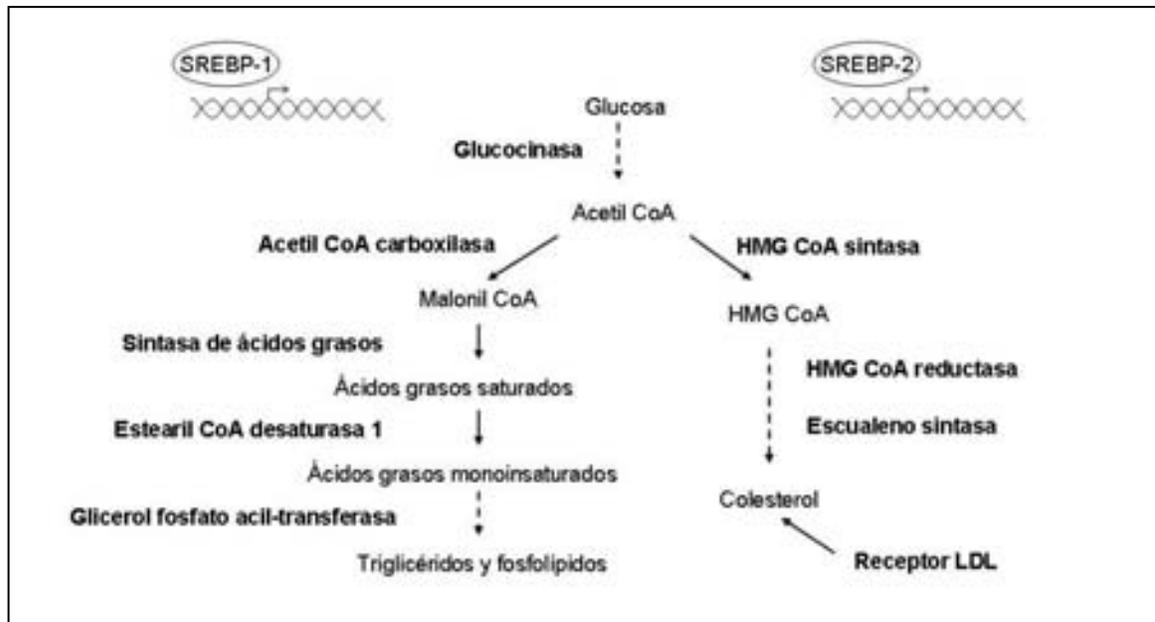


Figura 2: Genes activados por SREBP-1 y SREBP-2 en las rutas de síntesis de colesterol y AG.

Las SREBP se expresan en la mayor parte de los tejidos aunque su contenido es mayor en el hígado, tejido adiposo, riñón e intestino. Las SREBP se sintetizan como precursor inactivo anclado a la membrana del retículo endoplasmático y su activación depende de un procesamiento proteolítico mediado por dos proteasas (S1P y S2P) que liberan el extremo N terminal que constituye el factor de transcripción activo. La SREBP madura viaja al núcleo y allí se une a los elementos de respuesta a esteroides (SRE) en la región promotora de sus genes blanco, posteriormente reclutan factores de transcripción generales como el factor nuclear Y (NFY) para activar la transcripción [18].

La familia de las SREBP comprende tres isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. SREBP-1a y SREBP-1c proceden del mismo gen a través de sitios de inicio de transcripción alternativos. Esto produce una diferencia en la longitud del primer exón que se traduce en una reducción de 18 aminoácidos en el extremo N terminal de SREBP-1c respecto a la isoforma 1a [18]. Aunque la actividad transcripcional de SREBP-1a es significativamente mayor a la de SREBP-1c, su

nivel de expresión en los tejidos es muy baja en relación a la de la isoforma 1c, por lo que su participación en la regulación de la expresión génica es nula ó poco clara [19]. SREBP-1c participa en la regulación del metabolismo de ácidos grasos al activar la expresión de mas de 30 genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y TG (**Figura 2**).

El promotor de SREBP-1 contiene elementos de respuesta para insulina, glucagon, leptina y LXR, por lo que su expresión se regula por acción hormonal en estrecha relación con el comportamiento alimenticio [20, 21].

La tercer isoforma en esta familia de factores de transcripción es SREBP-2. Esta isoforma induce la transcripción de genes relacionados con la síntesis y captura de colesterol, como los que codifican para la HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa y receptor LDL [17, 19] (**Figura 2**). A diferencia de SREBP-1 la activación de SREBP-2 no responde a la insulina, sino que su procesamiento es dependiente del contenido de colesterol en la membrana del retículo endoplasmático [18]. De este modo, SREBP-2 actúa como un sensor del contenido de colesterol intracelular y cuando éste baja, SREBP-2 aumenta su síntesis y captura para mantener un aporte constante de colesterol.

Numerosos estudios han demostrado la importancia de las SREBP's en el desarrollo de las alteraciones metabólicas en el hígado durante la obesidad. La sobre expresión de SREBP-1 en el hígado de ratones transgénicos incrementa la transcripción de las enzimas lipogénicas, esto produce una acumulación masiva de triglicéridos en el hígado, generando hepatomegalia, esteatosis e hipertrigliceridemia [22]. SREBP-1 reprime la transcripción del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2), interfiriendo en la señalización de la insulina e induciendo resistencia de los tejidos a su acción [23, 24]. En ratones obesos (ob/ob) que carecen de leptina, el desarrollo de hígado graso y resistencia a la insulina se asocian con el incremento en el contenido de SREBP-1 en hígado y la administración de leptina, que reprime la transcripción de SREBP-1, revierte estas

alteraciones metabólicas [25]. En ratones transgénicos donde SREBP-1 permanece inactivo, la inducción de la lipogénesis por insulina se reduce de manera significativa [26].

La sobreexpresión de SREBP-2 en hígado de ratones transgénicos incrementa la transcripción de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol y del receptor LDL [27]. Esto incrementa la síntesis de colesterol y su acumulación en el hígado sin elevar la concentración de colesterol total y colesterol-LDL circulante, debido a una mayor captura hepática de colesterol mediada por el receptor LDL. En cambio, una dieta con alto contenido de colesterol reprime la transcripción y procesamiento de SREBP-2 en hígado, disminuyendo no sólo la síntesis de colesterol hepático sino que también la transcripción del receptor LDL [28]. Esto resulta en una elevación en la concentración de colesterol circulante y su acumulación en el endotelio vascular.

Estos resultados han permitido delinear la participación de las SREBP's en el desarrollo de obesidad, en donde la ingestión de alimentos con alto contenido de energía incrementa la producción de insulina activando a SREBP-1 en el hígado. SREBP-1 estimula la síntesis de ácidos grasos y su esterificación en TG para ser enviados a la circulación en las VLDL y almacenarse en el tejido adiposo, aumentando el peso corporal [29, 30].

SREBP-1 no sólo regula la síntesis de lípidos en el hígado, sino que determina también su destino metabólico al controlar la transcripción de la enzima estearil Coenzima A desaturasa (SCD-1) [31]. La SCD-1 cataliza la instauración de los ácidos grasos saturados palmitato y estearato en la posición $\Delta 9$, formando oleato y palmitoleato [32]. Distintos estudios han demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados en el hígado son preferencialmente esterificados en TG para su almacenaje y exportación en las VLDL, disminuyendo la cantidad de ácidos grasos que ingresan a la mitocondria para su oxidación [33] (**Figura 3**). Esto es debido en parte a la mayor afinidad que poseen la glicerol-fosfato acil-transferasa (GPAT) y

la diacil-glicerol acil-transferasa (DGAT) por los ácidos grasos monoinsaturados respecto a los saturados [34].

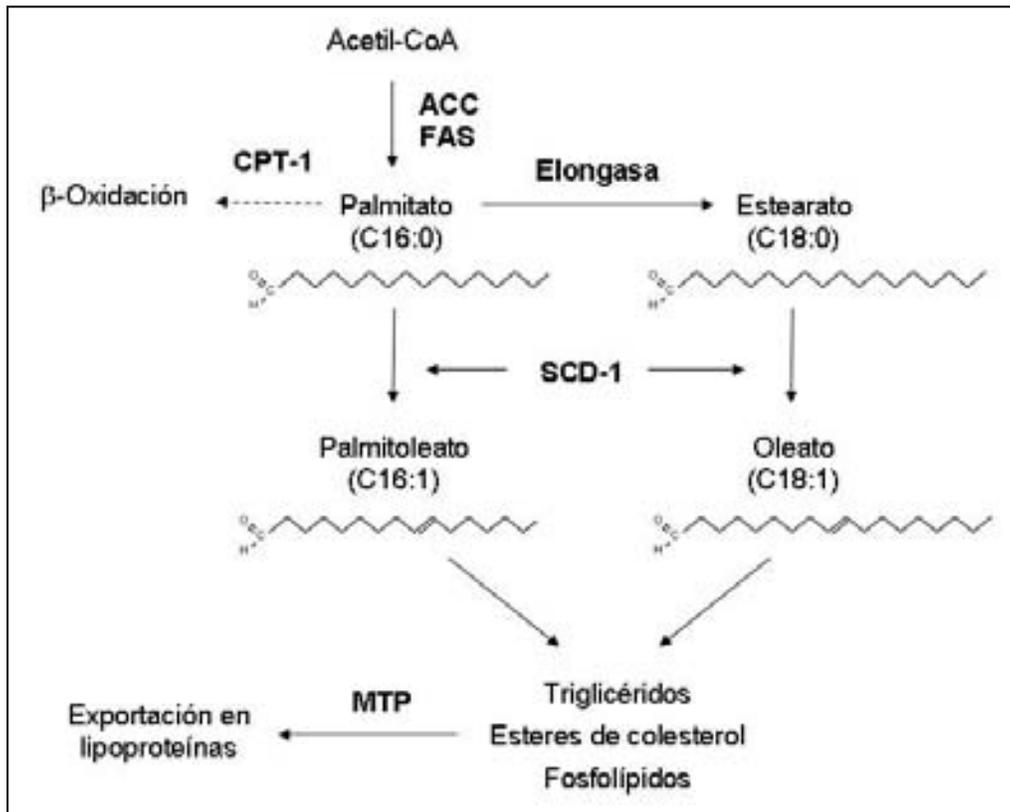


Figura 3: Función de la SCD-1 en el destino metabólico de los lípidos en el hígado. ACC: Acetil-CoA carboxilasa, FAS: Fatty acis synthase (sintasa de ácidos grasos), DGAT: diacylglycerol acyltransferase (diacilglicerol acil-transferasa), GPAT: glycerol phosphate acyltransferase (glicerol-fosfato acil-transferasa), MTP: Microsomal triglyceride transfer protein (acarreador microsomal de triglicéridos).

Estudios en humanos han demostrado que existe una asociación significativa entre la actividad de la SCD-1 y la concentración de triglicéridos circulantes, así como una asociación entre variaciones polimórficas en el gen de la SCD-1 y la susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo 2 [35, 36]. Los ratones transgénicos deficientes de SCD-1 ($SCD-1^{-/-}$) no desarrollan obesidad en una dieta alta en grasa ó hidratos de carbono, presentan una menor concentración de triglicéridos en suero e hígado y no desarrollan resistencia a la insulina [37]. Cuando estos ratones son cruzados con ratones obesos *ob/ob*, las anomalías metabólicas

del hígado se reducen significativamente [38], indicando el importante papel de la SCD-1 en el desarrollo de hígado graso, hipertrigliceridemia y obesidad.

PPAR γ y las alteraciones metabólicas del tejido adiposo en la obesidad

El tejido adiposo juega un papel muy importante en el desarrollo de las alteraciones metabólicas del hígado en la obesidad, debido a que más de la mitad de los lípidos acumulados en el hígado proceden del tejido adiposo [39]. De hecho, la obesidad es por su origen, una enfermedad del tejido adiposo, por lo que el conocimiento de la función del tejido adiposo y sus alteraciones en la obesidad resultan de fundamental importancia para el entendimiento y tratamiento de esta enfermedad y sus consecuencias metabólicas.

El tejido adiposo lleva a cabo dos funciones fundamentales para mantener el balance energético en el organismo: El almacenaje de triglicéridos para proveer de energía al resto de los tejidos en los períodos de mayor demanda energética (ayuno, ejercicio y enfermedad) y la eliminación de la energía excedente en forma de calor a través de la termogénesis adaptativa [40]. Ambos procesos están estrechamente coordinados con la actividad del hipotálamo a través de la producción de varias hormonas que influyen el comportamiento alimenticio y el metabolismo basal [41]. Estas actividades del tejido adiposo permiten al organismo mantener un peso estable a lo largo del tiempo pese a la variabilidad en la ingestión energética al acoplar el ingreso de energía al organismo con el gasto energético [42].

Las distintas funciones del tejido adiposo las realizan dos tipos de células adiposas, que se distinguen entre sí por su morfología y función. Los adipocitos blancos que son células de almacenaje, poseen una sola vesícula lipídica, la cual puede ocupar hasta un 90% del volumen celular y los adipocitos pardos son

células oxidativas que presentan múltiples vacuolas pequeñas asociadas a mitocondrias [43, 44] (**Figura 4**).

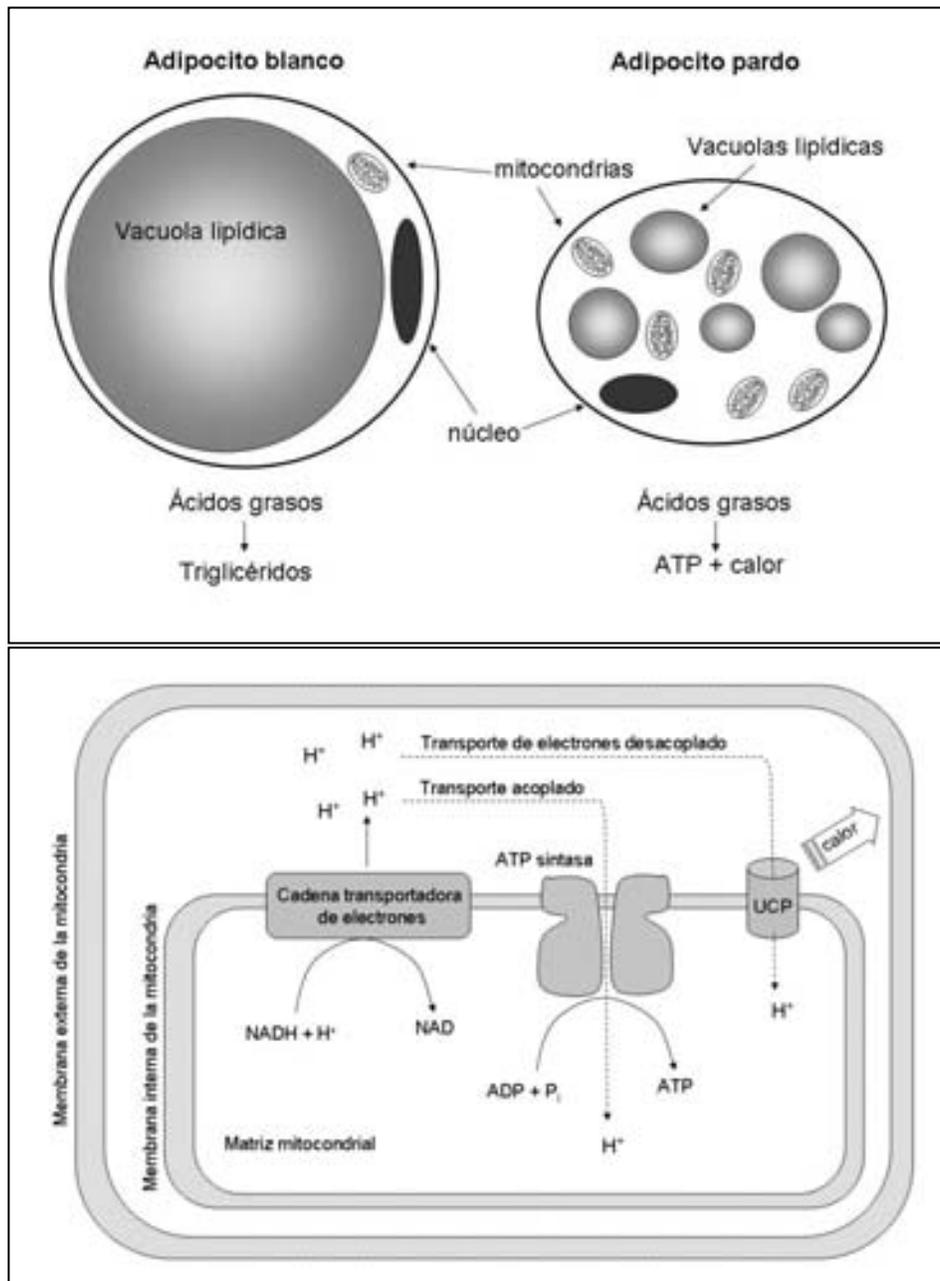


Figura 4: Diferencia morfológica y funcional entre los adipocitos blancos y pardos. Papel de la UCP en el transporte desacoplado de electrones en la mitocondria generando calor en vez de ATP.

En los adipocitos pardos la β -oxidación mitocondrial produce calor en adición al ATP como producto final, ya que la membrana interna de las mitocondrias de

estas células contiene un gran número de proteínas desacoplantes (UCP-1). Las UCP-1 son canales de protones cuya función es desacoplar el transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa. Cuando los protones acumulados en el exterior de la matriz mitocondrial regresan al interior a través de la UCP-1 eluden a la ATP sintasa y la energía almacenada en el gradiente electroquímico se pierde en forma de energía calorífica, evitando su almacenaje como energía química [45] **(Figura 4)**.

A diferencia de los roedores que tienen compartimentos de tejido adiposo pardo bien definidos, en el humano los adipocitos pardos se encuentran diseminados en el interior del tejido adiposo blanco. Sin embargo se estima que la termogénesis adaptativa en el humano puede contribuir en un 10-15% al balance energético [46]. Por lo que resulta muy importante buscar tratamientos enfocados en modular la actividad termogénica del tejido adiposo pardo para su posible aplicación en el tratamiento de la obesidad.

La diferenciación y función de los adipocitos blancos y pardos está controlada principalmente por el receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ) [47, 48]. PPAR γ es el factor de transcripción “maestro” que controla la transcripción de la mayor parte de las enzimas metabólicas de los adipocitos, como la sintasa de ácidos grasos, la glicerol fosfato acil transferasa y las perilipinas en el tejido adiposo blanco [49]. Estas últimas controlan el almacenaje y liberación de ácidos grasos al interferir con la lipasa sensible a hormonas en la membrana de la vesícula lipídica [50]. En el tejido adiposo pardo, PPAR γ controla la expresión de la UCP-1 y la mayoría de las enzimas mitocondriales [51] **(Figura 5)**.

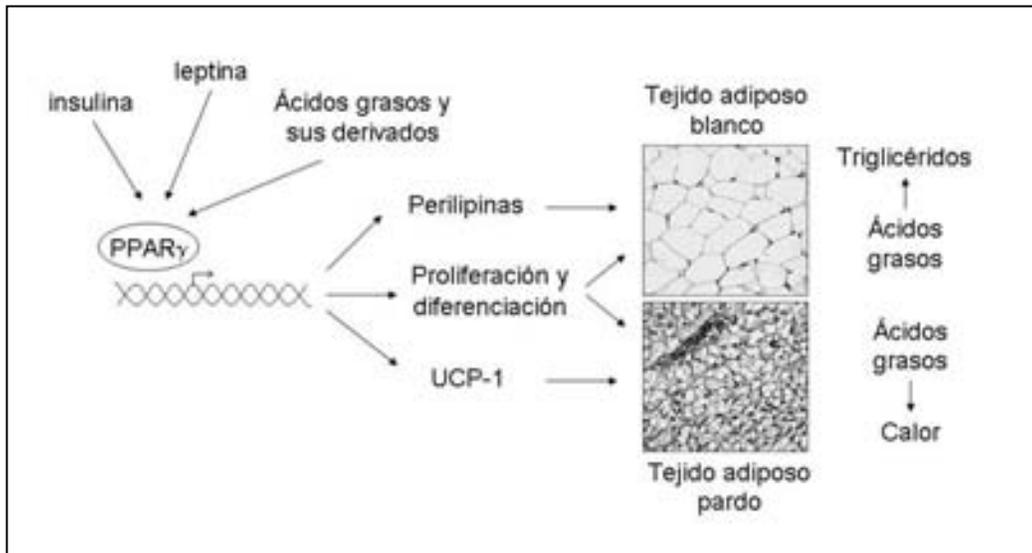


Figura 5: Participación de PPAR γ en el control de la diferenciación y metabolismo de los adipocitos blancos y pardos.

El contenido de PPAR γ en el tejido adiposo aumenta en respuesta a la insulina y leptina y su actividad depende de la unión de sus ligandos que son ácidos grasos poliinsaturados, algunos derivados de prostaglandinas y ácidos grasos insaturados en *trans* [52, 53] (**Figura 5**).

PPAR γ regula también la síntesis y liberación de las distintas hormonas secretadas por el tejido adiposo [54]. Estas hormonas, llamadas en conjunto adipocinas, participan en la regulación de numerosos procesos metabólicos en el organismo [55]. Una de las adipocinas más importantes es la leptina, cuya función es controlar la distribución de lípidos en los tejidos, dirigiendo su almacenaje hacia el tejido adiposo evitando su acumulación en los demás órganos[56, 57]. Esta hormona también participa en la regulación del balance energético a nivel de sistema nervioso central, modificando la actividad de los centros hipotalámicos que regulan el hambre [58]. De esta manera, la leptina acopla la ingestión de energía con el gasto energético para mantener el peso corporal (**Figura 6**).

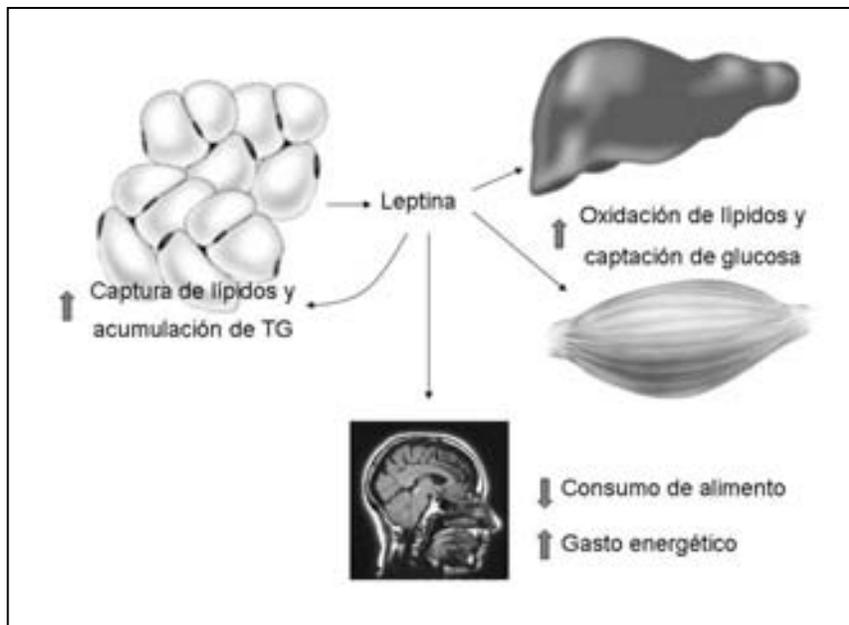


Figura 6: Papel de la leptina en la distribución de lípidos en los tejidos y en la regulación del balance energético.

El consumo de alimentos con una elevada densidad energética incrementa la síntesis de lípidos y su almacenaje en el tejido adiposo, aumentando su volumen. Con el tiempo, el aumento en el volumen del tejido adiposo genera obesidad. Se ha observado que el aumento en el volumen del tejido adiposo en la obesidad es mediado principalmente por crecimiento hipertrófico de los adipocitos más que por un proceso de hiperplasia [59]. Los adipocitos hipertróficos que se observan en la obesidad presentan alteraciones metabólicas significativas, mediadas en parte por una reducción en el contenido de PPAR γ [60]. La disminución en la actividad de PPAR γ en los adipocitos hipertróficos aumenta la producción de leptina y TNF α principalmente [61, 62] y reduce el contenido de perilipinas recubriendo la vesícula lipídica, lo cual incrementa la liberación de ácidos grasos libres a la circulación [63] **(Figura 7)**. Estas alteraciones metabólicas del tejido adiposo en la obesidad tienen un fuerte impacto en el balance energético a nivel corporal y en las actividades metabólicas de los demás tejidos [64].

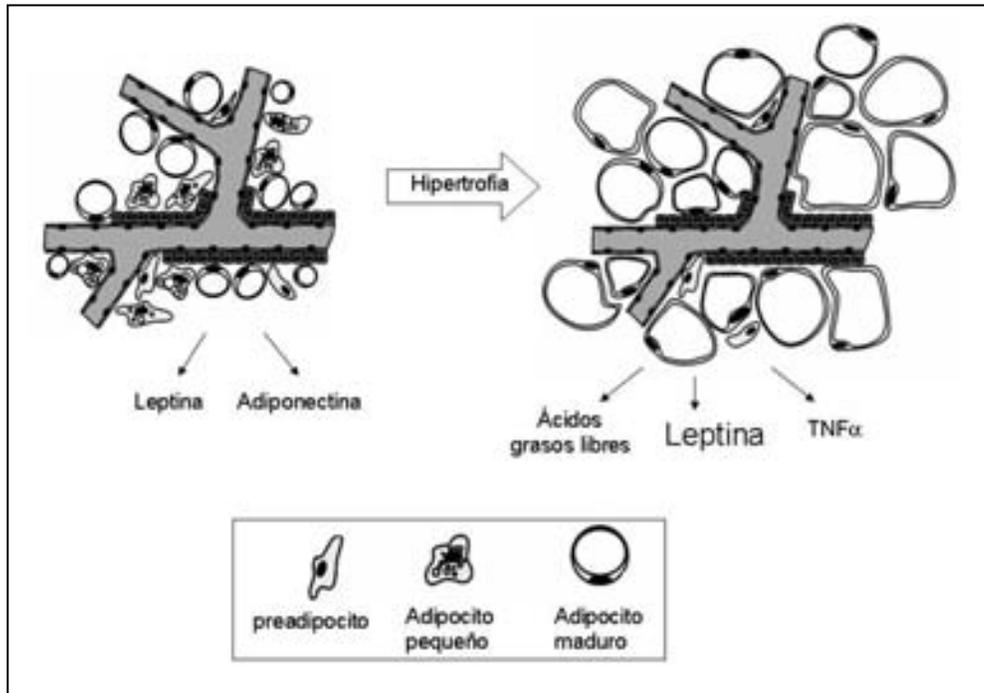


Figura 7: Hipertrofia y alteraciones metabólicas de los adipocitos en la obesidad. Adaptado de [65]

Lipotoxicidad, vínculo entre obesidad y sus alteraciones metabólicas

Estudios epidemiológicos han señalado que existe una fuerte asociación entre el aumento en el volumen de tejido adiposo en la obesidad y el desarrollo de alteraciones metabólicas en otros tejidos, como la resistencia a la insulina [63]. En la búsqueda de los mecanismos moleculares involucrados en esta asociación se ha observado que el grado de resistencia a la insulina se asocia con la acumulación de lípidos en tejidos no-adiposos, como el hígado, músculo esquelético e incluso corazón y páncreas, indicando un efecto directo de los lípidos intracelulares con la aparición de alteraciones metabólicas en estos tejidos. El daño celular mediado por lípidos se ha denominado lipotoxicidad y existe abundante bibliografía que respalda a este mecanismo como el principal mediador de resistencia a la insulina y muerte celular en la obesidad [66-68].

El metabolismo intracelular de ácidos grasos puede seguir tres rutas: β -oxidación, formación de glicerolípidos ó formación de esfingolípidos. Las tres rutas compiten entre si, por lo que el destino final de los ácidos grasos dependerá de su composición y de las demandas energéticas de la célula [69]. En la obesidad, el ingreso continuo de ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo hipertrófico y de la síntesis endógena en los tejidos estimula su acumulación y la producción de intermediarios metabólicamente activos que alteran las funciones normales de la célula [67, 69]. Estudios en humanos y roedores han reportado aumento en el contenido de diacilglicerol y ceramidas en el músculo esquelético en la obesidad. Cultivos de células musculares expuestas a distintos ácidos grasos desarrollan resistencia a la insulina en relación a la formación de diacilglicerol y ceramidas [70, 71]. Se ha observado aumento en la expresión de enzimas involucradas en la formación de ceramidas en tejidos de roedores obesos con resistencia a la insulina y la eliminación de alguna de esas enzimas en ratones transgénicos reduce las alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad [72].

Se ha observado que el mecanismo por el cual el diacilglicerol y las ceramidas interfieren en la señalización de la insulina involucra la activación de proteínas cinasas atípicas como la PKC θ , PKC δ y la PKC ϵ . Estas cinasas activan diversas rutas, como la que involucra a I κ B β y JNK que promueven la fosforilación de los sustratos del receptor a insulina 1 y 2 (IRS-1 y 2) en regiones que reprimen su actividad y en consecuencia, la transducción de la señalización de la insulina [72, 73]. La PKC δ y la PKC ϵ activan también a SREBP-1, el cual puede reducir la señalización de la insulina al reprimir la transcripción de IRS-2 [23]

La producción de diacilglicerol y ceramidas en la obesidad es estimulada aún más por acción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF α y por acción de la leptina y los glucocorticoides [69]. Se ha observado que el tejido adiposo hipertrófico incrementa la producción de estas hormonas [74], estableciendo una relación entre el aumento en volumen de tejido adiposo en la obesidad y el desarrollo de lipotoxicidad y resistencia a la insulina en hígado y músculo esquelético.

En el hígado la acumulación de lípidos genera esteatosis, la cual es una forma relativamente benigna de enfermedad hepática. Sin embargo la elevada concentración circulante de leptina y $TNF\alpha$ en la obesidad generan un ambiente inflamatorio sistémico que promueve el desarrollo de lipotoxicidad y apoptosis de las células del parénquima y la subsiguiente producción de colágeno por las células estelares [75, 76]. De este modo, el proceso de lipotoxicidad estimula la progresión de la esteatosis a cirrosis y fibrosis hepática.

En la **figura 8** están representadas de manera muy sintetizada las alteraciones metabólicas que ocurren en el hígado y tejido adiposo al consumir una dieta con una elevada densidad energética. El consumo crónico de una dieta alta en energía incrementa la producción de insulina por el páncreas activando a SREBP-1 y la lipogénesis hepática. Los triglicéridos son enviados a la circulación a través de las VLDL pero también son almacenados generando esteatosis. El aumento en el contenido de colesterol hepático reduce la actividad de SREBP-2 y la captura de lipoproteínas mediada por el LDLr, incrementando la concentración de LDL circulante y el riesgo de lesiones aterogénicas. El aumento en las lipoproteínas incrementa la captura de lípidos por el tejido adiposo, produciendo adipocitos hipertróficos y obesidad. Los adipocitos hipertóficos desarrollan resistencia a la insulina ocasionando disminución en el contenido de $PPAR\gamma$ y aumento en la liberación de ácidos grasos libres, leptina y $TNF\alpha$ los cuales exacerban el daño hepático mediado por lípidos generando lipotoxicidad. De esta manera se puede observar la interacción entre el hígado y el tejido adiposo que hemos denominado eje adipo-hepático, donde la alteración en la función de uno de estos órganos en la obesidad afecta la función del otro, generando un círculo vicioso que trastorna el eje.

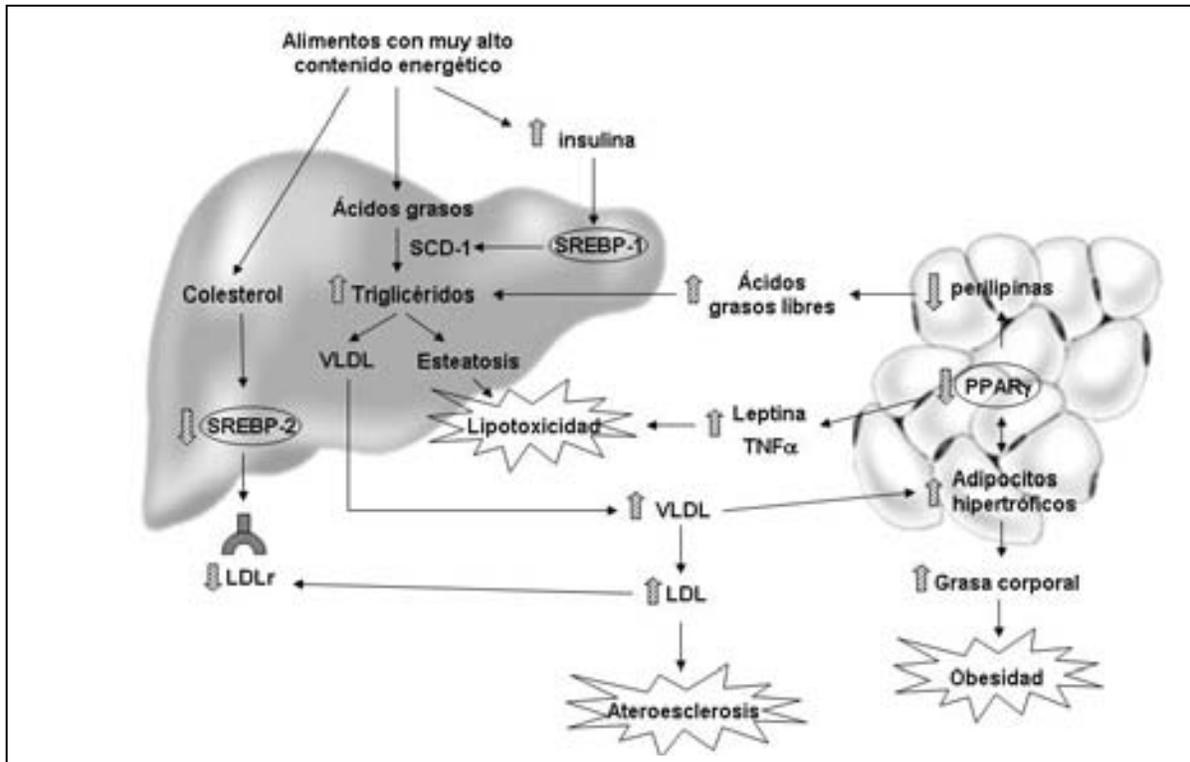


Figura 8: Alteraciones metabólicas en el hígado y tejido adiposo en la obesidad y la participación de los factores de transcripción SREBP-1, SREBP-2 y PPAR γ .

Papel de la dieta en el desarrollo y el tratamiento de la obesidad

Para poder entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la obesidad y sus consecuencias metabólicas así como para desarrollar tratamientos para combatirla, se han generado distintos modelos animales de obesidad, que se pueden dividir en genéticos y dietarios. Los modelos genéticos son roedores que poseen una mutación en algún gen involucrado en el metabolismo energético como la rata Zucker *fa/fa* o el ratón *db/db* que carecen del receptor de leptina (*ObRb*), el ratón *ob/ob* que carece de leptina y el ratón *KKAy* que carece del neuropéptido agouti, involucrado en la regulación central del apetito. Todos estos modelos presentan hiperfagia y desarrollan obesidad, dislipidemia e incluso diabetes [77, 78].

Sin embargo, la obesidad humana rara vez es causada por una alteración monogénica como en los modelos anteriores. Más bien como en la mayoría de las enfermedades, el riesgo de desarrollar obesidad y síndrome metabólico depende en la interacción del bagaje genético con el ambiente, que se compone principalmente de la dieta y la actividad física [2]. Debido al importante papel que juega la dieta en el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico en humanos, los modelos de obesidad dietaria resultan de fundamental importancia para el estudio del desarrollo de la obesidad y sus consecuencias metabólicas.

Las ratas y ratones son los modelos más utilizados para generar obesidad inducida por dieta debido a que pueden desarrollar obesidad y algunos otros factores asociados con el síndrome metabólico en relativamente poco tiempo [79-82]. Las dietas más utilizadas para inducir obesidad y/o síndrome metabólico son dietas altas en grasa, dietas altas en grasa saturada y colesterol y dietas altas en hidratos de carbono simples. Cada tratamiento dietario genera una respuesta diferente en el tipo y grado de las alteraciones metabólicas.

Las dietas altas en grasa contienen del 30 al 60 % de la energía total de la dieta proveniente de la grasa y se utilizan para inducir obesidad, resistencia a la insulina e hiperlipidemia [82, 83]. Generalmente se observa un efecto dosis-respuesta en la velocidad de aumento en peso en relación al contenido de grasa en la dieta. La mayoría de los roedores desarrollan obesidad e hiperlipidemia con una dieta alta en grasa, sin embargo la respuesta puede variar dependiendo de la cepa y género de roedor y del tipo de grasa utilizada en la dieta. Las dietas altas en grasa saturada y colesterol se utilizan para inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis [84]. Aunque los roedores presentan una resistencia a desarrollar aterosclerosis, este tipo de dieta denominada también dieta occidental eleva el colesterol total, el colesterol LDL y en algunos estudios se ha observado incluso lesiones ateroscleróticas [85]. Finalmente, las dietas altas en hidratos de carbono simples se utilizan para inducir hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina [86].

Estudios básicos y epidemiológicos han demostrado que el consumo de monosacáridos como la fructosa y disacáridos como la sacarosa (fructosa+glucosa) se asocia con un aumento en el peso corporal, una elevación en los triglicéridos circulantes y desarrollo de resistencia a la insulina en humanos [87, 88]. A diferencia de los humanos, en los roedores no se observa un aumento en peso significativo con una dieta alta en fructosa o sacarosa, sin embargo estas dietas incrementan la producción de triglicéridos y glucosa por el hígado induciendo hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina [86, 89]. Estos efectos se pueden observar incluso a las dos semanas de consumir una dieta que contenga 65% de sacarosa (por peso) [88].

Sin embargo existe poca información sobre el papel que juega el tipo de proteína sobre el desarrollo de la obesidad. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de proteína de origen vegetal de buena calidad como lo es la proteína de soya incrementa en menor grado la concentración de insulina y esto se ha asociado a una menor expresión de SREBP-1 [90].

Antecedentes

Proteína de soya y metabolismo de lípidos

Los estudios de obesidad inducida por dieta han explorado profundamente el papel de los lípidos e hidratos de carbono en la obesidad y síndrome metabólico en humanos y roedores. Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúan el papel del tipo de proteína en el desarrollo de las complicaciones metabólicas de la obesidad.

La proteína de soya contiene una proporción de aminoácidos que satisface el requerimiento diario de humanos y roedores [91]. En adición a sus propiedades nutricionales, se ha demostrado ampliamente que el consumo de proteína de soya ejerce efectos benéficos en la concentración de lípidos circulantes. Dos meta-

análisis del efecto de la proteína de soya dietaria sobre el perfil de lípidos en humanos demostraron que el consumo de proteína de soya puede reducir la concentración de colesterol total, LDL-colesterol y TG en un 3.8-9.3%, 5.3-12.9% y 7.3-10.5% respectivamente, y aumentar la concentración de HDL-colesterol en un 2.4-3% [92, 93].

Se ha descrito que el efecto de la proteína de soya sobre los lípidos circulantes es mediado por el patrón de aminoácidos, sin embargo al suplementar la proteína de soya con aminoácidos de tal manera que sea similar al patrón de la caseína aún se observa un efecto [94, 95]. Estos y otros estudios han demostrado que no sólo el contenido de aminoácidos es responsable del efecto hipolipidémico de la proteína de soya.

La planta de soya sintetiza una serie de compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Estos son metabolitos secundarios que la planta utiliza como protección contra el ataque de microbios e insectos [96]. Los flavonoides más abundantes en la soya son las isoflavonas genisteína y dadzeína. A estas isoflavonas se les denomina fitoestrógenos debido a su similitud estructural con el 17- β estradiol, a tal grado que son capaces de unirse y modular la actividad de los receptores a estrógenos [97]. Las isoflavonas se asocian fuertemente a la proteína y su concentración en aislados de proteína de soya es aproximadamente de 2 mg/g de proteína [98].

Respecto al efecto biológico de las isoflavonas, numerosos estudios han demostrado que actúan de manera sinérgica con la proteína revelando que el efecto completo de la soya dietaria sobre el metabolismo de lípidos sólo se observa cuando se administra la proteína de soya con isoflavonas [99, 100].

En la búsqueda de los mecanismos que participan en el efecto de la proteína de soya dietaria sobre el metabolismo de lípidos se ha observado que el consumo de proteína de soya influye la secreción de hormonas como la insulina y glucagón

[10, 101]. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la proteína de soya regula la síntesis y secreción de insulina por los islotes pancreáticos [100] y probablemente la secreción de glucagon también, reduciendo la relación insulina/glucagon circulante **(Figura 9)**. Esto es importante debido a la asociación que existe entre la relación insulina/glucagon y el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Se ha demostrado también que el consumo de proteína de soya puede modificar la producción de hormonas gastrointestinales. Las proteínas son hidrolizadas en el estómago e intestino a sus componentes básicos, los aminoácidos para su absorción. Sin embargo durante su hidrólisis se generan pequeñas cadenas de aminoácidos de 3 a 10 residuos que interactúan con receptores específicos en la pared gástrica e intestinal [102, 103]. Estos receptores inducen la liberación de hormonas gastrointestinales como el péptido similar al glucagon (GLP-1) y la colecistocinina, que influyen la saciedad, la producción de hormonas pancreáticas y la distribución de los nutrimentos en el organismo [104-106] **(Figura 9)**. En general las proteínas de origen vegetal difieren en las de origen animal en el patrón de aminoácidos, por lo que al ser hidrolizadas liberan distintos péptidos que estimulan diferentes receptores y por lo tanto, diferentes hormonas gastrointestinales ó incretinas. Estos resultados indican que el consumo de proteína de soya ejerce su acción en el organismo en parte a través de efectos endócrinos.

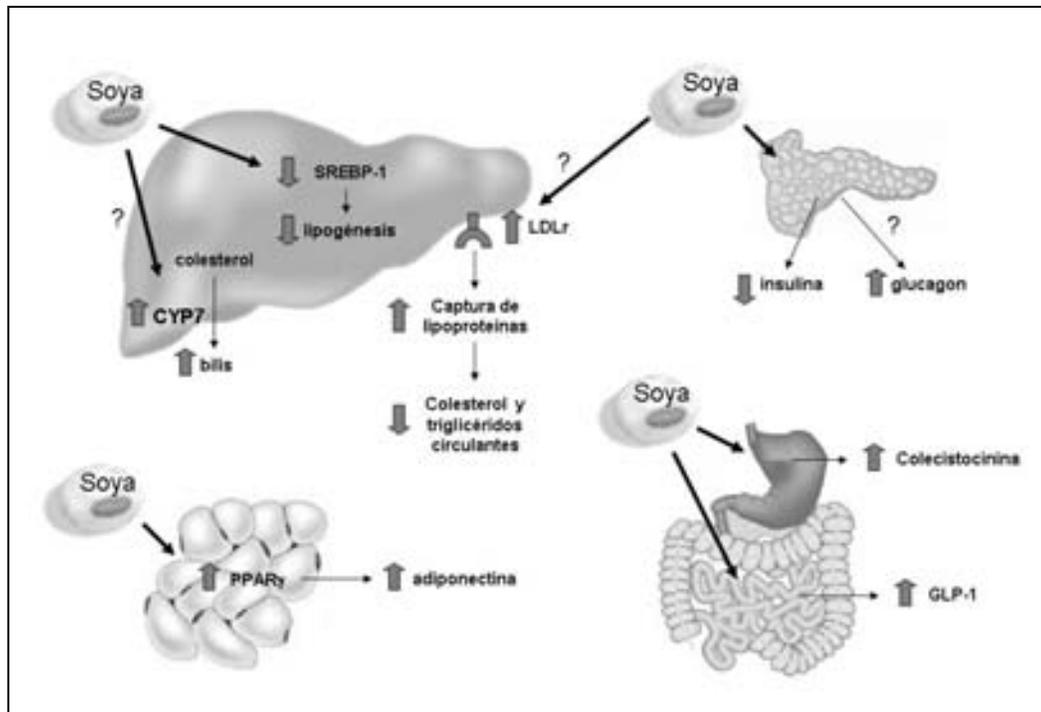


Figura 9: Sitios de acción de la proteína de soya dietaria en órganos involucrados en el metabolismo de lípidos. Las interrogaciones indican intermediarios aun no determinados en el mecanismo de acción de la proteína de soya dietaria. GLP-1: glucagon like peptide (péptido similar al glucagón).

La proteína de soya ejerce efectos directos en el metabolismo de lípidos en el hígado. Se ha demostrado que el consumo de proteína de soya en ratas modifica expresión de algunas proteínas del metabolismo de lípidos en el hígado, como el receptor de LDL, la sintasa de ácidos grasos e incluso de la 7α hidroxilasa, una enzima importante en síntesis de ácidos biliares [107-109] (**Figura 9**). Estos efectos podrían estar mediados en parte por la modificación en la actividad de algunos de los factores de transcripción que regulan su expresión como LXR, SREBP-1 y SREBP-2 [90, 100], aunque aun no se ha demostrado de manera definitiva. Estos resultados sugieren que la proteína de soya dietaria y de manera particular las isoflavonas que contiene, puede regular la velocidad de síntesis de ácidos grasos y la captura y eliminación de colesterol en el hígado de manera directa e indirecta.

Finalmente se ha observado que la proteína de soya dietaria puede tener también un efecto sobre la función del tejido adiposo. Estudios *in vitro* han demostrado que las isoflavonas de la soya son capaces de activar al receptor PPAR γ , modificando la síntesis de adiponectina [110, 111] (**Figura 9**). Este efecto podría tener un impacto importante en la regulación del metabolismo de lípidos durante la obesidad, donde se observa una reducción en la actividad de PPAR γ y alteraciones en la producción de hormonas por los adipocitos. Sin embargo, no se conoce el efecto *in vivo* de la proteína de soya sobre la actividad del tejido adiposo en modelos de obesidad inducida por dieta.

Los estudios metabólicos a nivel nutricional han permitido cambiar varios conceptos en el campo de la nutrición, haciendo notar que los nutrientes determinan de manera significativa su destino metabólico en el organismo y a largo plazo, nuestro estado de salud. De hecho, la dieta debe ser considerada un factor determinante en el estado general de salud de un individuo, actuando como el principal promotor de obesidad, pero también como el principal tratamiento para combatirla.

Justificación

Debido a que la obesidad es una enfermedad crónica, discapacitante y costosa a nivel mundial, es una urgencia el desarrollar y evaluar estrategias terapéuticas eficaces para combatirla. Estas estrategias podrán ser mejoradas conforme aumente el conocimiento de las bases moleculares que regulan el peso corporal. Hasta el día de hoy los tratamientos disponibles incluyendo a los fármacos son paliativos y sólo son efectivos mientras se mantenga su uso. Por lo que resulta importante estudiar el posible efecto terapéutico del consumo de proteína de soya sobre las alteraciones metabólicas en hígado y tejido adiposo en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa e identificar algunos de los mecanismos moleculares involucrados en este efecto.

Hipótesis

En ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, el consumo de proteína de soya reducirá el contenido de SREBP-1 en hígado y aumentará el contenido de PPAR γ en tejido adiposo, reduciendo la acumulación de lípidos y la producción de lipoproteínas en hígado, la liberación de ácidos grasos libres por el tejido adiposo blanco y aumentará la termogénesis en el tejido adiposo pardo respecto a ratas alimentadas con caseína.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la proteína de soya en una dieta alta en grasa por 180 días sobre las alteraciones metabólicas del hígado y tejido adiposo respecto a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa con caseína.

Objetivos particulares

- Evaluar el desarrollo de obesidad en las ratas alimentadas con las dietas altas en grasa a través de la determinación de la ganancia de peso, consumo de alimento y la composición corporal.
- Determinar el efecto de las dietas altas en grasa sobre la concentración de insulina, glucagon, glucosa, colesterol y triglicéridos en suero.
- Evaluar la lipotoxicidad hepática a través de contenido de mRNA y proteína de SREBP-1, la acumulación de lípidos, glucógeno y depósitos de colágeno.
- Evaluar la participación del hígado en el contenido de lípidos circulantes al determinar el contenido de mRNA de SCD-1, SREBP-2 y LDLr en hígado y el perfil de lipoproteínas en suero.

- Evaluar la funcionalidad del tejido adiposo blanco a través del análisis de la morfología de los adipocitos, el contenido de mRNA de PPAR γ , perilipinas, TNF α y SOCS-3 y la determinación de ácidos grasos libres y leptina en suero.

Evaluar la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo a través del análisis de la morfología de los adipocitos y el contenido de Mrna de Pary y UCP-1.

Métodos

Animales y diseño experimental: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 4 semanas de vida provenientes del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (DIEB-INCMNSZ). Los animales se dividieron en cuatro grupos de 8 ratas: dos grupos alimentados con dietas control con 5% de grasa (11% de la energía total) con caseína (CAS) ó aislado de proteína de soya (SOY) como fuente de proteína y dos grupos con dietas altas en grasa con 25% de grasa (45% de la energía total) con caseína (CAS-AG) ó aislado de proteína de soya (SOY-AG) (**Figura 10**).

El contenido de proteína de las dietas fue 30% y se ajustó con base en la pureza de la proteína, que es de 86% para el aislado de proteína de soya y 90.6% para la caseína. La composición de las dietas control se basa en la recomendación AIN-93 para animales de laboratorio [112]. Las ratas fueron alimentadas por 180 días.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta y al agua. Cada tercer día se registró el peso corporal y el consumo de alimento. El estudio tuvo una duración de 180 días.

Diseño experimental		Composición de las dietas (%)		
<ul style="list-style-type: none"> • Ratas Sprague-Dawley macho de 4 semanas • n=8 • Alimentación <i>ad libitum</i> en jaulas individuales • Duración del estudio: 180 días • Muestras en ayuno de 12h • Obtención de suero, hígado, TAP, TAB 				
		Ingredientes	Dietas control	Dietas altas en grasa
Dietas control		Caseína o proteína de soya	30	30
Dietas altas en grasa		Manteca de cerdo	-	20
1) Caseína + 5% grasa		Aceite de maíz	5	5
2) Proteína de soya + 5% grasa		Dextrosa	29.4	19.4
3) Caseína + 25% grasa		Almidón	29.4	19.4
4) Proteína de soya + 25% grasa		Mezcla mineral Rogers-Harper	5	5
		Mezcla de vitaminas AIN93-VX	1	1
		Citrato de colina	0.17	0.17
		Contenido energético	4.0 Kcal/g	5.0 Kcal/g

Figura 10: Diseño experimental y composición de las dietas experimentales

Al final del estudio se obtuvieron las muestras previo ayuno de 12 horas. Se colectó la sangre troncal en tubos con activador de coagulación y gel separador y se mantuvo en hielo hasta la separación del suero. El suero se almacenó a -20°C . Se colectaron muestras de hígado, tejido adiposo pardo (TAP) y tejido adiposo blanco (TAB) en tubos de microcentrífuga, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -70°C . Otra muestra de cada tejido se fijó en formalina 10% para el análisis histológico. El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ.

Composición corporal: A las ratas se les retiró la piel y vísceras conservando el tejido adiposo. Se molieron con 3 volúmenes de agua destilada, se secaron en un horno de convección y se molieron nuevamente para obtener un polvo fino. El contenido de grasa y proteína se determinaron por métodos bromatológicos como se ha descrito [113, 114].

Hormonas y metabolitos en suero: La concentración de insulina, leptina y glucagon se determinó por radioinmunoensayo (Linco Research immunoassay, St. Charles, MO, EUA). La concentración de colesterol, TG y glucosa se determinó por ensayos enzimático-colorimétricos (DiaSys Diagnostic Systems GMBH, Holzheim, Alemania). La concentración de ácidos grasos libres se determinó también por ensayo enzimático-colorimétrico (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EUA).

Contenido de mRNA: El RNA total de hígado, tejido adiposo blanco y pardo se aisló por el método de Chomczynski y Sacchi de la siguiente manera: se homogenizaron 500 mg de tejido congelado en 8 ml de solución de tiocianato de guanidina/ β -mercaptoetanol, se agregaron 400 μ l de N-laurilsarcosina 10% y se centrifugó por 15 min, 18°C, 14000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de polialómero con 4 ml de cloruro de cesio y sometió a ultracentrifugación por 18 hrs, 18°C, 29000 rpm. La pastilla de RNA se resuspendió en 100 μ l de agua estéril y se cuantificó en buffer TE pH 7.5 a 260 nm. Para evaluar la integridad del RNA, se analizaron 10 μ g de RNA por electroforesis en gel de agarosa 1%/formaldehído 2.2M. El análisis del contenido de mRNA se realizó por PCR en tiempo real usando ensayos fluorogénicos TaqMan de Applied Biosystems, en el equipo ABI prism 7000 SDS (AB, Foster City, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, User Bulletin no.2). Primero se realizó un rango dinámico de concentración de RNA para cada gen para conocer la concentración óptima de RNA en la reacción. Se utilizaron concentraciones de 3000 ng, 300 ng, 30 ng y 3 ng. Para todos los genes se utilizó la concentración de 300 ng.

Los genes analizados, el tejido donde se detectaron y el número de ensayo TaqMan se enlistan en la **Tabla 1**. La reacción se llevó a cabo usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR Master Mix, AB). Paralelamente a las muestras se corrieron reacciones sin RNA como control. Las muestras se corrieron por triplicado. En la curva de amplificación se determinó el ciclo al corte (Ct) y se determinó el valor de

expresión con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (User Bulletin no.2). Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural en cada reacción. Para el hígado se utilizó 18S y para tejido adiposo blanco y pardo se utilizó β -actina como genes estructurales.

Nombre del gen	Tejido donde fue detectado	No. de ensayo TaqMan AB
CPT-1	Hígado	Rn00580702_m1
LDLr	Hígado	Rn00598442_m1
SCD-1	Hígado	Rn00594894_m1
SREBP-1	Hígado	Ensayo sobre diseño
SREBP-2	Hígado	Ensayo sobre diseño
18S	hígado	4310893E
Perilipina	TAB	Rn00558672_m1
SOCS-3	TAB	Rn00585674_s1
TNF α	TAB	Rn99999017_m1
UCP-1	TAP	Rn00562126_m1
β -actina	TAP, TAB	Rn00667869_m1
PPAR γ	TAP, TAB	Rn00440945_m1

Tabla1: Genes analizados, tejido en donde se detectaron y ensayo TaqMan de Applied Biosystems

Análisis de proteínas: Se determinó el contenido de las proteínas SREBP-1 y SREBP-2 en hígado por western blot de la siguiente manera: Se homogenizaron 500 mg de tejido congelado en buffer RIPA (Santa Cruz Biotechnology) con inhibidor de proteasas Complete (Roche Applied Science) en hielo, se centrifugaron a 3000 rpm, 5 min, 2°C y se colectó el sobrenadante. Las muestras se cuantificaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu y separaron en gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) por electrotransferencia. Las membranas se bloquearon incubándolas en leche descremada al 0.4% e incubaron por 12h con los anticuerpos primarios a 4°C. los anticuerpos utilizados fueron: anti-SREBP-1 (sc-367, Santa Cruz Biotechnology,

dilución 1:300), anti-SREBP-2 (sc-81510, dilución 1:1000) y anti- β -actina como control de carga. Finalmente las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:5000) por 45 min y las bandas se visualizaron con un reactivo quimioluminiscente (Visualizer Spray and Glow, Santa Cruz).

Contenido de lípidos en hígado: Los lípidos totales del hígado se extrajeron por el método de Folch *et al.*, [115] de la siguiente manera: se homogenizaron 100 mg de tejido en 5 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1) y centrifugó a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. La fase superior se eliminó y la fase inferior se evaporó en nitrógeno. La pastilla se resuspendió en 100 μ l de isopropanol/tritón X-100 (10%) y se determinó la concentración de colesterol y TG. Para evaluar la distribución de las vesículas lipídicas en los hepatocitos se realizaron cortes histológicos por congelación de 5 μ m, se tiñeron con rojo oleoso y contrastaron con hematoxilina acuosa. Las laminillas se montaron con medio de montaje acuoso (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Glucógeno en hígado: El glucógeno se extrajo de muestras congeladas de hígado por el método de Good *et al.*, [116] de la siguiente manera: Se disolvió 1 g de tejido en 2 ml de KOH 30% en baño con agua en ebullición. El glucógeno se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% y centrifugó. El glucógeno se hidrolizó calentando por 2 horas con 2 ml de HCl 0.6 N. La solución se neutralizó con NaOH en rojo fenol y se determinó la concentración de glucosa.

Análisis histológico: Muestras de hígado, tejido adiposo blanco y pardo se fijaron en formalina 10%, deshidrataron en 3 baños de etanol 100%, 3 baños de xilenos y embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m. Los cortes de hígado se tiñeron con la técnica de PAS para evaluar el contenido de glucógeno y MASSON para evaluar depósitos de colágeno. Los cortes de tejido adiposo se tiñeron con hematoxilina-eosina para analizar el área de las vacuolas lipídicas.

Fraccionamiento de lipoproteínas: Las distintas subclases de lipoproteínas se separaron por medio de ultracentrifugación en un gradiente secuencial de KBr usando las siguientes densidades: <1.006 g/ml para VLDL, entre 1.006 y 1.019 para IDL, densidades entre 1.019 y 1.063 g/ml para LDL y densidades entre 1.063 y 1.21 para HDL. Se colectaron 38 fracciones de 340µl y se determinó la concentración de colesterol y TG en cada una.

Análisis estadístico: Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Los datos con una distribución variable se transformaron logarítmicamente antes de su análisis. Los datos al final del estudio fueron evaluados usando un análisis de varianza de una vía. Cuando la interacción resultó significativa se realizó la prueba PLSD de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$. La relación entre parámetros se analizó usando regresión lineal simple. El análisis histológico del tejido adiposo se realizó en cuatro ratas por grupo. Las laminillas se dividieron en 4 campos y en cada campo se cuantificó el área de 10 células. Todos los análisis se realizaron en el programa StatView 4.5 (Abacus Concepts) para Macintosh.

Resultados

Ganancia de peso, consumo de alimento y composición corporal: En el presente estudio, las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con caseína (CAS-AG) por 180 días presentaron aumento significativo en el peso corporal respecto a las ratas alimentadas con la dieta control con caseína (CAS) (**Figura 11A**). Los animales alimentados con la dieta alta en grasa con soya (SOY-AG) también presentaron mayor peso corporal al de las ratas alimentadas con la dieta control con soya (SOY). De manera interesante, el peso de las ratas de los grupos SOY y SOY-AG al final del estudio fue significativamente menor al de las ratas de los grupos CAS y CAS-AG respectivamente, pese a que el consumo de alimento de los cuatro grupos a lo largo del estudio fue igual (**Figura 101B**). Para evaluar si la diferencia en peso fue debida a un cambio en el contenido de

proteína corporal (masa magra) y/o masa grasa, se realizó un análisis bromatológico. El contenido de grasa fue significativamente mayor en las ratas del grupo CAS-AG con respecto al resto de los grupos, mientras que el contenido de proteína no presentó diferencia en los cuatro grupos (**Figura 11C y D**). Este resultado indica que la diferencia en peso entre grupos fue debida al mayor contenido de grasa corporal en el grupo alimentado con la dieta CAS-AG y no a la reducción en el contenido de proteína corporal en las ratas alimentadas con las dietas con proteína de soya.

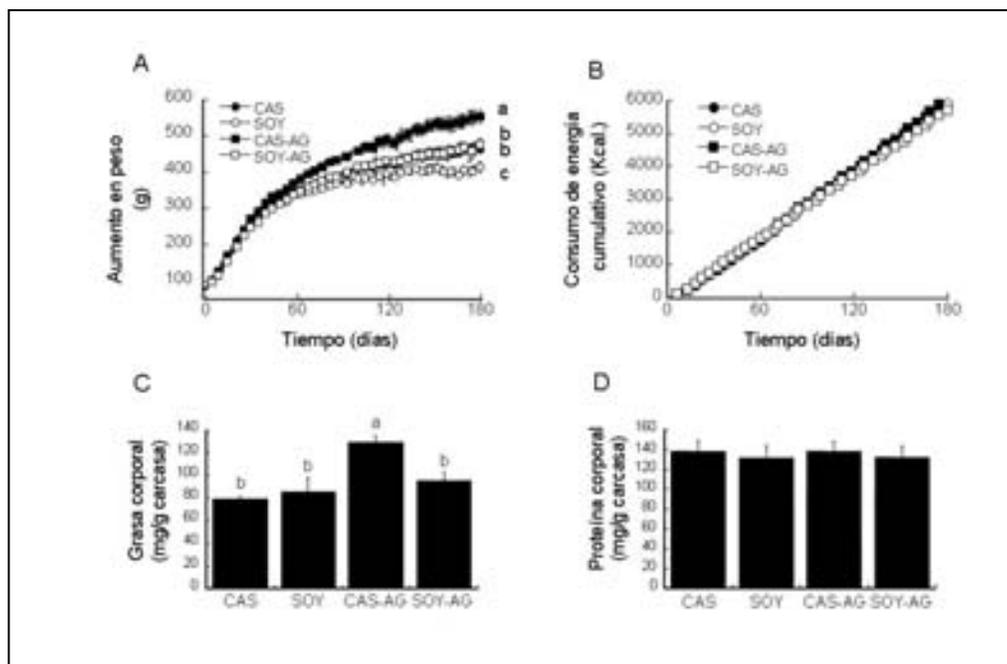


Figura 11: (A) Ganancia de peso, (B) consumo de alimento acumulativo, (C) contenido de grasa corporal y (D) contenido de proteína corporal en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Insulina, glucagon y glucosa en suero y glucógeno en hígado: El aumento en peso en la obesidad comúnmente se acompaña de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Sin embargo, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de proteína de soya es capaz de regular la síntesis y secreción de insulina por las células β del páncreas, evitando la hiperinsulinemia [90]. Para evaluar si la proteína de soya dietaria es capaz de evitar la hiperinsulinemia en ratas alimentadas con dieta alta en grasa se determinó la concentración circulante de insulina. La concentración de insulina en los grupos alimentados con las dietas altas en grasa fue significativamente mayor respecto a la de los grupos control. La concentración de insulina fue igual en los grupos CAS-AG y SOY-AG, indicando que a diferencia de lo esperado, el tipo de proteína en la dieta no modificó la concentración de insulina en suero (**Figura 12A**). Este resultado indica que el consumo de proteína de soya no fue capaz de evitar el aumento en la concentración circulante de insulina estimulada por el consumo de dieta alta en grasa. Sin embargo, de manera interesante ambos grupos alimentados con proteína de soya presentaron un contenido de glucagon en suero mayor al de su respectivo grupo con caseína (SOY vs. CAS y SOY-AG vs. CAS-AG) (**Figura 12B**). Esta diferencia modificó la relación insulina/glucagon en los cuatro grupos, resultando significativamente menor en el grupo SOY-AG respecto al grupo CAS-AG (**Figura 12C**).

Para evaluar si esta diferencia en la relación insulina/glucagon modificó la concentración de glucosa circulante y el glucógeno en hígado; se evaluaron estos parámetros en las ratas de los cuatro grupos. Los resultados muestran que la concentración de glucosa circulante fue significativamente menor en el grupo SOY-AG respecto al grupo CAS-AG ($p < 0.05$) (**Figura 12D**). El contenido de glucógeno en hígado también fue menor en las ratas del grupo SOY-AG respecto a las ratas del grupo CAS-AG ($p < 0.05$) (**Figura 12E**). Estos resultados se confirmaron con el análisis histológico de hígado teñido con la técnica de PAS (**Figura 12F**). El contenido de glucógeno en hígado se ha utilizado como indicador de resistencia a la insulina, por lo que estos resultados indican que las ratas

alimentadas con proteína de soya mantuvieron un efectivo control de la glucemia aún cuando fueron alimentadas con una dieta alta en grasa. Los resultados también indican que la mayor sensibilidad hepática a la insulina en los animales alimentados con la dieta SOY-AG pudo deberse en parte a una menor relación insulina/glucagon.

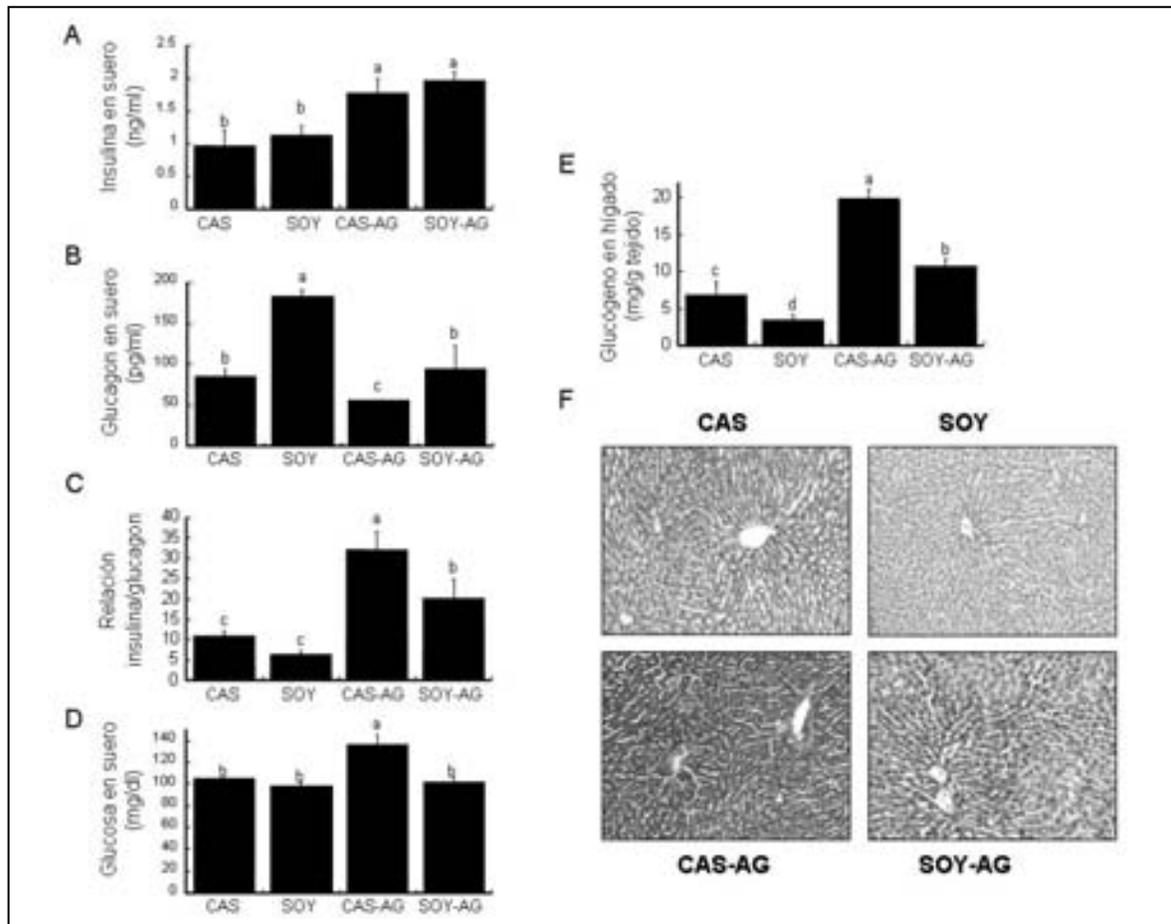


Figura 12: (A) Concentración de insulina en suero, (B) glucagon en suero, (C) relación insulina/glucagon, (D) concentración de glucosa en suero, (E) contenido de glucógeno en hígado y (F) contenido de glucógeno en histología de hígado de ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Contenido de SREBP-1 en hígado: Se ha establecido que la relación insulina/glucagon alta se asocia a hiperlipidemia y al aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular en humanos. Esto se debe en parte a que la relación insulina/glucagon controla la expresión del factor de transcripción SREBP-1 en el

hígado y de este modo, la expresión de enzimas involucradas en la glicólisis y lipogénesis. El contenido de mRNA de SREBP-1 en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta SOY-AG fue significativamente menor al de las ratas alimentadas con la dieta CAS-AG (**Figura 13A**) en asociación con la relación insulina/glucagon en suero (**Figura 13B**). SREBP se transcribe como una proteína precursora de 125 Kda la cual sufre proteólisis regulada que libera al factor de transcripción maduro de 68 Kda que viaja al núcleo. El análisis por western blot mostró que el contenido de SREBP-1 precursor y maduro fue menor en el hígado de las ratas SOY-AG respecto a las ratas CAS-AG (**Figura 13C**), pese a que ambos grupos presentaron la misma concentración de insulina en suero.

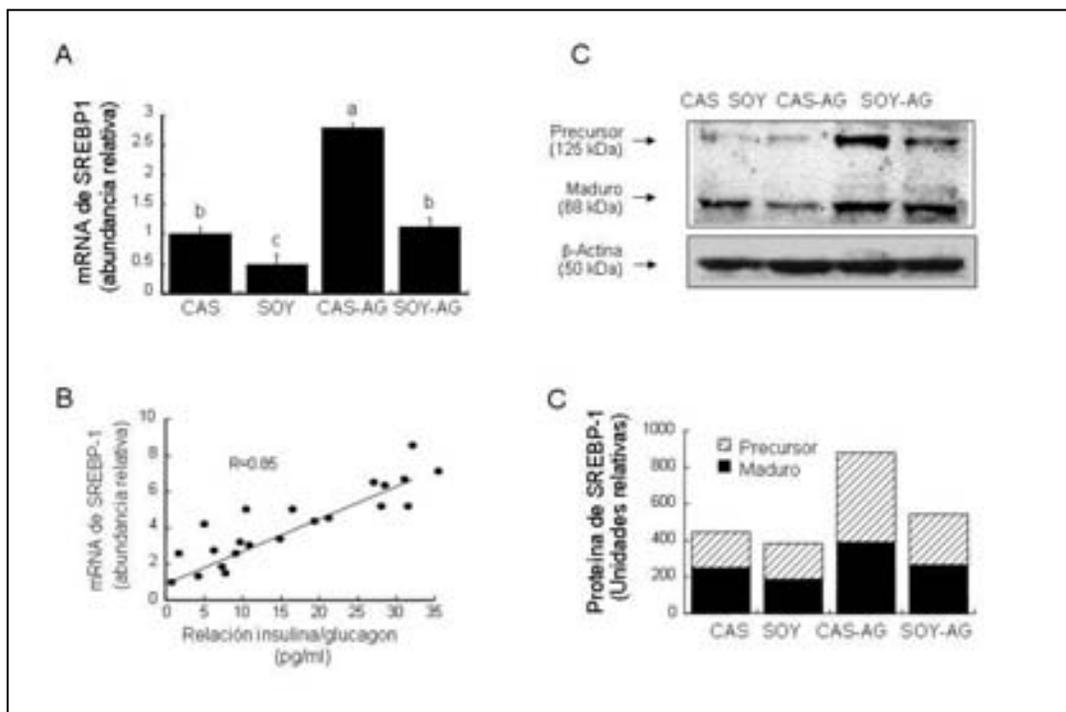


Figura 13: (A) Contenido de mRNA de SREBP-1 en hígado, (B) correlación entre el mRNA de SREBP-1 en hígado y la relación insulina/glucagon y (C) contenido de proteína precursora y madura de SREBP-1 en hígado en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Contenido de lípidos en hígado: Para evaluar si la disminución en el contenido de SREBP-1 en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta SOY-AG se relaciona con el grado de esteatosis hepática se determinó el contenido de lípidos en hígado. En el análisis histológico con la tinción de rojo oleoso se observó esteatosis macrovesicular en más del 80% del área analizada de las ratas alimentadas con CAS-AG (**Figura 14A**). De manera sorprendente, en el hígado de las ratas alimentadas con SOY-AG no se encontraron grandes vacuolas lipídicas ni alteraciones morfológicas evidentes como en el grupo CAS-AG pese a que consumieron dieta alta en grasa por seis meses. Estos hallazgos histológicos fueron confirmados con la determinación de colesterol y triglicéridos (TG) en extractos de hígado. El contenido de colesterol y TG fue significativamente menor en los extractos del grupo SOY-AG respecto al grupo CAS-AG (**Figura 14B y C**). Estos resultados indican que la disminución en el contenido de SREBP-1 en hígado puede evitar el desarrollo de esteatosis hepática en ratas alimentadas con dieta alta en grasa.

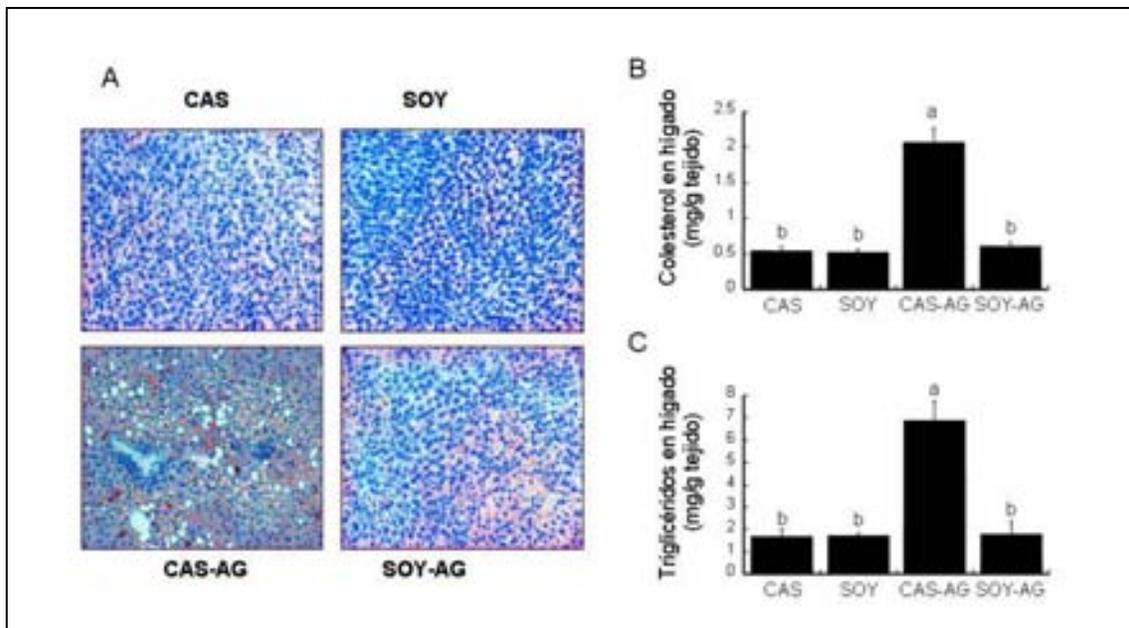


Figura 14: (A) Cortes en congelación de hígado y tinción con rojo oleoso, (B) contenido de colesterol en hígado y (C) contenido de triglicéridos en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican una diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Colesterol y triglicéridos en suero, perfil de lipoproteínas y mRNA de SCD-1 en hígado: La obesidad se asocia con el desarrollo de hiperlipidemia en humanos. Esta asociación se ha observado también en roedores alimentados con dieta alta en grasa. En el presente estudio, las ratas alimentadas con las dietas con soya presentaron una concentración de colesterol total y LDL-colesterol en suero significativamente menor respecto a aquellas alimentadas con caseína (SOY vs. CAS y SOY-AG vs. CAS-AG) (**Figura 15A y 15B**). La misma tendencia se observó con el contenido de TG totales y VLDL-TG (**Figura 15C y D**). El grupo de Attie y Ntambi han encontrado que el grado de insaturación de los ácidos grasos hepáticos mediado por la enzima SCD-1 determina mayormente su destino metabólico. De este modo los ácidos grasos monoinsaturados son preferencialmente utilizados para su esterificación en TG y producción de VLDL, incrementando la concentración de lípidos plasmáticos. En el presente estudio el contenido de mRNA de SCD-1 en hígado se vio modulado por el tipo de proteína en la dieta y no por el contenido de grasa. El contenido de mRNA de SCD-1 fue significativamente menor en el hígado de las ratas de los grupos SOY y SOY-AG que en el de las ratas de los grupos CAS y CAS-AG (**Figura 15E**).

El contenido de SCD-1 en hígado presentó asociación significativa con la concentración de colesterol total y LDL-colesterol así como de TG totales y VLDL-TG (**Figura 15F**). Estos resultados indican que el consumo de proteína de soya reduce la concentración de lípidos circulantes en parte al regular la expresión de la SCD-1 en el hígado.

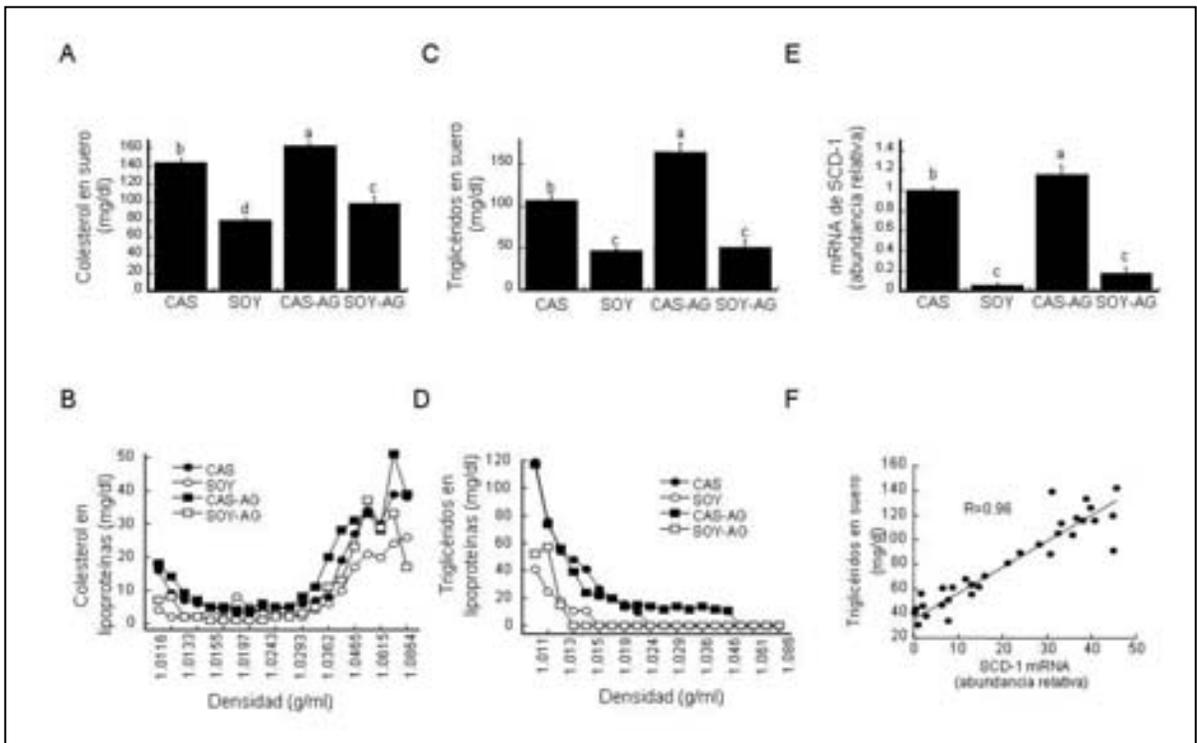


Figura 15: (A) Concentración de colesterol total en suero, (B) perfil de colesterol en lipoproteínas, (C) TG totales, (D) perfil de TG en lipoproteínas, (E) contenido de mRNA de SCD-1 en hígado y (F) correlación entre el mRNA de SCD-1 y los TG séricos en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Contenido de SREBP-2 y mRNA de LDLr en hígado: La captura de lipoproteínas por el hígado es mediada principalmente por el receptor de LDL (LDLr), el cual es controlado por SREBP-2. Para evaluar si la disminución en el colesterol circulante de los animales alimentados con proteína de soya está relacionada con la actividad de SREBP-2 en el hígado, se determinó el contenido de mRNA de SREBP-2, así como de proteína. Los resultados revelan que los animales alimentados con SOY-AG presentan significativamente más mRNA de SREBP-2 que los animales alimentados con CAS-AG (**Figura 16A**). El contenido de SREBP-2 maduro también es mayor en el grupo SOY-AG respecto al grupo CAS-AG (**Figura 16B**), lo cual se refleja en mayor expresión del LDLr en el hígado de las ratas SOY-AG (**Figura 16C**). Probablemente la captura hepática de LDL es mayor en las ratas alimentadas con proteína de soya que en las que fueron

alimentadas con caseína, reduciendo su concentración circulante y su captura por otros tejidos, como el tejido adiposo.

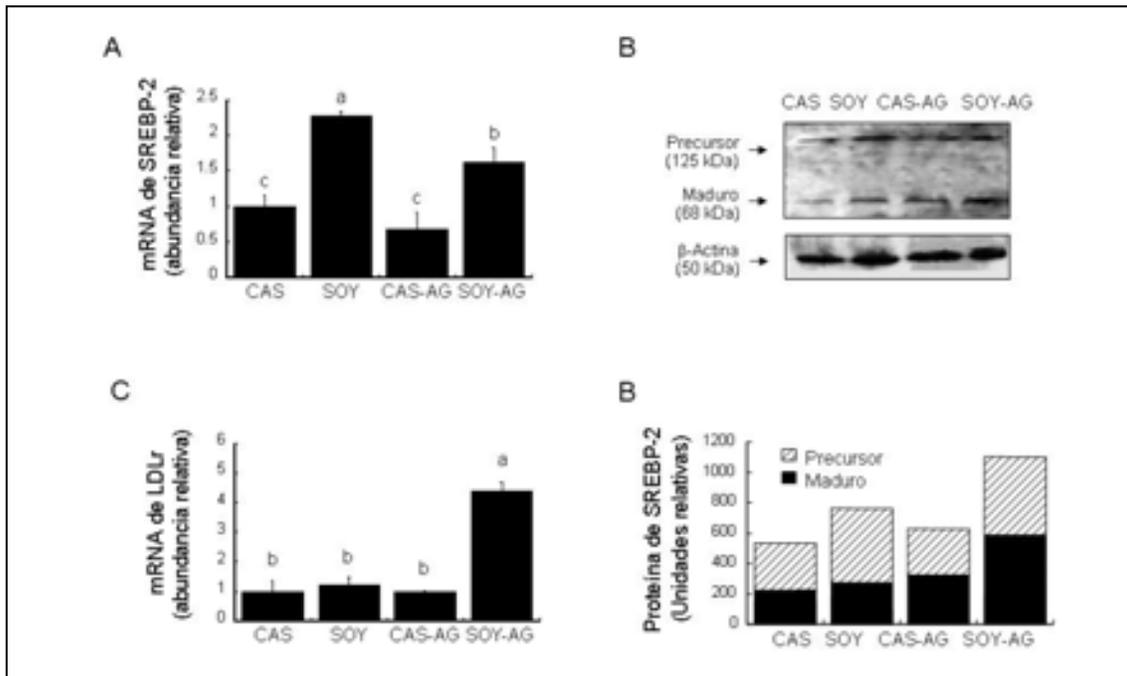


Figura 16: (A) Contenido de mRNA de SREBP-2 en hígado, (B) contenido de proteína precursora y madura de SREBP-2 en hígado y (C) contenido de mRNA del LDLr en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Morfología del tejido adiposo blanco y ácidos grasos libres en suero: En la obesidad, el consumo crónico de dieta alta en energía obliga al tejido adiposo a almacenar una cantidad excesiva de TG en los adipocitos, incrementando drásticamente su volumen (hipertrofia) en asociación con un incremento en la liberación de ácidos grasos libres (AGL) a la circulación. Para determinar la proporción de adipocitos hipertróficos en las ratas de los cuatro grupos, se evaluó el área de las células adiposas del tejido adiposo blanco (TAB). El consumo de la dieta alta en grasa incrementó significativamente el área de los adipocitos de las ratas del grupo CAS-AG respecto a los grupos control (**Figura 17A y B**).

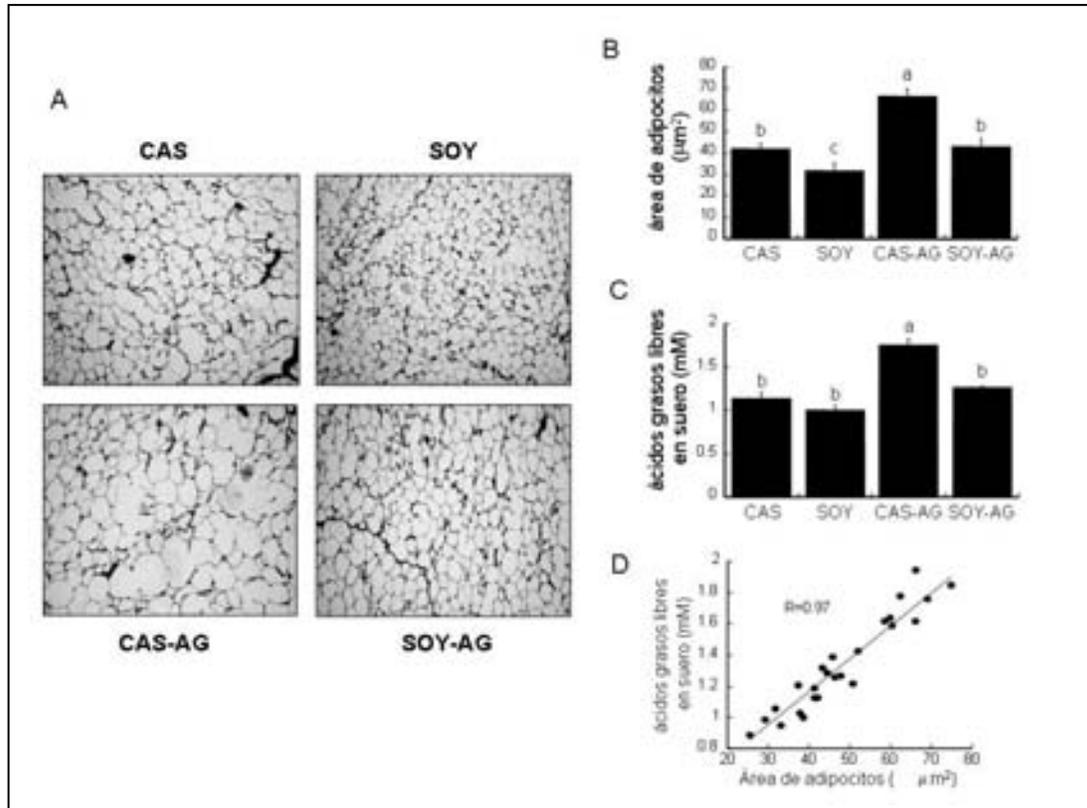


Figura 17: (A) Histología de tejido adiposo blanco teñido con hematoxilina y eosina, (B) área de adipocitos, (C) concentración de AGL en suero y (D) correlación entre el área de adipocitos y la concentración de AGL en suero de ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

Notablemente, los adipocitos de las ratas del grupo SOY-AG presentaron un área significativamente menor a la de las ratas del grupo CAS-AG. Este resultado indica que el consumo de proteína de soya puede evitar la hipertrofia de las células adiposas aún consumiendo dieta alta en grasa. Con base en los resultados anteriores, se procedió a determinar la concentración de AGL en suero, ya que se ha demostrado en roedores y humanos que los adipocitos hipertróficos presentan un aumento en la liberación de AGL a la circulación. Debido a que la captación de AGL por el hígado no es regulada, el aumento en la concentración circulante de AGL se refleja en el aumento en la captura y almacenaje de lípidos en el hígado. El contenido de AGL en suero de las ratas alimentadas con la dieta SOY-AG fue significativamente menor al de las ratas alimentadas con CAS-AG (**Figura 17C**). El análisis de correlación indica que existe una fuerte correlación entre el área de los

adipocitos y el contenido de AGL en suero (**Figura 17D**) y con el contenido de lípidos en hígado. Estos resultados indican que los adipocitos de las ratas alimentadas con soya aún mantienen la capacidad para almacenar eficientemente los ácidos grasos y esto se reflejaría en menor flujo hacia el hígado.

Contenido de mRNA de PPAR γ y perilipinas en tejido adiposo blanco: Para entender mejor el mecanismo por el cual la proteína de soya evita la hipertrofia de los adipocitos, se determinó el contenido de mRNA de PPAR γ . PPAR γ controla la mayoría de las funciones del tejido adiposo, sin embargo en la obesidad la expresión de PPAR γ en el tejido adiposo disminuye reduciendo la capacidad de proliferación y diferenciación del tejido adiposo. Los resultados muestran que contenido de mRNA de PPAR γ fue significativamente mayor en el tejido adiposo blanco de las ratas alimentadas con la dieta control con soya respecto a la alimentadas con caseína (**Figura 18A**). El consumo de la dieta alta en grasa redujo significativamente el contenido de mRNA de PPAR γ respecto a los grupos control, sin importar el tipo de proteína dietaria. Este resultado indica que la correcta funcionalidad de los adipocitos de las ratas SOY-AG no está mediada por un incremento en el contenido de mRNA de PPAR γ .

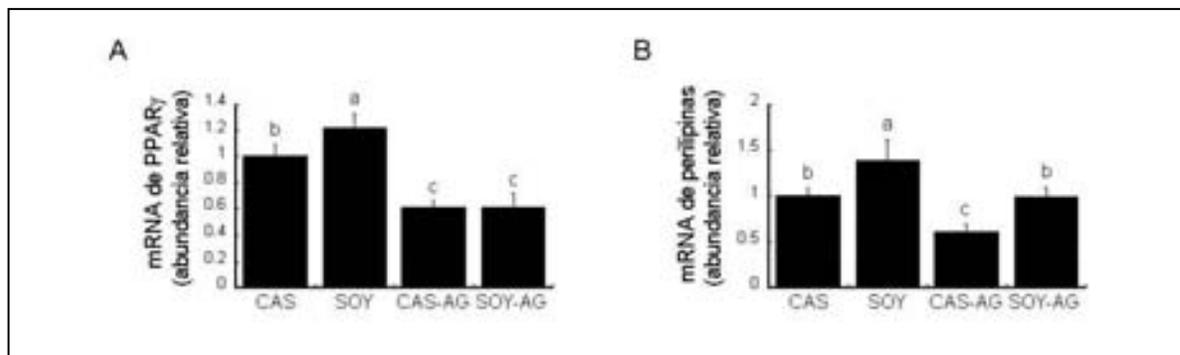


Figura 18: (A) Contenido de mRNA de PPAR γ y (B) contenido de mRNA de perilipinas en tejido adiposo blanco en ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, n=8. Las letras indican diferencia significativa entre grupos (P<0.05) a>b>c.

Algunos receptores nucleares son regulados principalmente a nivel post-transcripcional, donde la activación es mediada por unión a ligando y no por cambios en su transcripción. Por esta razón se procedió a determinar el contenido

de mRNA de perilipinas, un gen blanco de PPAR γ , para evaluar la actividad transcripcional de este receptor. El contenido de mRNA de perilipina fue significativamente mayor en las ratas alimentadas con la dieta SOY respecto al resto de los grupos (**Figura 18B**) y las ratas alimentadas con las dietas altas en grasa presentaron una reducción en el contenido de mRNA de perilipinas respecto a aquellas alimentadas con las dietas control. Sin embargo, las ratas alimentadas con la dieta SOY-AG mostraron significativamente más mRNA de perilipinas en el tejido adiposo blanco que aquellas alimentadas con la dieta CAS-AG. Este resultado indica que la proteína de soya dietaria puede incrementar la actividad transcripcional de PPAR γ en este tejido, ya que es capaz de inducir la expresión génica de las perilipinas. Las perilipinas son proteínas localizadas en la periferia de la vesícula lipídica de los adipocitos y actúan como un impedimento para la hidrólisis de triglicéridos mediada por la lipasa sensible a hormonas. El mayor contenido de mRNA de perilipinas en el tejido adiposo de las ratas alimentadas con proteína de soya respecto a las alimentadas con caseína, puede indicar menor hidrólisis de TG y menor liberación de AGL a la circulación.

Leptina en suero y deposición de colágeno en hígado: En la obesidad los adipocitos hipertróficos producen una elevada cantidad de leptina, generando hiperleptinemia y resistencia a la leptina. Se ha demostrado que la hiperleptinemia puede activar las células estelares del hígado, estimulando la respuesta inflamatoria y deposición de colágeno, participando en la progresión de hígado graso a cirrosis y fibrosis hepática. En el presente estudio la concentración de leptina en suero en las ratas CAS-AG fue significativamente mayor a la de los grupos control (**Figura 19A**). De manera interesante la concentración de leptina en las ratas SOY-AG fue significativamente menor que la del grupo CAS-AG, en estrecha relación con el área de los adipocitos (**Figura 19B**). Para evaluar la deposición de colágeno en el hígado, se realizaron cortes histológicos y tiñeron con la técnica de MASSON. En el hígado de las ratas del grupo CAS-AG se observaron lesiones en el parénquima e infiltrado inflamatorio perivenular y perisinusoidal, evidente por la abundancia de pequeñas células en la periferia del

espacio porta, con depósitos de colágeno perisinusoidal (**Figura 19C**). En cambio, la morfología del hígado de las ratas del grupo SOY-AG presenta menor proporción de infiltrado inflamatorio respecto al grupo CAS-AG, y ausencia de depósitos de colágeno. Estos resultados pueden indicar asociación entre la concentración de leptina circulante y el grado de daño hepático, siendo mayor en el grupo CAS-AG que en el grupo SOY-AG.

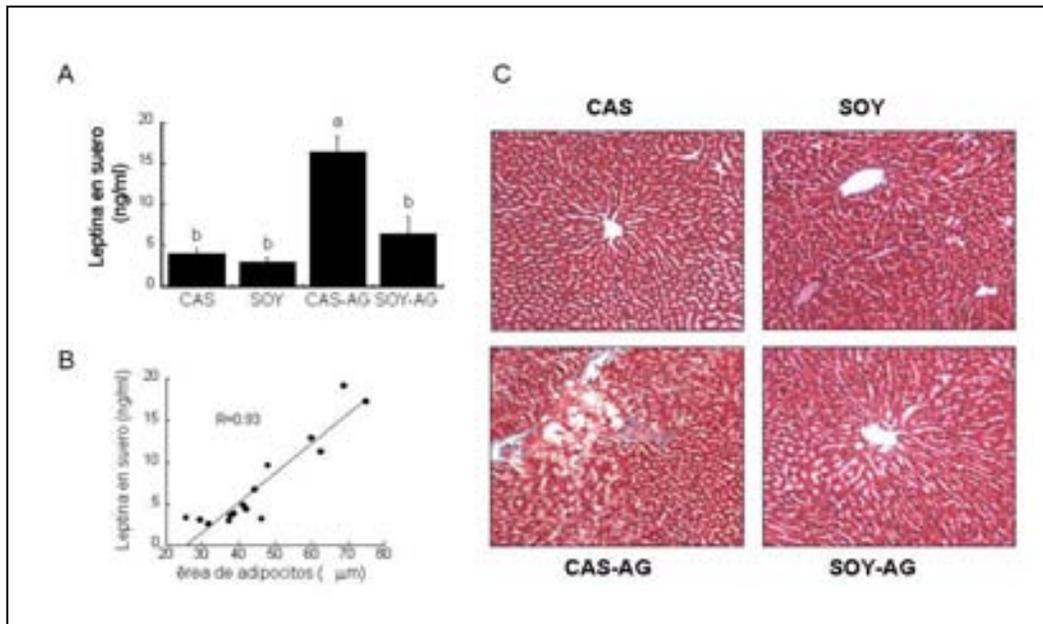


Figura 19: (A) Concentración de leptina en suero, (B) correlación entre el área de adipocitos y la concentración de leptina en suero y (C) deposición de colágeno en hígado de ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n=8$. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P<0.05$) $a>b>c$.

mRNA de TNF α y SOCS-3 en tejido adiposo blanco: La obesidad se considera actualmente una condición inflamatoria sistémica, donde la producción de citocinas por los adipocitos hipertróficos juega un papel importante. Para evaluar la producción de citocinas en el tejido adiposo de las ratas de los cuatro grupos se analizó el contenido de mRNA de TNF α . En el grupo de ratas alimentadas con la dieta SOY-AG el contenido de mRNA de TNF α fue significativamente menor al de las ratas alimentadas con la dieta CAS-AG (**Figura 20A**). La elevada producción de TNF α y leptina por el tejido adiposo inducen resistencia sistémica a la insulina y a la leptina. Para evaluar el grado de resistencia a la leptina en el tejido adiposo se determinó el contenido de mRNA de SOCS-3, un indicador molecular de

resistencia a la leptina. El contenido de mRNA de SOCS-3 fue significativamente mayor en el tejido adiposo de las ratas CAS-AG respecto al de las ratas SOY-AG y los grupos control (**Figura 20B**). Estos resultados indican que el consumo a largo plazo de proteína de soya es capaz de evitar las alteraciones endócrinas del tejido adiposo que acompañan el consumo de dieta alta en grasa, evitando la sobreproducción de citocinas el desarrollo de resistencia a la leptina en el tejido adiposo y probablemente en otros tejidos.

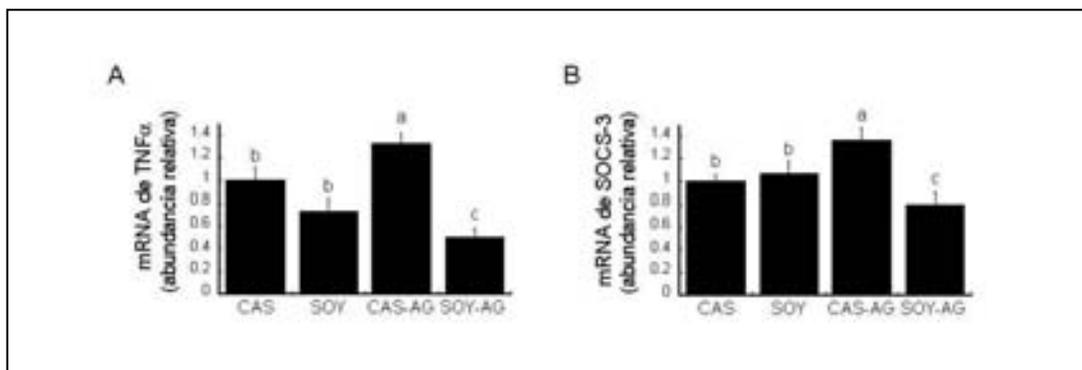


Figura 20: (A) Contenido de mRNA de TNF α y (B) contenido de mRNA de SOCS-3 en tejido adiposo blanco de ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, n=8. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$) a>b>c.

Morfología del tejido adiposo pardo y contenido de mRNA de PPAR γ y UCP-1:

El tejido adiposo pardo es un órgano fundamental en el mantenimiento del balance energético en mamíferos pequeños y probablemente en el humano también. Sin embargo la resistencia a la leptina que se observa en la obesidad, reduce la capacidad oxidativa de este tejido, alterando el balance energético. Para evaluar la capacidad oxidativa del tejido adiposo pardo en las ratas del presente estudio se realizó un análisis histológico y la determinación del mRNA de algunos genes importantes en el metabolismo de este tejido. Las histologías del tejido adiposo pardo de las ratas de los grupos control presentaron morfología normal, donde las células presentan numerosas vacuolas lipídicas pequeñas, características de las células adiposas pardas (**Figura 21A**). En contraste, el tejido pardo de las ratas alimentadas con la dieta CAS-AG mostraron células con grandes vesículas lipídicas asemejando adipocitos blancos. De manera

interesante, las ratas del grupo SOY-AG presentaron morfología similar a la de las ratas del grupo control pese a que consumieron la dieta alta en grasa. Al cuantificar el área de las vesículas lipídicas, la diferencia entre las ratas del grupo SOY-AG y las del grupo CAS-AG resultó significativa (**Figura 21B**).

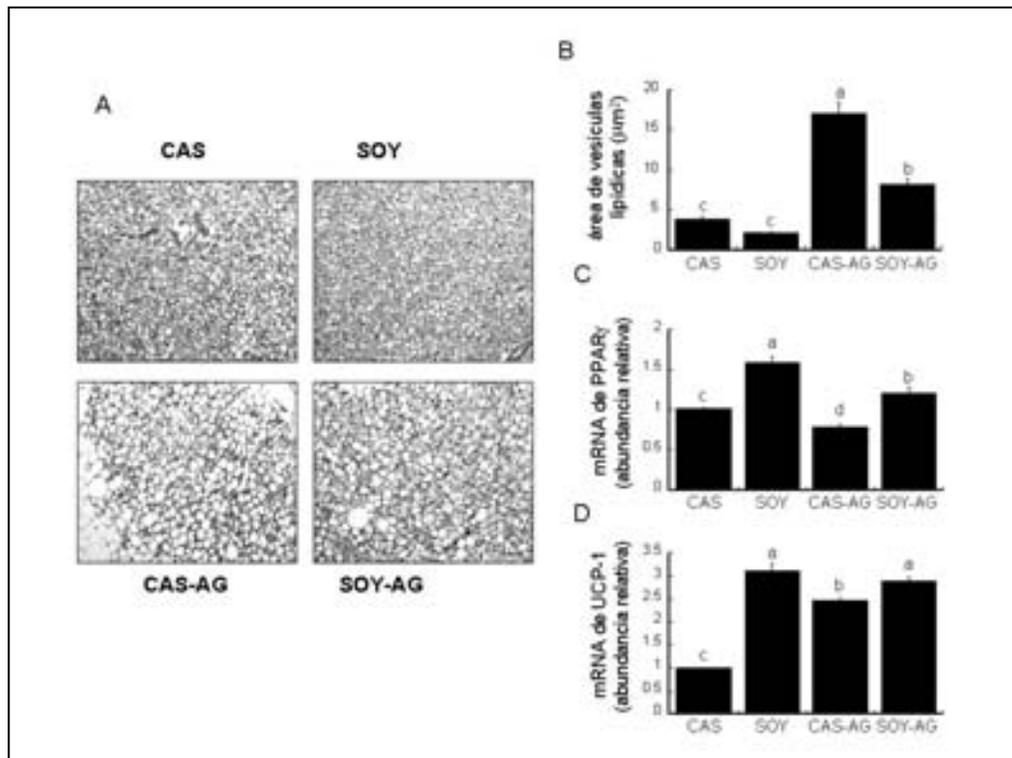


Figura 21: (A) Histología de tejido adiposo pardo teñido con hematoxilina y eosina, (B) área de las vesículas lipídicas, (C) contenido de mRNA de PPAR γ y (D) contenido de mRNA de UCP-1 en TAP de ratas alimentadas con CAS, SOY, CAS-AG y SOY-AG por 180 días. Los valores representan el promedio \pm error estándar, n=8. Las letras indican diferencia significativa entre grupos ($P < 0.05$) a>b>c.

La acumulación masiva de lípidos en los adipocitos pardos de las ratas CAS-AG puede indicar una reducción en su capacidad de oxidar y eliminar lípidos. Esta reducción fue causada probablemente por una disminución en la actividad de PPAR γ en el tejido adiposo pardo, ya que al igual que en tejido adiposo blanco, PPAR γ controla la actividad metabólica de los adipocitos pardos. El contenido de mRNA de PPAR γ en el tejido pardo de las ratas de los grupos alimentados con proteína de soja fue significativamente mayor que el de los grupos alimentados con caseína, aún en las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa (**Figura 21C**).

Para evaluar si el mayor contenido de mRNA de PPAR γ se asocia con un aumento en su actividad transcripcional, se determinó el contenido de mRNA de la UCP-1, cuya expresión en el tejido adiposo pardo esta controlada principalmente por PPAR γ . Como se esperaba, el contenido de mRNA de UCP-1 fue significativamente mayor en el tejido pardo de las ratas de los grupos SOY y SOY-AG respecto al de los grupos CAS y CAS-AG (**Figura 21D**). La UCP-1 es una proteína mitocondrial encargada de disipar la energía de la oxidación de sustratos energéticos como calor, impidiendo la síntesis de ATP. Estos resultado indican que el consumo de proteína de soya puede incrementar la capacita termogénica del tejido adiposo pardo aún en dieta alta en grasa, al estimular la actividad transcripcional de PPAR γ . Este probable aumento en la oxidación de lípidos y termogénesis en el tejido adiposo pardo de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con proteína de soya puede explicar la reducción en el contenido de grasa corporal, indicando un eficiente control del balance energético.

Discusión

En los últimos años se ha observado un incremento drástico en el consumo de alimentos con elevado contenido energético a nivel mundial [5]. Este comportamiento alimenticio ha permitido comprobar que el consumo a largo plazo de dietas hiperenergéticas disminuye la capacidad del organismo para mantener el balance energético en equilibrio. El excedente de energía es almacenado en forma de triglicéridos (TG) en el tejido adiposo, generando adipocitos hipertróficos y obesidad [64]. Este aumento en el volumen de tejido adiposo incrementa la producción de leptina y la liberación de ácidos grasos libres (AGL) a la circulación. En el hígado los AGL son captados y almacenados como TG y la leptina se vuelve incapaz de controlar su acumulación, dando lugar al desarrollo de esteatosis hepática.

Es por esta razón que la esteatosis hepática se presenta en estrecha asociación con la obesidad y el síndrome metabólico. De hecho, se estima que el 70% de los

pacientes obesos cursan con esteatosis hepática, lo cual representa el 15% de la población mundial [117]. La esteatosis hepática es por si misma una enfermedad relativamente benigna, sin embargo el tejido adiposo hipertrófico sintetiza y libera citocinas pro-inflamatorias como el $TNF\alpha$ que exacerbaban el daño hepático y favorecen la progresión a cirrosis y fibrosis a través de un proceso de lipotoxicidad [67]. Pese a la gravedad de este padecimiento, hasta la fecha no existen tratamientos farmacológicos definitivos para la esteatosis hepática.

Lo anterior nos permite afirmar que la dieta es un factor determinante en la regulación del metabolismo y juega un papel importante en el desarrollo de numerosas enfermedades [83]. Sin embargo, la dieta también puede jugar un papel en la prevención y tratamiento de enfermedades [93, 118]. Los mecanismos moleculares por los cuales los factores dietarios ejercen estos efectos han comenzado a elucidarse a través del desarrollo de la Nutriología molecular [12]. De manera particular se ha observado que gran parte de los efectos de la dieta involucran cambios en la secreción de hormonas y la expresión de genes.

En la presente investigación se evaluó el efecto de la proteína de soya dietaria sobre el desarrollo de esteatosis hepática en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y su relación con la adiposidad respecto a ratas alimentadas con dieta alta en grasa con caseína. Numerosos estudios en roedores y humanos han demostrado que el consumo a largo plazo de dieta alta en grasa induce una serie de anormalidades metabólicas como dislipidemia y resistencia a la insulina [79, 81], alteraciones comúnmente asociadas con la esteatosis hepática y la hipertrofia de los adipocitos. Por esta razón los animales fueron alimentados con las dietas experimentales por un período de 180 días. Al final del estudio las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con caseína (CAS-AG) presentaron aumento significativo en el peso corporal respecto a los grupos control con caseína o soya, acompañado de un aumento en la concentración de colesterol y TG circulantes, en la acumulación de lípidos hepáticos y en el área de los adipocitos. Estos resultados indican que la dieta alta en grasa provocó serias

anormalidades metabólicas en las ratas, asemejando a las alteraciones que se observan en pacientes obesos con síndrome metabólico. De manera interesante las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con soya (SOY-AG) presentaron aumento en peso menor al de las ratas CAS-AG y no mostraron alteraciones en los lípidos plasmáticos, en los lípidos hepáticos ni en el área de adipocitos.

En general, las proteínas de origen vegetal no cubren totalmente el requerimiento dietético de aminoácidos, porque son deficientes en algunos aminoácidos indispensables. Sin embargo, la proteína de soya cubre los requisitos de aminoácidos para el crecimiento y mantenimiento de ratas y humanos [91]. Esto se puede observar en la gráfica de aumento en peso, donde la pendiente fue igual en los cuatro grupos hasta el día 30. La diferencia en peso se observó después de los 60 días y dependió del tipo de proteína y del contenido de grasa en la dieta. El consumo de alimento tampoco fue diferente en los cuatro grupos durante el estudio indicando que esta tampoco fue la causa de la diferencia en peso. El análisis bromatológico reveló diferencia en el contenido de grasa corporal mientras que el contenido de proteína no presentó diferencia en los cuatro grupos, indicando que el consumo de proteína de soya evitó la acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con dieta alta en grasa, sin modificar la masa muscular.

Se evaluó la concentración de glucosa circulante y el contenido de glucógeno en hígado, indicadores de resistencia a la insulina en la obesidad. En ambos casos, las ratas alimentadas con la dieta SOY-AG presentaron mayor sensibilidad a la insulina que las ratas CAS-AG. En el transcurso de la obesidad, la resistencia a la insulina se acompaña por aumento en la secreción pancreática de insulina para compensar la deficiencia en su acción. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la proteína de soya dietaria es capaz de regular la secreción pancreática de insulina, evitando la hiperinsulinemia [100]. Este resultado nos llevó a pensar que el efectivo control de la glucemia observado en las ratas alimentadas con dieta alta

en grasa con proteína de soya lo obtuvieron al regular la producción de insulina **(Figura 22)**.

Sin embargo, a diferencia de lo esperado, ambos grupos alimentados con la dieta alta en grasa mostraron un aumento en la concentración de insulina circulante sin importar el tipo de proteína en la dieta. Se ha demostrado que la secreción pancreática de insulina no sólo es estimulada por glucosa, sino que los ácidos grasos también inducen su liberación [83, 119]. Probablemente, el estímulo insulinémico inducido por el contenido excesivo de lípidos en la dieta fue mayor que la capacidad de la proteína de soya para evitarlo. De manera interesante, la concentración de glucagon en suero respondió al tipo de proteína en la dieta y esta diferencia modificó la relación insulina/glucagon en los cuatro grupos, resultando significativamente menor en el grupo SOY-AG respecto al grupo CAS-AG. Es probable que el mecanismo incluya un efecto genómico directo en las células α así como un efecto indirecto mediado por cambios en la producción de otras hormonas, como la colecistocinina y el péptido similar a glucagon -1 del intestino [105, 106].

La esteatosis hepática ocurre cuando la velocidad de captura y síntesis de lípidos es mayor a la capacidad del hígado para eliminarlos [117]. En la obesidad, la hiperinsulinemia secundaria a la resistencia a la insulina incrementa la síntesis endógena de lípidos mediada por SREBP-1 [120]. Como esperábamos, el contenido de SREBP-1 en hígado presentó correlación significativa con la relación insulina/glucagon en los cuatro grupos y a su vez, el contenido de SREBP-1 se relacionó con el grado de esteatosis hepática. Estos resultados indican que el cambio hormonal producido por la proteína de soya dietaria fue capaz de reducir la acumulación de lípidos en el hígado mediada en parte por la reducción del contenido de SREBP-1, pese a que consumieron dieta alta en grasa **(Figura 22)**. Es importante notar que, aunque la activación de la transcripción de los genes lipogénicos involucra numerosos factores de transcripción y coactivadores

específicos, se ha demostrado que SREBP-1 es necesario para que la transcripción se lleve a cabo [26].

Se sabe que el consumo de proteína de soya reduce la concentración de triglicéridos circulantes. Esto se ha demostrado numerosas veces en estudios en humanos y roedores [93, 121]. Sin embargo hasta hace poco los mecanismos involucrados han permanecido relativamente ocultos. Estudios en roedores y humanos han demostrado que la actividad de la enzima SCD-1 es determinante en el destino metabólico de los lípidos sintetizados por el hígado. El grupo de Attie y Ntambi ha demostrado que la actividad de la SCD-1 determina el destino metabólico de los lípidos hepáticos, favoreciendo su utilización para su esterificación en TG y producción de VLDL, incrementando la concentración de lípidos plasmáticos [32, 122]. En el presente estudio, la concentración de TG totales y VLDL-TG se asoció con el contenido de mRNA de la enzima SCD-1 en el hígado. Estos resultados indican que el consumo de proteína de soya reduce la concentración de lípidos circulantes, en parte probablemente al regular la expresión de la SCD-1 en el hígado. La transcripción de la SCD-1 es regulada principalmente por SREBP-1 [31], sin embargo la expresión de SCD-1 en el hígado de las ratas del presente estudio no mostró relación con el contenido de SREBP-1 en hígado. Más bien, el contenido de mRNA de SCD-1 en hígado se vio modulado por el tipo de proteína en la dieta y no por el contenido de grasa o la interacción proteína-grasa. En adición a SREBP-1, la expresión génica de SCD-1 puede ser mediada también por la leptina así como por el factor de transcripción PPAR γ [123]. Es probable que algún componente asociado a la proteína de soya dietaria, como las isoflavonas, haya modificado la actividad de alguno de estos factores y de este modo reducir la expresión de la SCD-1 (**Figura 22**).

Otro conocido efecto del consumo de proteína de soya es la reducción en el contenido de colesterol circulante y de manera particular, en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [107, 124]. Este efecto cobra mayor importancia al tomar en cuenta que la dislipidemia es un factor asociado al síndrome metabólico que

favorece el desarrollo de aterosclerosis. Esto ocurre debido a que el colesterol que contienen las LDL es susceptible a oxidación, lo cual incrementa su captura por los macrófagos del endotelio vascular. Estos macrófagos se convierten en células espumosas que se acumulan reduciendo el diámetro interno de las arterias y el flujo sanguíneo, incrementando la presión arterial [125]. Las LDL son captadas por el hígado a través del receptor de LDL (LDLr) para la excreción del colesterol en la bilis. En el presente estudio observamos asociación entre el mayor contenido de mRNA del LDLr en el hígado de las ratas alimentadas con SOY-AG con menor concentración de colesterol total y LDL-colesterol en suero. La expresión génica del LDLr es controlada por SREBP-2 y de manera interesante pudimos observar mayor contenido de mRNA y proteína de SREBP-2 en el hígado de las ratas SOY-AG respecto al resto de los grupos. De manera interesante el efecto de la proteína de soya sobre SREBP-2 y el LDLr solo se observó en los animales alimentados con la dieta SOY-AG. Este resultado puede indicar que el consumo de proteína de soya en asociación a dieta alta en grasa es capaz de inducir la expresión de SREBP-2 aumentando la captación hepática de lípidos, manteniendo bajo el nivel de LDL-colesterol circulante (**Figura 22**).

La reducción en el contenido de lípidos en las lipoproteínas circulantes de las ratas alimentadas con soya, pudo haber reducido la captura y almacenaje de lípidos en el tejido adiposo. El tejido adiposo almacena energía en forma de TG para liberar AGL durante los períodos de ayuno, sin embargo el consumo crónico de dieta alta en energía obliga al tejido adiposo a almacenar una cantidad excesiva de TG en las vacuolas lipídicas de los adipocitos, incrementando drásticamente su volumen (hipertrofia) [59]. En el presente estudio, el consumo de la dieta alta en grasa únicamente incrementó el área de los adipocitos de las ratas alimentadas con la dieta CAS-AG, mientras que las ratas alimentadas con SOY-AG mantuvieron un área similar a las ratas control, indicando probablemente menor captura de lípidos circulantes o mejor distribución de los lípidos. Este resultado indica que probablemente el consumo de proteína de soya aumentó la capacidad proliferativa del tejido adiposo de las ratas SOY-AG, pese al consumo de dieta alta en grasa.

La hipertrofia de los adipocitos en la obesidad es causada por la reducción en la capacidad de proliferación y diferenciación, obligando a las células existentes a almacenar el exceso de energía. Este fenómeno es el resultado de la disminución en la actividad del factor de transcripción PPAR γ [60]. Como se esperaba, el consumo de la dieta alta en grasa redujo significativamente el contenido de mRNA de PPAR γ respecto a los grupos control, sin embargo el consumo de proteína de soya no modificó el contenido de mRNA de PPAR γ . Es importante mencionar que algunos receptores nucleares son regulados principalmente a nivel post-transcripcional, donde la activación es mediada por unión a ligando, fosforilaciones e interacciones con co-activadores en el núcleo y no por cambios en su transcripción [53].

Para analizar la actividad transcripcional de PPAR γ en el tejido adiposo se determinó el contenido de mRNA de uno de sus genes blanco. El gen que codifica las perilipinas es controlado principalmente por PPAR γ , se expresa durante la diferenciación de adipocitos y es un indicador de adipocitos maduros [126, 127]. El aumento en el contenido de mRNA de perilipina en el tejido adiposo de las ratas SOY-AG sugiere mayor actividad transcripcional de PPAR γ respecto a las ratas CAS-AG, aunque no se haya observado diferencia en su contenido de mRNA (**Figura 22**). El probable mecanismo por el cual la proteína de soya dietaria pudo incrementar la actividad de PPAR γ es a través de la unión de las isoflavonas asociadas a la proteína de soya con el dominio de unión a ligando de PPAR γ . De hecho, varios estudios *in vitro* han demostrado que las isoflavonas genisteina y dadzeina de la soya son capaces de interaccionar con PPAR γ e inducir su actividad transcripcional en adipocitos [110, 111].

La relación entre la obesidad y el desarrollo de enfermedades como hígado graso, aterosclerosis, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 se ha asociado con la presencia de adipocitos hipertróficos [1]. En el hígado, la acumulación de lípidos es resultado de la síntesis endógena y el aumento en la captación de AGL provenientes del tejido adiposo [128]. Esto es debido a que en la obesidad los

adipocitos hipertróficos incrementan la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, mediada por la reducción en la actividad de PPAR γ y el contenido de perilipinas alrededor de la vesícula lipídica [50]. En el presente estudio, el mayor contenido de mRNA de perilipinas en el tejido adiposo de las ratas alimentadas con proteína de soya se asoció a la menor concentración de AGL circulantes y estos a su vez se asociaron con la menor área de adipocitos y con el menor contenido de lípidos en hígado. Estos resultados indican que los adipocitos de las ratas alimentadas con soya mantuvieron la capacidad para almacenar eficientemente los AG, reduciendo su flujo hacia el hígado **(Figura 22)**.

El tejido adiposo hipertrófico secreta una gran cantidad de leptina y otras citocinas como el TNF α , generando un estado inflamatorio sistémico [62, 129]. Una consecuencia de esto es el desarrollo de resistencia a la insulina y lipotoxicidad en hígado. En los grupos control la concentración de leptina en suero no rebasó los 6.5 ng/ml, mientras que en las ratas CAS-AG aumentó a 15 \pm 2 ng/ml, valor reportado en la literatura como indicador de resistencia a la leptina [130]. El grupo de ratas alimentadas con la dieta SOY-AG presentaron una concentración circulante de leptina similar a los grupos control, en asociación a un menor contenido de tejido adiposo. El contenido de mRNA de TNF α y SOCS-3 también fue significativamente menor en el tejido adiposo de las ratas SOY-AG respecto a las CAS-AG. SOCS-3 es una fosfatasa involucrada en la terminación de la señalización de citocinas, como la leptina, y su contenido aumenta al incrementar la concentración de leptina circulante, por lo que constituye un buen indicador molecular de resistencia a la leptina [131, 132]. Estos resultados indican que el consumo a largo plazo de proteína de soya es capaz de evitar las alteraciones endócrinas del tejido adiposo que acompañan el consumo de dieta alta en grasa, evitando la sobreproducción de citocinas, el desarrollo de resistencia a la leptina y lipotoxicidad en el tejido adiposo y probablemente en otros tejidos como el hígado **(Figura 22)**.

La lipotoxicidad es el daño celular mediado por lípidos, donde el aumento en el contenido de ácidos grasos intracelulares genera ceramidas y otros intermediarios que inducen muerte celular [69, 133]. En el hígado, una concentración elevada de $TNF\alpha$ y leptina en suero pueden activar las células estelares e inducir la respuesta inflamatoria [76]. Este proceso induce lipotoxicidad en las células del parénquima favoreciendo la progresión del daño hepático de esteatosis a cirrosis e incluso fibrosis. En las histologías de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con proteína de soya no se observó infiltrado inflamatorio ni depósitos de colágeno perisinusoidal, a diferencia de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con caseína. Este resultado puede indicar que el consumo de proteína de soya puede ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de la esteatosis hepática en la obesidad.

Finalmente, se analizó el tejido adiposo pardo (TAP) para estimar el gasto de energía por termogénesis en los animales. El TAP es un órgano fundamental en el mantenimiento del balance energético en mamíferos pequeños y probablemente en el humano también [46, 134]. Las histologías revelaron una acumulación masiva de lípidos en los adipocitos pardos de las ratas CAS-AG en asociación a la disminución en el contenido de mRNA de $PPAR\gamma$ y UCP-1 en el TAP, mientras que el TAP de las ratas alimentadas con SOY-AG no presentaron cambios significativos respecto a los grupos control. La actividad del TAP es mantenida por $PPAR\gamma$ [135] al igual que en los adipocitos blancos y por acción de la leptina, que actúa en los adipocitos pardos de manera directa y a través del sistema nervioso central [56]. Estos resultados indican que el TAP de los animales alimentados con proteína de soya mantiene la sensibilidad a la leptina y como consecuencia una eficiente capacidad oxidativa. Este probable aumento en la oxidación de lípidos y termogénesis en el TAP de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con proteína de soya puede explicar la reducción en el contenido de grasa corporal respecto a aquellas alimentadas con caseína, indicando un eficiente control del balance energético **(Figura 22)**.

La dieta ejerce un claro efecto en el metabolismo, debido a la interacción de sus componentes y los sistemas homeostáticos del organismo. Los mecanismos moleculares por los cuales los factores dietarios ejercen estos efectos han comenzado a elucidarse. En la presente investigación se muestra que el consumo de un nutrimento como lo es la proteína de soya puede modular la lipogénesis hepática, el metabolismo del tejido adiposo blanco y pardo, previniendo el desarrollo de esteatosis y lipotoxicidad hepática en ratas alimentadas con dieta alta en grasa. Los resultados de la presente investigación permiten sugerir un mecanismo de acción de la proteína de soya dietaria a través de la modificación del perfil hormonal (insulina, glucagon y leptina) y de manera directa sobre el receptor nuclear PPAR γ en el tejido adiposo. Aunque algunas de las interacciones y asociaciones planteadas en la presente investigación son especulativas, trazan un mecanismo lógico y plausible para integrar un marco de referencia en el desarrollo de terapias a nivel nutricional para el tratamiento de la obesidad y sus consecuencias metabólicas en hígado y tejido adiposo.

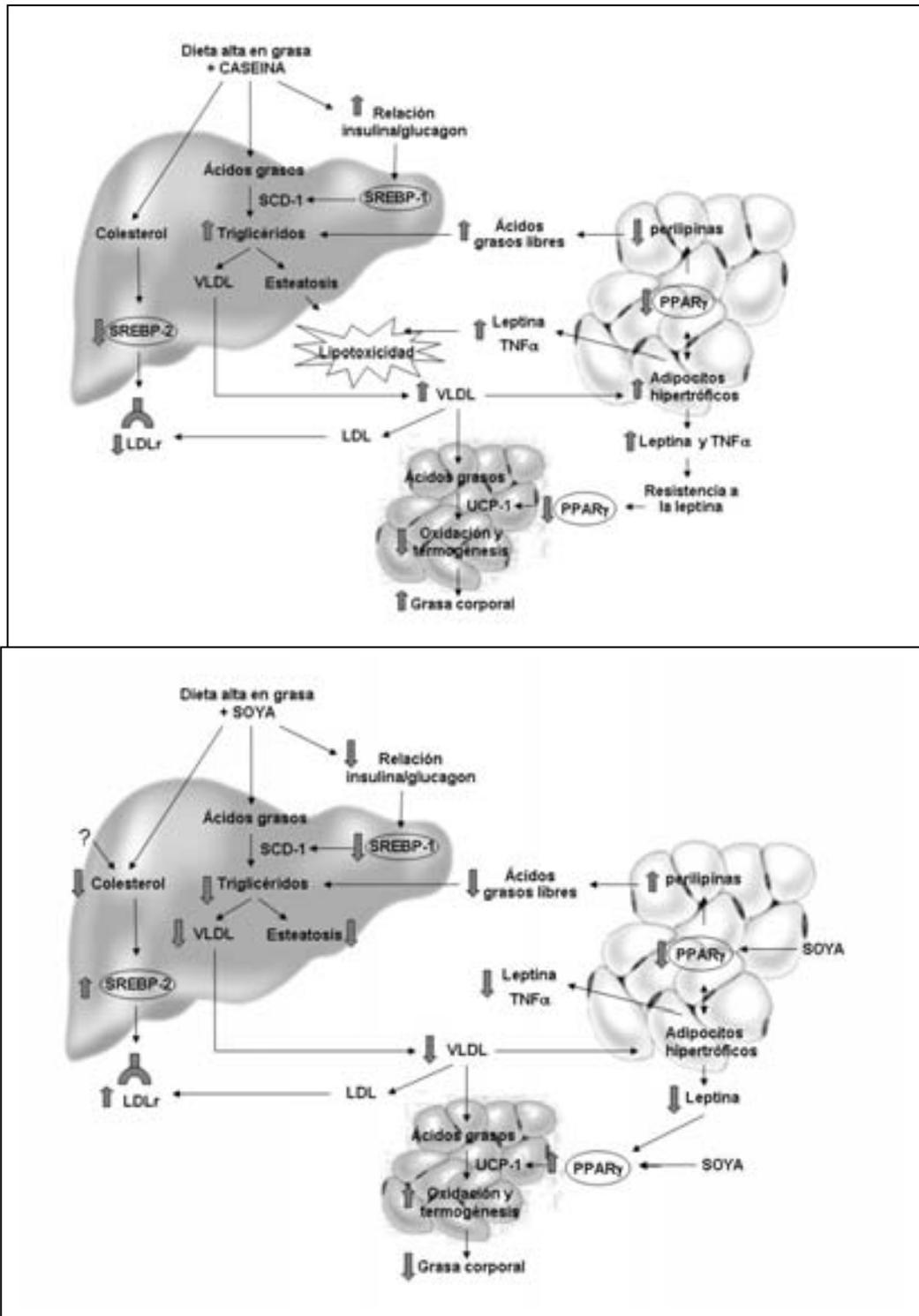


Figura 22: Mecanismo propuesto para la acción de la proteína de soya dietaria sobre los factores de transcripción SREBP-1 y SREBP-2 en hígado y PPAR γ en tejido adiposo blanco y pardo en la obesidad.

Conclusiones

El consumo de proteína de soya en ratas alimentadas con dieta alta en grasa ejerció los siguientes efectos respecto a aquellas alimentadas con caseína:

- a. Redujo el contenido de grasa corporal probablemente por un aumento en la capacidad termogéncia del tejido adiposo pardo.
- b. Evitó el desarrollo de esteatosis hepática al reducir el contenido de SREBP-1 en hígado mediado por una disminución en la proporción insulina/glucagon circulante.
- c. Evitó la dislipidemia en parte debido a la reducción en el contenido de mRNA de SCD-1 y al aumento en el contenido de SREBP-2 y mRNA del LDLr en hígado.
- d. Evitó el desarrollo de adipocitos disfuncionales al reducir la respuesta inflamatoria local mediada por TNF α y SOCS-3 en tejido adiposo blanco.
- e. Evitó el desarrollo de lipotoxicidad hepática al disminuir la concentración de leptina y el flujo de ácidos grasos libres provenientes del tejido adiposo.

Bibliografía

1. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-43.
2. York, D. and C. Bouchard, *How obesity develops: insights from the new biology*. Endocrine, 2000. **13**(2): p. 143-54.
3. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
4. OMS. [cited; Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>].
5. Wyatt, S.B., K.P. Winters, and P.M. Dubbert, *Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem*. Am J Med Sci., 2006. **2006 331**(4): p. 166-74.
6. Olaiz-Fernandez, G., et al., *Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2006*. 2006, Instituto Nacional de Salud Publica, Cuernavaca, Mexico.
7. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Obesity-related derangements in metabolic regulation*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 367-401.
8. Postic, C., R. Dentin, and J. Girard, *Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis*. Diabetes Metab, 2004. **30**(5): p. 398-408.
9. Seitz, H.J., et al., *Coordinate control of intermediary metabolism in rat liver by the insulin/glucagon ratio during starvation and after glucose refeeding*.

- Regulatory significance of long-chain acyl-CoA and cyclic AMP.* Arch Biochem Biophys, 1977. **183**(2): p. 647-63.
10. Sanchez, A. and R.W. Hubbard, *Plasma amino acids and the insulin/glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis.* Med Hypotheses, 1991. **36**(1): p. 27-32.
 11. Kodama, H., et al., *The possible role of age-related increase in the plasma glucagon/insulin ratio in the enhanced hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia in genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice.* Jpn J Pharmacol, 1994. **66**(3): p. 281-7.
 12. Tovar, A.R. and N. Torres, *[[Molecular nutrition: a new era in nutrition].* Rev Invest Clin, 2003. **55**(2): p. 177-80.
 13. Schlitt, T. and A. Brazma, *Modelling in molecular biology: describing transcription regulatory networks at different scales.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1467): p. 483-94.
 14. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.* J Clin Invest, 2004. **114**: p. 147-152.
 15. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.* Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
 16. Postic, C., et al., *ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism.* Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 179-92.
 17. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver.* J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
 18. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.* Cell, 1997. **89**(3): p. 331-340.
 19. Amemiya-Kudo, M., et al., *Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes.* J Lipid Res, 2002. **43**(8): p. 1220-35.
 20. Zhang, Y., L. Yin, and F.B. Hillgartner, *SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACCalpha transcription in hepatocytes.* J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 356-68.
 21. Azzout-Marniche, D., et al., *Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes.* Biochem J, 2000. **350**: p. 389-93.
 22. Shimano, H., et al., *Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a.* J Clin Invest, 1996. **98**(7): p. 1575-84.
 23. Ide, T., et al., *SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(4): p. 351-7.
 24. Shimomura, I., et al., *Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 77-86.
 25. Shimomura, I., Y. Bashmakov, and J.D. Horton, *Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus.* J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30028-32.

26. Matsuda, M., et al., *SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation*. *Genes Dev*, 2001. **15**(10): p. 1206-16.
27. Horton, J.D., et al., *Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(11): p. 2331-9.
28. Korn, B.S., et al., *Blunted feedback suppression of SREBP processing by dietary cholesterol in transgenic mice expressing sterol-resistant SCAP(D443N)*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(12): p. 2050-60.
29. Stoeckman, A.K. and H.C. Towle, *The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 27029-35.
30. Kolehmainen, M., et al., *Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity*. *Obes Res*, 2001. **9**(11): p. 706-12.
31. Ntambi, J.M., M. Miyazaki, and A. Dobrzyn, *Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression*. *Lipids*, 2004. **39**(11): p. 1061-5.
32. Dobrzyn, A. and J.M. Ntambi, *The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. **73**(1): p. 35-41.
33. Hulver, M.W., et al., *Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans*. *Cell Metab*, 2005. **2**(4): p. 251-61.
34. Man, W.C., et al., *Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(9): p. 1928-39.
35. Attie, A.D., et al., *Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia*. *Journal of Lipid Research*, 2002. **43**(11): p. 1899-907.
36. Liew, C.F., et al., *Analysis of the contribution to type 2 diabetes susceptibility of sequence variation in the gene encoding stearoyl-CoA desaturase, a key regulator of lipid and carbohydrate metabolism*. *Diabetologia*, 2004. **47**(12): p. 2168-75.
37. Ntambi, J.M., et al., *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11482-6.
38. Miyazaki, M., et al., *Reduced adiposity and liver steatosis by stearoyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor- α* . *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 35017-35024.
39. Tamura, S. and I. Shimomura, *Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1139-42.
40. Klaus, S., *Functional differentiation of white and brown adipocytes*. *Bioessays*, 1997. **19**(3): p. 215-23.
41. Bartness, T.J. and C.K. Song, *Brain-adipose tissue neural crosstalk*. *Physiol Behav*, 2007. **91**(4): p. 343-51.

42. Sethi, J.K. and A.J. Vidal-Puig, *Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation*. J Lipid Res, 2007. **48**(6): p. 1253-62.
43. Hull, D., *The structure and function of brown adipose tissue*. Br Med Bull, 1966. **22**(1): p. 92-6.
44. Steiner, G. and G.F. Cahill, Jr., *Adipose Tissue Physiology*. Ann N Y Acad Sci, 1963. **110**: p. 749-53.
45. Ricquier, D., *Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**(1): p. 47-52.
46. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(2): p. E444-52.
47. Brun, R.P. and B.M. Spiegelman, *PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis*. J Endocrinol, 1997. **155**(2): p. 217-8.
48. Clarke, S.D., et al., *Peroxisome proliferators activated receptors: a family of lipid-regulated transcription factors*. American Journal of Clinical Nutrition, 1999. **70**: p. 566-571.
49. Laplante, M., et al., *PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 291-9.
50. Tansey, J.T., et al., *The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis*. IUBMB Life, 2004. **56**(7): p. 379-85.
51. Kelly, L.J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression*. Endocrinology, 1998. **139**(12): p. 4920-7.
52. Vidal-Puig, A., et al., *Regulation of PPAR γ Gene Expression by nutrition and obesity in rodents*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**: p. 2553-2560.
53. van Bilsen, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression*. Mol Cell Biochem, 2002. **239**(1-2): p. 131-8.
54. Gustafson, B., et al., *Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 933-9.
55. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends in Endocrinology Metabolism, 2000. **11**(8): p. 327-32.
56. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
57. Shimabukuro, M., et al., *Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4637-41.
58. Arch, J.R., *Central regulation of energy balance: inputs, outputs and leptin resistance*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**: p. 39-46.

59. Gray, S.L. and A.J. Vidal-Puig, *Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis*. Nutr Rev, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S7-12.
60. Medina-Gomez, G., et al., *PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e64.
61. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
62. Bahceci, M., et al., *The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults?* J Endocrinol Invest, 2007. **30**(3): p. 210-4.
63. DeFronzo, R.A., *Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes*. Int J Clin Pract Suppl, 2004. **143**: p. 9-21.
64. Qureshi, K. and G.A. Abrams, *Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(26): p. 3540-53.
65. Schling, P. and G. Löffler, *Cross Talk Between Adipose Tissue Cells: Impact on Pathophysiology*. News Physiol Sci, 2002. **17**(3): p. 99-104.
66. Robertson, R.P., et al., *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(Suppl 1): p. S119-24.
67. Feldstein, A.E., et al., *Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 185-94.
68. Briaud, I., et al., *Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 315-21.
69. Summers, S.A., *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(1): p. 42-72.
70. Pickersgill, L., et al., *Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12583-9.
71. Lupi, R., et al., *Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1437-42.
72. Holland, W.L., et al., *Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance*. Cell Metab, 2007. **5**(3): p. 167-79.
73. Timmers, S., P. Schrauwen, and J. de Vogel, *Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance*. Physiol Behav, 2007.
74. Plomgaard, P., et al., *Associations between insulin resistance and TNF-alpha in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2562-71.
75. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. Rev Gastroenterol Mex, 2005. **70 Suppl 3**: p. 52-6.

76. Feldstein, A.E., et al., *Hepatic stellate cells and fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005. **3**(4): p. 384-9.
77. Fujiwara, T., et al., *Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats*. Diabetes, 1988. **37**(11): p. 1549-58.
78. Alberts, P., et al., *Effect of high-fat diet on KKAY and ob/ob mouse liver and adipose tissue corticosterone and 11-dehydrocorticosterone concentrations*. Horm Metab Res, 2005. **37**(7): p. 402-7.
79. Gauthier, M.S., R. Favier, and J.M. Lavoie, *Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats*. Br J Nutr, 2006. **95**(2): p. 273-81.
80. Carroll, J.F., W.J. Zenebe, and T.B. Strange, *Cardiovascular Function in a Rat Model of Diet-Induced Obesity*. Hypertension, 2006. **48**(1): p. 65-72.
81. Mercer, J.G. and Z.A. Archer, *Diet-induced obesity in the Sprague-Dawley rat: dietary manipulations and their effect on hypothalamic neuropeptide energy balance systems*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1068-72.
82. Kim, S., et al., *Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model*. Gene, 2004. **340**(1): p. 99-109.
83. Ramirez, R., et al., *Effects of high-carbohydrate or high-fat diet on carbohydrate metabolism and insulin secretion in the normal rat*. Diabetes Res, 1990. **15**(4): p. 179-83.
84. Ueshima, K., et al., *A gastrointestinal lipase inhibitor reduces progression of atherosclerosis in mice fed a western-type diet*. Eur J Pharmacol, 2004. **501**(1-3): p. 137-42.
85. Basso, F., et al., *Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(2): p. 398-404.
86. Park, S.M., et al., *A high carbohydrate diet induces insulin resistance through decreased glucose utilization in ovariectomized rats*. Korean J Intern Med, 2004. **19**(2): p. 87-92.
87. Kleiner, R.E., et al., *Effects of an 8-week high-protein or high-carbohydrate diet in adults with hyperinsulinemia*. MedGenMed, 2006. **8**(4): p. 39.
88. Havel, P.J., *Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism*. Nutr Rev, 2005. **63**(5): p. 133-57.
89. Saekow, M. and J.M. Olefsky, *Effect of a high carbohydrate diet on adipocyte glucose metabolism in spontaneously obese rats and insulin-deficient diabetic rats*. Endocrinology, 1980. **107**(6): p. 2004-10.
90. Ascencio, C., et al., *Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats*. J Nutr, 2004. **134**(3): p. 522-529.
91. Young, V.R., *Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition*. J Am Diet Assoc, 1991. **91**: p. 828-835.
92. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med, 1995. **333**(5): p. 276-278.

93. Zhan, S. and S.C. Ho, *Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile*. Am J Clin Nutr., 2005. **81**(2): p. 397-408.
94. Chiji, H., K. Harayama, and S. Kiriya, *Effects of feeding rats low protein diets containing casein or soy protein isolate supplemented with methionine or oligo-L-methionine*. J Nutr, 1990. **120**(2): p. 166-71.
95. Tovar-Palacio, C., et al., *Intake of Soy Protein and Soy Protein Extracts Influences Lipid Metabolism and Hepatic Gene Expression in Gerbils*. J. Nutr., 1998. **128**: p. 839-842.
96. Hwang, C.S., et al., *Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. **101**(4-5): p. 246-53.
97. Zhang, E.J., K.M. Ng, and K.Q. Luo, *Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(17): p. 6940-50.
98. The_Solae_Company. [cited; Available from: <http://www.solae.com>.
99. Davis, J., et al., *Soy protein and isoflavones influence adiposity and development of metabolic syndrome in the obese male ZDF rat*. Ann Nutr Metab, 2007. **51**(1): p. 42-52.
100. Noriega-Lopez, L., et al., *Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20657-66.
101. Calbet, J.A. and D.A. MacLean, *Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans*. J Nutr, 2002. **132**(8): p. 2174-2182.
102. Nishi, T., et al., *The soybean beta-conglycinin beta 51-63 fragment suppresses appetite by stimulating cholecystokinin release in rats*. J Nutr, 2003. **133**(8): p. 2537-42.
103. Nishi, T., H. Hara, and F. Tomita, *Soybean beta-conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats*. J Nutr, 2003. **133**(2): p. 352-7.
104. Ahren, B., R.L. Gingerich, and P.J. Havel, *Effects of cholecystokinin and glucagon-like peptide 1 on the secretion of pancreatic polypeptide in mice*. Regul Pept, 1995. **59**(3): p. 297-302.
105. van der Burg, M.P., et al., *Insulinotropic effects of cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 during perfusion of short-term cultured canine isolated islets*. Regul Pept, 1995. **60**(1): p. 61-7.
106. Lechin, F., B. van der Dijs, and B. Orozco, *Cholecystokinin and secretin and pancreatic secretion of insulin and glucagon*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(11): p. 2422-3.
107. Manzoni, C., et al., *Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors: I. a-a' rich commercial soy concentrate and a' deficient mutant differently affect low-density lipoprotein receptor activation*. J. Agric. Food Chem, 1998. **46**: p. 2481-2484.
108. Tovar, A.R., et al., *A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephritic syndrome*. J Nutr, 2002. **132**: p. 2562-2569.

109. Tovar, A.R., et al., *Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats*. J Lipid Res, 2005. **46**(9): p. 1823-32.
110. Dang, Z., et al., *Genistein as a molecular target of PPAR γ* . Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(2): p. 962–967.
111. Mezei, O., et al., *Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells*. J Nutr, 2003. **133**(5): p. 1238-43.
112. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
113. Hartmann, K., C. Voss, and N. Hartmann, *Total body analysis of rats with special regard to fat determination. Possibility of determining fat and proteins by calculation*. Nahrung, 1977. **21**(10): p. 919-924.
114. Frisch, R.E., D.M. Hegsted, and K. Yoshinaga, *Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(1): p. 379-83.
115. Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. Journal of Biological Chemistry, 1957. **226**: p. 497-509.
116. Good, C.A., H. Kramer, and M. Somogyi, *The determination of glycogen*. J Biol Chem, 1933. **100**: p. 485-491.
117. Angulo, P., *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(6 Pt 2): p. S57-63.
118. Jenkins, D.J., et al., *Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein*. JAMA, 2003. **290**(4): p. 502-10.
119. Manco, M., et al., *The ingestion of saturated fatty acid triacylglycerols acutely affects insulin secretion and insulin sensitivity in human subjects*. Br J Nutr, 2004. **92**(6): p. 895-903.
120. Shimomura, I., et al., *Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13656-13661.
121. Rosell, M.S., et al., *Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Am. J. Clin. Nutr, 2004. **80**: p. 1391-1396.
122. Cohen, P., J.M. Ntambi, and J.M. Friedman, *Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome*. Current Drug Targets in Immune Endocrinology and Metabolic Disorders, 2003. **3**(4): p. 271-80.
123. Kakuma, T., Y. Lee, and R.H. Unger, *Effects of leptin, troglitazone, and dietary fat on stearoyl CoA desaturase*. Biochemical Biophysics Research Communication, 2002. **297**(5): p. 1259-63.
124. Sewell, A., C.B. Hollenbeck, and B. Bruce, *The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately*

- hypercholesterolemic postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(1): p. 118-21.
125. Meier, C.A. and S. Thalmann, [*White adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*]. *Bull Acad Natl Med*, 2007. **191**(4-5): p. 897-908; discussion 908-10.
 126. Dalen, K.T., et al., *Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Diabetes*, 2004. **53**(5): p. 1243-52.
 127. Arimura, N., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(11): p. 10070-6.
 128. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
 129. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity*. *Biochem Soc Trans.*, 2005. **33**(Pt 5): p. 1078-81.
 130. Unger, R.H., *The physiology of cellular liporegulation*. *Annu Rev Physiol*, 2003. **65**: p. 333-47.
 131. Ueki, K., T. Kadowaki, and C.R. Kahn, *Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome*. *Hepato Res*, 2005. **33**(2): p. 185-92.
 132. Ueki, K., T. Kondo, and C.R. Kahn, *Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(12): p. 5434-46.
 133. Lelliott, C. and A.J. Vidal-Puig, *Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28 Suppl 4**: p. S22-8.
 134. Rothwell, N.J. and M.J. Stock, *A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis*. *Obes Res*, 1997. **5**(6): p. 650-6.
 135. Imai, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4543-7.