



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN EL
DESARROLLO DEL ADIPOCITO
DISFUNCIONAL EN UN MODELO DE
OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA: EFECTO
DE LA PROTEÍNA DE SOYA

T E S I S

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

P R E S E N T A :

**MARÍA EUGENIA FRIGOLET VÁZQUEZ
VELA**

Tutor: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO



MÉXICO, D. F.

Febrero 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN EL DESARROLLO DEL ADIPOCITO DISFUNCIONAL EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA: EFECTO DE LA PROTEÍNA DE SOYA

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Jesús Adolfo García Sainz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Armando Roberto Tovar Palacio	Depto. Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Depto. Bioquímica, INCMNSZ

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (46135-M). Durante los estudios de doctorado se gozó de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
Resumen	1
Introducción y antecedentes	3
El tejido adiposo	3
Lipogénesis y lipólisis	6
Adipocinas	7
El angiotensinógeno como adipocina	10
Funcionalidad del adipocito	12
El tejido adiposo y la obesidad inducida por dieta	13
Planteamiento del problema	17
Justificación	17
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Diseño experimental	19
Metodología	20
Alimentación de las ratas	20
Obtención de muestras y tejidos	21
Extracción de ARN total	21
Determinación de expresión génica por RT-PCR (tiempo real)	21
Microarreglos de expresión	22
Análisis e interpretación de los datos de los microarreglos de expresión	23
Análisis histológico	23
Cultivo de adipocitos	23
Determinación de la influencia de la angiotensina II sobre la fosforilación de Akt	24
Medición de la concentración de adipocinas y hormonas en suero y medio de cultivo	25
Medición de la concentración de glicerol liberado por adipocitos en cultivo	26
Medición del contenido de triacilglicéridos y ADN en el tejido adiposo	26

Análisis estadístico	26
Resultados	27
Ganancia de peso, consumo de alimento, consumo de energía y peso del tejido adiposo retroperitoneal	27
Concentración de hormonas o adipocinas en suero o liberadas al medio de cultivo	28
Patrón de expresión génica en el tejido adiposo	33
Expresión de genes involucrados en el sistema renina-angiotensina	41
Fosforilación de Akt en cultivos de adipocitos	43
Determinación del área de los adipocitos, celularidad y adipogénesis	47
Discusión	53
Resumen de resultados	59
Conclusiones	59
Bibliografía	60
Anexos	73

INDICE DE TABLAS, GRAFICAS Y FIGURAS

Contenido	Página
Tabla 1. Ejemplo de algunas adipocinas, su función y sitio de actividad	3
Figura 1. El proceso de diferenciación de los preadipocitos	5
Figura 2. Componentes del sistema renina-angiotensina	10
Figura 3. Características del tejido adiposo y adipocito en el desarrollo de la obesidad	13
Gráfica 1. Ganancia de peso	27
Gráfica 2. Consumo de alimento	27
Gráfica 3. Consumo de energía	28
Gráfica 4. Peso del tejido adiposo retroperitoneal	28
Gráfica 5. Concentración de adiponectina en suero	29
Gráfica 6. Concentración de adiponectina en el medio	29
Gráfica 7. Concentración de leptina en suero	29
Gráfica 8. Gráfica de leptina en el medio	29
Gráfica 9. Concentración de IL-6 en suero	30
Gráfica 10. Concentración de IL-6 en el medio	30
Gráfica 11. Concentración de insulina en suero	31
Gráfica 12. Concentración de TNF- α en suero	31
Gráfica 13. Concentración de TNF- α en el medio	31
Gráfica 14. Concentración de angiotensina I en suero	32
Gráfica 15. Concentración de angiotensina I en el medio	32
Gráfica 16. Concentración de angiotensina II en suero	33
Gráfica 17. Concentración de angiotensina II en el medio	33
Gráfica 18. Diagrama de Venn indicando el número de genes diferencialmente expresados en el tejido adiposo retroperitoneal	34
Gráfica 19. Abundancia relativa de ARNm de algunos genes diferencialmente expresados en los microarreglos y validados por RT-PCR	35

Gráfica 20. Mapa de calor que representa el agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados	35
Tabla 2. Genes diferencialmente expresados por función biológica	36
Figura 4. Vías de interacciones biológicas utilizando genes diferencialmente expresados en las diferentes alimentaciones	40
Gráfica 21. Abundancia relativa de ARNm de leptina	41
Gráfica 22. Abundancia de ARNm de angiotensinógeno	42
Gráfica 23. Abundancia de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina	42
Gráfica 24. Abundancia de ARNm del receptor 1 para angiotensina	42
Gráfica 25. Abundancia de ARNm del receptor 2 para angiotensina	42
Gráfica 26. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con caseína	44
Gráfica 27. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con soya	44
Gráfica 28. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con caseína y alta concentración de lípidos	45
Gráfica 29. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con soya y alta concentración de lípidos	45
Gráfica 30. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas provenientes de todos los grupos dietarios	45
Figura 5. Micrográficas ópticas representativas del tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas con caseína o soya y con distintas concentraciones de lípidos.	47
Gráfica 31. Área de adipocitos provenientes del tejido adiposo retroperitoneal	48

Gráfica 32. Concentración de triacilglicéridos en el tejido adiposo retroperitoneal	49
Gráfica 33. Concentración de ADN en el tejido adiposo retroperitoneal	49
Gráfica 34. Relación triacilglicéridos/ADN en el tejido adiposo Retroperitoneal	50
Gráfica 35. Correlación entre el área de adipocitos y liberación de angiotensina I al medio	51
Gráfica 36. Correlación entre el área de adipocitos y liberación de angiotensina II al medio	51
Gráfica 37. Area de los vasos sanguíneos del tejido adiposo retroperitoneal	52
Gráfica 38. Número de vasos sanguíneos en el tejido adiposo retroperitoneal	52

INDICE DE ANEXOS

Contenido	Página
Anexo 1.1 Composición del aislado de proteína de soya y aislado de caseína (aminoácidos)	73
Anexo 1.2 Composición del aislado de proteína de soya (isoflavonas)	73
Anexo 2. Alimentación de las ratas	74
Anexo 3. Gel para comprobar integridad de RNA	76
Anexo 4. Artículo publicado en la revista científica Journal of Nutritional Biochemistry	77

“El que no sabe gozar de la ventura cuando le viene, no debe quejarse si se pasa“

Miguel de Cervantes Saavedra

A Luis,
Por compartir las grandes
alegrías y frustraciones del
trabajo de investigación

Gracias a
“Fisiología de la Nutrición”
departamento en donde realicé este
trabajo

Resumen

El tejido adiposo funciona almacenando lípidos, los cuales pueden ser removidos para obtener energía contenido en ellos cuando existe una demanda. Sin embargo, ahora se sabe que los adipocitos, células que conforman a dicho tejido, tienen gran influencia sobre el equilibrio energético. Esta influencia está dada por la capacidad endócrina del adipocito, por medio de la cual éste secreta adipocinas que tienen acción sobre el mismo adipocito u otros tipos celulares como hepatocitos, miocitos, células del páncreas. La disfunción del adipocito se ha relacionado con la falta de regulación en la síntesis de adipocinas, con crecimiento del tejido adiposo por hipertrofia de los adipocitos y con hipoxia e infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo. Durante el establecimiento de la obesidad, se alteran algunos procesos que están relacionados con la función adecuada del tejido adiposo. Con relación a lo anterior, la expresión y liberación del angiotensinógeno como adipocina se aumenta en estados de obesidad. De hecho, los componentes del sistema renina-angiotensina están localizados en el tejido adiposo, y la expresión de dichos componentes se incrementa en la obesidad. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de la angiotensina II como hormona efectora del sistema renina-angiotensina sobre la funcionalidad del tejido adiposo visceral en un modelo de obesidad inducida por dieta. Para el cumplimiento de este objetivo se alimentaron ratas con proteína de soya o caseína y con 5% o 25% de lípidos, se analizó el patrón de expresión génica del tejido adiposo por medio de microarreglos, se midió la concentración de hormonas y adipocinas en el suero y medio de cultivo de adipocitos, se analizó el área de los adipocitos y vasos sanguíneos y se determinó la influencia de la angiotensina II sobre la activación de Akt en adipocitos de ratas bajo los mismos tratamientos dietarios. Los resultados muestran que las altas concentraciones de lípidos en la dieta aumentan la concentración sérica y expresión de leptina en el tejido adiposo, incrementan la liberación de angiotensina I al medio de cultivo, la expresión de la enzima convertidora de angiotensina, la expresión del receptor 1 para angiotensina y el tamaño de los adipocitos. Por otro lado, de los resultados se concluye que el consumo de un aislado de proteína de soya es protector contra el desarrollo de obesidad al inducir menor ganancia de peso y menor concentración sérica de leptina, promueve cambios globales a nivel de expresión génica, evita la hipertrofia de los adipocitos aumentando el número de células, mantiene la

regulación en la síntesis de adipocinas, disminuye las concentraciones séricas de insulina y liberación de angiotensina. También, existe mayor activación de Akt en células adiposas de ratas alimentadas con proteína de soya. Estos datos nos permiten concluir que el consumo de proteína de soya en comparación con el consumo de caseína como proteína de origen animal, trae consecuencias favorables sobre la funcionalidad del adipocito. Así, el consumo de proteína de soya evita el crecimiento del tejido adiposo, específicamente mantiene el menor tamaño de los adipocitos, aumenta el proceso angiogénico e induce menor concentración o liberación de hormonas relacionadas con el síndrome metabólico como leptina, insulina, interleucina-6 y angiotensinas I y II. Entonces, el consumo de dicha proteína pudiera representar una herramienta nutricia para la prevención de la obesidad y sus complicaciones como son la hipertensión, resistencia a la insulina y resistencia a la leptina.

Introducción y Antecedentes

La obesidad, definida como un incremento del tejido adiposo, es una de las patologías de mayor relevancia en nuestro país [1]. En el 2006 se determinó que el 70% de la población adulta en México había desarrollado sobrepeso u obesidad [2]. La obesidad, frecuentemente, se asocia con alteraciones como dislipidemia, hipertensión arterial y resistencia a la insulina. Todos estos eventos, al coexistir, dan lugar al síndrome metabólico.

EL TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo se encarga de almacenar energía en forma de triacilglicérolos con el objeto de tener acceso a dicha energía cuando existe una demanda. Específicamente, el tejido adiposo tiene las siguientes funciones. Se encarga de proteger, aislar al cuerpo y de manera importante regula procesos lipolíticos y lipogénicos; de forma que almacena triacilglicérolos liberando ácidos grasos y glicerol según las condiciones nutricias [3]. Ahora se sabe que el tejido adiposo no sólo participa en el almacenaje y distribución de energía; también, es considerado como un órgano endócrino con funciones muy importantes en la regulación del equilibrio energético a través de la secreción de adipocinas como leptina, adiponectina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), angiotensinógeno, entre otras.

A través de su función secretora al tejido adiposo se le han atribuido otras funciones. Por ejemplo, participación en la regulación de procesos como son la angiogénesis, adipogénesis, formación y disolución de la matriz extracelular, respuesta inmune y hemostasis [4, 5].

Tabla 1. Ejemplo de algunas adipocinas, su función y sitio de actividad

Molécula	Función	Actividad
Leptina	Promueve saciedad, menor peso corporal y lipólisis en el adipocito.	Autócrina, parácrina, endócrina
Adiponectina	Aumenta sensibilidad a la insulina y disminuye proceso aterogénico.	Endócrina (islotos pancreáticos, hepatocitos, miocitos)
Resistina	Induce intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.	Autócrina y endócrina (hepatocitos y miocitos)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	Interfiere con la señalización de la insulina, induce lipólisis en el adipocito y caquexia.	Autócrina y endócrina
Interleucina-6 (IL-6)	Participa en el proceso proinflamatorio y metabolismo de glucosa.	Autócrina y endócrina
Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1)	Inhibe al sistema fibrinolítico	Endócrina (hepatocitos)
Angiotensinógeno	Aumenta lipogénesis e hipertrofia del adipocito, influye en la falla de la síntesis de adipocinas.	Autócrina y endócrina (hepatocitos y células vasculares de músculo liso)
Apelina	Aumenta contracción miocardio y disminuye la presión arterial. También participa en la fisiología del hueso.	Endócrina (cardiomiocitos, células pulmón, riñón y neuronas)
Visfatina	Participa en la homeostasis del metabolismo de la glucosa.	Autócrina
Proteína de unión a retinol-4 (RBP-4)	Promueve resistencia a la insulina y es indicador de porcentaje de masa grasa intra-abdominal.	¿?

Los adipocitos son las células que se encargan de secretar las proteínas mencionadas. Este tipo celular se encuentra embebido en el tejido adiposo. Sólo una tercera parte de las células que conforman al tejido adiposo son adipocitos, el resto está representado por fibroblastos, macrófagos, monocitos células del estroma vascular y preadipocitos [6]. La adipogénesis o diferenciación de los preadipocitos se da por actividad hormonal, específicamente por insulina y por la presencia de ciertos factores de transcripción, como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas gama (PPAR γ) y proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP-1) [7]. Algunos estudios muestran que deleciones específicas del gen de PPAR γ inducen lipodistrofia, en estos se sugiere el papel fundamental y suficiente del factor de transcripción para la formación de adipocitos maduros [8]. La conversión de preadipocitos a adipocitos, es decir, la adipogénesis, incluye cuatro fases: arresto del crecimiento, expansión de clonas, diferenciación temprana y diferenciación terminal. Las etapas de diferenciación son dirigidas por C/EBP (proteínas de unión al facilitador CCAAT) y PPAR γ . El último mantiene a las células en el estado de diferenciación terminal. Una vez diferenciados, los adipocitos adquieren forma redonda y contienen las enzimas necesarias para los procesos de lipogénesis y lipólisis [9]. Las tiazolidinedionas son ligandos de PPAR γ que inducen la diferenciación de los preadipocitos, y el reclutamiento de nuevos y pequeños adipocitos, a su vez, contribuye a una mayor capacidad de almacenar lípidos y mantener la sensibilidad a la insulina [10].

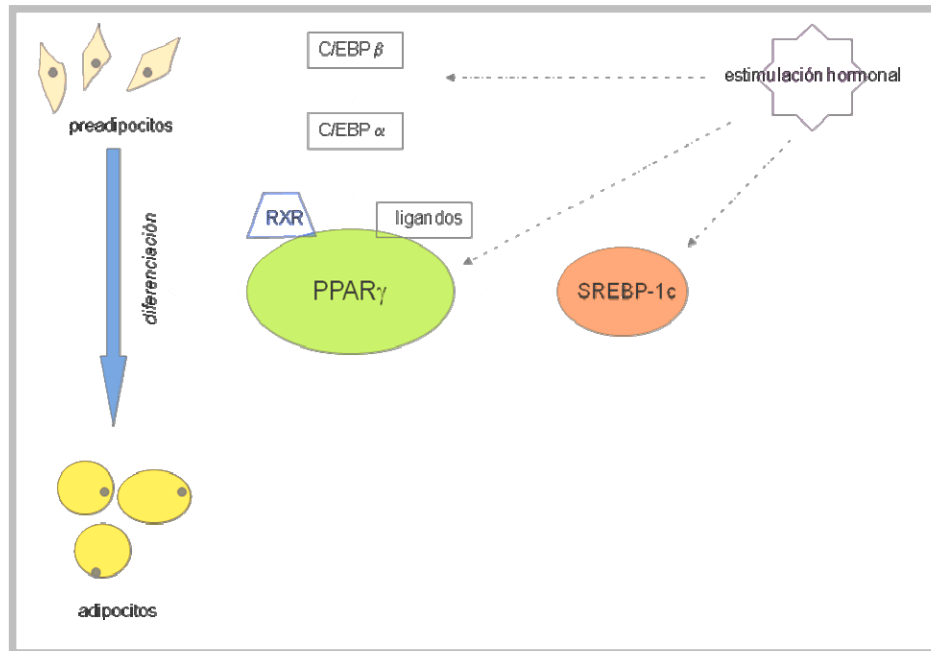


Figura 1. Proceso de diferenciación de los preadipocitos. La estimulación hormonal promueve la transcripción y activación de moléculas necesarias para la diferenciación de preadipocitos o su conversión en adipocitos maduros. C/EBP: proteína de unión al facilitador CCAAT; RXR: receptor de ácido retinoico; PPAR: receptor activado por proliferadores de peroxisomas; SREBP: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides.

Las células adiposas crecen por hiperplasia, sobre todo en las etapas de desarrollo. De hecho, el proceso adipogénico disminuye conforme avanza la edad y esto tiene consecuencias metabólicas como el cúmulo de lípidos en tejidos no adiposos [11, 12]. Así, el crecimiento por hipertrofia se ha relacionado con mayor liberación de ácidos grasos libres y hormonas tales como leptina y angiotensina. También, el mayor tamaño de adipocitos viscerales se asocia a resistencia a la insulina periférica y hepática [13, 14].

LIPOGENESIS Y LIPOLISIS

La lipogénesis es la síntesis de ácidos grasos y su esterificación con glicerol. Así se almacenan lípidos como reserva energética en forma de triacilgliceroles. La lipogénesis sucede principalmente en hígado y en segundo lugar en el tejido adiposo blanco [15].

También se sabe que aumenta en el postprandio, cuando la insulina está incrementada en la circulación, y que se inhibe en estados de ayuno [16, 17]. La acumulación de lípidos en el tejido adiposo depende de la captura de ácidos grasos por la hidrólisis de triacilgliceroles contenidos en los quilomicrones. La lipasa de las lipoproteínas se encarga de la hidrólisis mencionada. Una vez que los ácidos grasos se internalizan, la reesterificación es necesaria para el almacén de triacilgliceroles en la vacuola lipídica [18]. Varias enzimas involucradas en la lipogénesis del tejido adiposo son activadas o su expresión inducida por la insulina. Estas son la sintasa de los ácidos grasos (FAS), la acetil CoA carboxilasa (ACC) [19] y la enzima málica (ME).

Un factor de transcripción que se ha propuesto como modulador lipogénico es el SREBP-1. De hecho, su papel en el hígado es claro, pues que induce la expresión de FAS y ACC. Sin embargo, la función del SREBP-1c en el adipocito no está clara hasta el momento. Los adipocitos de ratones que sobreexpresan la isoforma SREBP-1a sintetizan lípidos de manera acelerada, pero los adipocitos de ratones que sobreexpresan SREBP-1c reducen el mensajero de proteínas necesarias para la adipogénesis como C/EBP- α and PPAR γ . Esto tiene como consecuencia la atrofia del tejido adiposo o el establecimiento de un síndrome parecido a la lipodistrofia [20]. Además, la expresión de SREBP-1c en el tejido adiposo no regula positivamente la expresión de sus genes lipogénicos. Lo anterior sugiere diferentes funciones de la isoforma 1c en el hígado y en el tejido adiposo [21, 22]. En el último, su función parece no ser lipogénica y queda por esclarecer.

La disponibilidad de ácidos grasos para los tejidos no adiposos depende de la actividad de las enzimas lipolíticas presentes en el tejido adiposo. La intención de las enzimas lipolíticas es proveer de ácidos grasos a otros órganos en caso de una demanda

energética. Los triacilgliceroles almacenados en la vacuola lipídica del adipocito son primeramente hidrolizados por la lipasa de los triacilgliceroles del adipocito (ATGL, por sus siglas en inglés adipose triglyceride lipase) o desnutrina, por la cual se libera diacilglicerol y un ácido graso [23]. Después de la hidrólisis por desnutrina, los diacilgliceroles son hidrolizados por la lipasa sensible a hormonas (HSL, por sus siglas en inglés hormone sensitive lipase) y la lipasa de monogliceroles (MGL) liberando ácidos grasos y glicerol [24-26].

ADIPOCINAS

Como se comentó, el adipocito es una célula capaz de secretar citocinas, hormonas y otras proteínas con actividad biológica, que en conjunto, son llamadas adipocinas. La leptina fue la primera proteína que se describió como liberada por el tejido adiposo, es decir, como una adipocina. La leptina humana y de roedores está codificada por el gen *ob* y está constituida por 167 aminoácidos y tiene un peso molecular de 16 kDa [4]. La leptina regula el metabolismo energético aumentando el gasto energético y disminuyendo el consumo de alimentos. Esta función se lleva a cabo por medio de receptores para dicha hormona en el hipotálamo, en donde se controla el balance energético y saciedad [27-29]. Existen múltiples estudios en los cuales se demuestra la presencia de los receptores de leptina en órganos como hígado, músculo esquelético, corazón, riñón y páncreas [29-31]. En dichos órganos la leptina tiene funciones como regulación de la saciedad, oxidación de lípidos y termogénesis [26]. La concentración circulante y expresión de leptina están directamente asociadas con adiposidad y con cambios en el peso corporal. El mensajero de leptina está presente de forma más abundante en el tejido adiposo, sin embargo, está presente también en el ovario, intestino e hígado [28]. Existen fracciones de leptina preformada en vesículas pinocíticas de los adipocitos y así, después del consumo de alimento, se puede liberar leptina [32]. De forma interesante, los adipocitos también son células que expresan a los receptores de leptina, por lo que existe un papel autócrino y parácrino de la hormona. Con respecto a su función autócrina, la leptina es capaz de convertir a las células adiposas en células densas en mitocondrias con gran capacidad oxidativa. De hecho, los adipocitos que responden a las altas concentraciones de leptina tienden a depletar el 95% de los lípidos contenidos en la vacuola lipídica. Las altas

concentraciones de leptina o hiperleptinemia que se presentan en la obesidad se asocian a la resistencia a la leptina, una condición en la que la síntesis de lípidos se incrementa y la tasa de oxidación de lípidos se disminuye. La leptina provoca la regulación positiva de genes oxidativos en el hígado, por lo tanto, la resistencia a la leptina que acompaña a la hiperleptinemia puede llevar a la esteatosis hepática y acumulación de lípidos en tejidos no adiposos. Por esto, la resistencia a la leptina ha sido propuesta como una causa importante de la disfunción del adipocito [33-36].

Otra adipocina con funciones importantes sobre la homeostasis de lípidos es la adiponectina. A esta hormona se le ha dado otros nombres tales como AdipoQ y Acrp30, se secreta exclusivamente por adipocitos y tiene un peso molecular de 30 kDa. La adiponectina forma complejos multiméricos en plasma, por ejemplo, trimeros, hexámeros, o polímeros de 12 a 18 monómeros [37]. Se le han atribuido funciones como la de mejorar la sensibilidad a la insulina, aumentar la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo y disminuir la expresión de moléculas de adhesión, por lo que disminuye el riesgo aterogénico. Estas funciones las lleva a cabo específicamente por medio del aumento de la expresión de la proteína desacoplante 2 y la acil CoA oxidasa en el músculo y el aumento en la expresión de PPAR γ en el tejido adiposo. Además, la adiponectina induce la fosforilación de la cinasa activada por AMP (AMPK) en el hígado y músculo esquelético. El aumento en la expresión o activación de los genes mencionados incrementa el catabolismo de lípidos en el músculo e hígado y aumenta la capacidad de almacenar lípidos en nuevas células adiposas, por lo cual se disminuye el riesgo de resistencia a la insulina [38]. La adiponectina también es capaz de inducir la fosforilación del receptor de insulina (IR) y del sustrato del receptor de la insulina (IRS), la cual es necesaria para la translocación del transportador de glucosa Glut 4 y por lo tanto, la internalización de glucosa a músculo e hígado [39]. Los efectos moleculares de la adiponectina se dan a través de sus receptores AdipoR1 y Adipo R2. El receptor AdipoR1 se expresa de forma ubicua, mientras que el AdipoR2 está presente de manera muy abundante en el hígado de roedores [40]. Por medio de sus receptores la adiponectina brinda efectos benéficos en células diana, pero su secreción y la densidad o presencia de receptores para adiponectina se disminuye en animales y humanos obesos. Así, la concentración de adiponectina en suero se relaciona inversamente con resistencia a la insulina y síndrome metabólico en humanos [41]. Entonces, la concentración de adiponectina está disminuida en estados de obesidad, diabetes tipo 2 y

aterosclerosis. En el área epidemiológica, los estudios muestran que las concentraciones bajas de adiponectina en el suero de sujetos de mediana edad puede predecir el riesgo al desarrollo de intolerancia a la glucosa [42].

Al contrario que la adiponectina, el TNF- α tiene acciones negativas sobre la sensibilidad a la insulina y se asocia a la respuesta inflamatoria en varios tejidos. Esta molécula es una citocina liberada por macrófagos y monocitos, aunque ahora se sabe que también es secretada por adipocitos. El gen del TNF humano codifica para una proteína inmadura de alrededor de 25 kDa y una proteína madura de 17.3 kDa [43]. Esta citocina fue primero identificada como inductor de caquexia en animales de experimentación. En el tejido adiposo inhibe la síntesis de enzimas metabólicas. Se ha propuesto, también, que el TNF- α en el adipocito desencadena una serie de reacciones en las que participan las cinasas ERK aumentando la concentración intracelular de AMP cíclico y se inhiba la fosfodiesterasa 3B, lo que produce una disminución de actividad y expresión de perilipinas. Las perilipinas son proteínas que tienen la función de impedir la utilización de los triacilglicéridos contenidos en la vacuola lipídica del adipocito. Además, el TNF- α también tiene acceso directo sobre la lipasa sensible a hormonas (HSL). Estas acciones conducen a un aumento de la lipólisis y, por lo tanto, una elevación de ácidos grasos circulantes que se dirigen a órganos no adiposos, aumentando el riesgo de desarrollo de lipotoxicidad [44]. Por otro lado, se ha visto que la expresión de TNF- α en animales genéticamente obesos está aumentada. Estos mismos modelos animales tienen mejora en la sensibilidad a la insulina cuando carecen de la presencia de TNF- α o sus receptores [45, 46].

Existe otra citocina proinflamatoria que puede ser secretada por el adipocito. Esta es la interleucina-6 o IL-6, que al igual que el TNF- α tiene acciones lipolíticas y reduce la expresión y actividad de la lipasa de lipoproteínas en cultivos primarios de adipocitos [46, 47]. La IL-6 se encuentra en el suero como una familia de fosfoglicoproteínas con un rango de masa molecular de 19 a 30 kDa [48]. En cuanto a su relación con la señalización de la insulina existe todavía controversia. Se ha reportado que la IL-6 reduce la síntesis hepática de glucógeno mediada por insulina y la captura de glucosa en los adipocitos [49], pero se ha encontrado lo contrario en miotúbulos [50]. Las concentraciones de IL-6 son mayores en el suero de humanos

obesos o resistentes a la insulina que sus controles [51, 52]. Se podría especular que un aumento crónico de TNF- α e IL-6 podría disparar la resistencia a la insulina, mientras los incrementos transitorios de las citocinas pudieran contribuir a la homeostasis de la glucosa. Estas proteínas modulan la resistencia a la insulina de distintas formas, las cuales incluyen a la fosforilación de IRS en residuos de serina por la cinasa N terminal de c-Jun (c-Jun N-terminal kinase 1 o JNK-1), activación de factor nuclear NF- κ B por la cinasa I κ B (IKK) y la inducción de SOCS-3. Por estas razones, a ambas citocinas se les ha considerado mediadores proinflamatorios que mantienen una asociación entre la inflamación, obesidad y resistencia a la insulina [53].

EL ANGIOTENSINÓGENO COMO ADIPOCINA

El angiotensinógeno, como se mencionó, es secretado por el tejido adiposo, por lo tanto se considera una adipocina. El angiotensinógeno (AGT) es una proteína con masa molecular de aproximadamente 60 kDa en la cual los primeros 14 aminoácidos son de especial importancia. El angiotensinógeno es el precursor de la hormona efectora angiotensina II y es producida principalmente por el hígado. Éste es liberado a la circulación y entonces, es convertido en el decapeptido angiotensina I por medio de la acción de la renina. La renina es una aspartil proteasa que es sintetizada y almacenada en células yuxtglomerulares presentes en el riñón [54]. La enzima convertidora de angiotensina, la cual es sintetizada en el pulmón utiliza como sustrato a la angiotensina I para dar origen a la angiotensina II. La angiotensina II es un péptido conformado por ocho aminoácidos, que al unirse a su receptor, es una molécula con potentes funciones vasoconstrictoras, entre otras. De hecho, la angiotensina II un agente vasopresor muy potente; además es un importante regulador de la secreción de otra hormona por la corteza de la glándula suprarrenal, la aldosterona. En el corazón, la angiotensina II incrementa el flujo de calcio y la fuerza de contracción del músculo. [55-57].

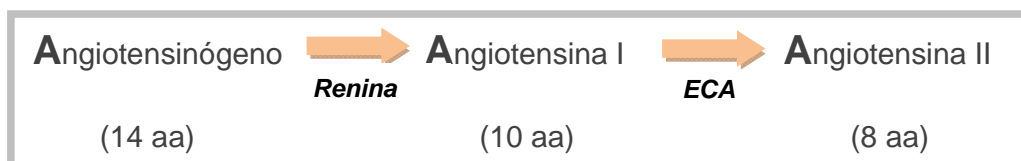


Figura 2. Componentes del sistema renina-angiotensina.

Sin embargo, en los últimos años, se han encontrado todos los componentes del sistema renina-angiotensina presentes de forma local en el tejido adiposo humano y de roedores [58, 59]. También, en el tejido adiposo se han hallado las dos isoformas de los receptores de angiotensina II, AT1 y AT2, aunque se desconocen las vías de señalización por la hormona en el mismo tejido [60, 61]. Lo anterior asegura que el tejido adiposo es un regulador importante de las funciones endócrinas y autócrinas de la angiotensina II, pues este tejido contribuye al incremento de las concentraciones de angiotensinógeno en suero, sobre todo durante el síndrome metabólico [61, 62]. De hecho, se sabe que en la obesidad se incrementa la síntesis de angiotensinógeno por el tejido adiposo y se da la activación exacerbada del sistema renina-angiotensina. La sobreexpresión del angiotensinógeno se ha relacionado con la presencia de adipocitos de mayor tamaño, o adipocitos hipertróficos, los cuales son menos funcionales [59, 63, 64]. En humanos, se ha encontrado una relación directa entre el índice de masa corporal y la expresión de la enzima convertidora de angiotensina y el angiotensinógeno [65, 66]. También, se sabe que la angiotensina II, a partir de su receptor AT1 inhibe la diferenciación de adipocitos, promueve mayor liberación de leptina, TNF- α , IL-6 y menor liberación de adiponectina [67, 68].

Con respecto a la angiotensina y su relación con el metabolismo de la glucosa, se ha demostrado que la infusión de angiotensina II induce menor captura de glucosa en el tejido adiposo subcutáneo abdominal [69]. En células vasculares de músculo liso, la acción de la angiotensina II se ha asociado con menor fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) y menor unión de IRS-1 a la cinasa-3 de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI3K) y, como consecuencia, menor sensibilidad a la insulina y menor captura de glucosa [59, 70-72]. En los últimos años se ha estudiado la acción de la angiotensina II sobre la sensibilidad de la insulina de forma particular en el tejido adiposo. Las conclusiones sobre el efecto de la hormona aún no son claras, sin embargo, existe evidencia que indica que la angiotensina II pudiera aumentar la autofosforilación del receptor de insulina. Esta fosforilación se incrementa cuando se utilizan ambas hormonas para estimular células adiposas. La misma tendencia se observa con la activación de Akt tras el estímulo con angiotensina II y con angiotensina II e insulina [73].

Si la angiotensina II es responsable de todos estos mecanismos en el tejido adiposo, entonces esta molécula puede ser uno de los vínculos entre la resistencia a la insulina e hipertensión arterial, alteraciones que generalmente coexisten durante el desarrollo de obesidad y pérdida de funcionalidad del tejido adiposo.

FUNCIONALIDAD DEL ADIPOCITO

El adipocito funcional y el desarrollo del adipocito disfuncional son términos que a la fecha requieren ser definidos, sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora nos permiten sugerir una descripción de la funcionalidad de los adipocitos. Durante la obesidad, los adipocitos que conforman al tejido adiposo pierden la capacidad de ser funcionales. La pérdida de la funcionalidad de los adipocitos se da en los siguientes casos. Primero, cuando existe falla en la regulación de la síntesis de adipocinas, es decir, cuando se secretan en gran proporción adipocinas proinflamatorias, proaterogénicas y prodiabéticas y esto se acompaña de menor liberación de adiponectina. Segundo, cuando se alteran los procesos de diferenciación de las células adiposas, lo cual, generalmente, se asocia con una disminuida capacidad de incorporar el exceso energético. Tercero, cuando el crecimiento del tejido adiposo se relaciona con hipoxia e infiltración de macrófagos, los cuales hacen más evidente la presencia de citocinas proinflamatorias [74-76]. De esta forma, los adipocitos de humanos o roedores obesos crecen, especialmente, por medio de hipertrofia y liberan mayores concentraciones de leptina, mayores concentraciones de adipocinas proinflamatorias y menores concentraciones de adiponectina. Por estas razones, la disfunción del adipocito puede culminar con obesidad, resistencia a la insulina y enfermedades vasculares. Así, las intervenciones más promisorias para tratar a la obesidad serían aquellas que apuntaran a la disfunción del adipocito.

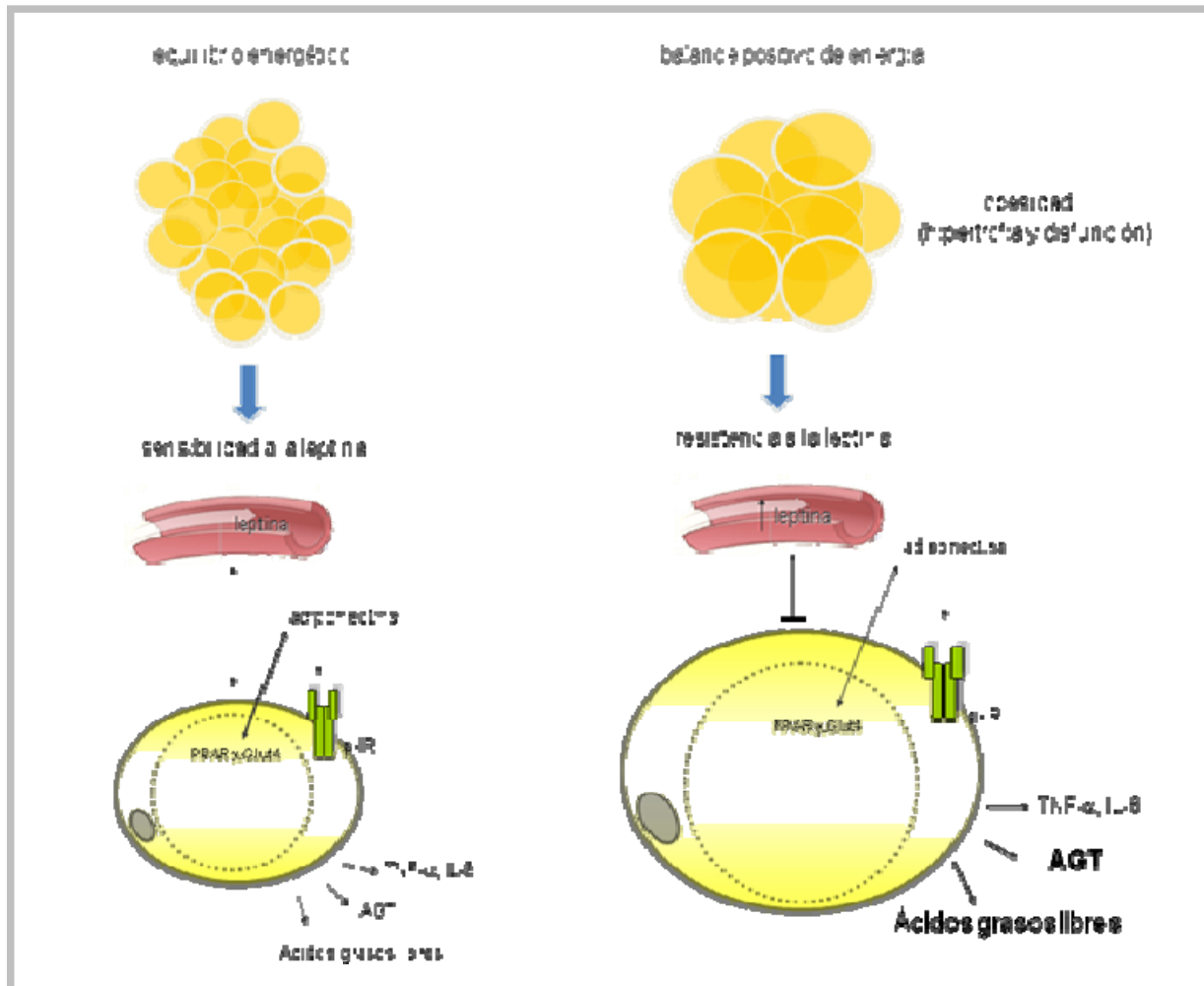


Figura 3. Características del tejido adiposo y adipocito en el desarrollo de la obesidad. La liberación de leptina, TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6) y angiotensinógeno y ácidos grasos libres puede aumentarse, mientras que la secreción de adiponectina se disminuye en estados de obesidad. Esto tiene consecuencias como alteraciones en la sensibilidad a la insulina, proceso adipogénico y metabolismo de lípidos.

EL TEJIDO ADIPOSO Y LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

La obesidad como enfermedad tiene una etiología dietaria en el origen. Los modelos de roedores obesos han sido muy informativos, ya que han mostrado el papel

específico de un nutrimento y su influencia sobre el desarrollo de la obesidad [77, 78]. Las dietas altas en grasa que proporcionan 30 a 60% de la energía total en forma de lípidos han sido utilizadas para generar obesidad, resistencia a la insulina e hiperglicemia en roedores [54, 79]. La adición de colesterol a una dieta alta en grasa en roedores produce obesidad, hipercolesterolemia y aterosclerosis, alteraciones que han sido relacionadas con el síndrome metabólico [80]. Sin embargo, los efectos de una dieta alta en grasa dependen del tipo de grasa utilizada, pues el consumo de ácidos grasos saturados provoca mayor ganancia de peso y adiposidad que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados [81]. Las dietas altas en hidratos de carbono son también usadas para generar ganancia de peso, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. Estas anomalías se han asociado a un alto contenido de fructosa o sacarosa como fuente de hidratos de carbono [82, 83].

De forma reciente, se ha considerado que no sólo la cantidad de grasa o hidratos de carbono inducen obesidad, sino el tipo de proteína en la dieta. Este efecto está mediado, principalmente, por la capacidad de los diferentes tipos de proteínas para estimular la liberación de insulina. Así, las proteínas de origen vegetal como la proteína de soya estimulan menor secreción de insulina que las proteínas de origen animal como la caseína [84].

También, se reconoce que la ingestión de proteína vegetal sobre la proteína animal reduce el riesgo de desarrollo de enfermedades coronarias. Muchos estudios han demostrado que el consumo de la proteína de soya tiene beneficios en la salud reduciendo las concentraciones de colesterol y triacilglicérols séricos [85].

El frijol de soya ha tomado importancia por su contenido de hidratos de carbono complejos, proteína, fibra soluble, fitoestrógenos y nutrimentos inorgánicos. El contenido de proteína en esta leguminosa es aproximadamente 35-40% [86]. La proteína de soya se considera como un tipo de proteína completa, pues el patrón de aminoácidos es el adecuado y comparable con el estándar de oro, ovoalbúmina. El frijol de soya tiene un porcentaje de lípidos de 18 a 20% y un balance de ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y saturados deseable (58, 23 y 15%, respectivamente) [87].

En este trabajo se utilizó un aislado de proteína de soya, el cual contiene 86% de proteína y referiremos a este aislado como “proteína de soya”. Al respecto, se sabe que los aislados de proteína de soya están compuestos en un 90% por dos tipos de proteínas: la β -conglucina o globulina 7S y la glicina o globulina 11S. Éstos péptidos inducen menor expresión de genes lipogénicos y mayor expresión de genes de enzimas relacionadas con oxidación de lípidos [88-90], aunque a la fecha se desconoce el mecanismo por el cual ocurre esta respuesta.

En ensayos con diferentes modelos experimentales que incluyen al síndrome nefrótico experimental, o el de las ratas Zucker que tienen un defecto en el receptor de leptina, o en el de obesidad inducida por dieta, se ha observado que el consumo de proteína de soya reduce significativamente las concentraciones de colesterol y triacilgliceroles en suero [91]. Además, se ha observado en estos modelos que también se reduce la acumulación de triacilgliceroles y colesterol en el hígado, lo cual indica su influencia para reducir el proceso de lipotoxicidad. Estos cambios en el hígado se han asociado a una menor expresión del factor de transcripción SREBP-1 y de uno de los genes blanco regulados por este factor que es la sintasa de los ácidos grasos [92]. A su vez, la disminución en la síntesis de ácidos grasos en hígado se acompaña de menor concentración sérica de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Asimismo, se ha visto que la proteína de soya en la dieta aumenta la expresión y concentración plasmática de adiponectina [93].

En nuestro laboratorio se ha trabajado con un modelo de obesidad inducida por dieta en el cual la proteína de soya es protectora contra el desarrollo de obesidad. Se ha demostrado que las ratas alimentadas con proteína de soya y alta concentración de lípidos alcanzan menos peso y tienen menor tamaño de adipocitos que los animales alimentados con caseína y alta concentración de lípidos [91]. Con estos resultados concluimos que el tipo de proteína en la dieta podría tener un efecto importante sobre la funcionalidad del adipocito, ya que el mayor tamaño de los adipocitos se ha asociado a un perfil de secreción de adipocinas no deseable.

A partir de este trabajo se pretende explorar si el consumo de proteína de soya, en un modelo de obesidad inducida por dieta, tiene influencia sobre las acciones de la

angiotensina en el tejido adiposo. Un estudio reciente concluye que la proteína de soya y sus hidrolizados son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I [94]. Asimismo, las isoflavonas, las cuales están presentes en los aislados de proteína de soya, también pueden inhibir a la misma enzima [95] y, por lo tanto, el consumo del aislado pudiera tener influencia sobre el sistema renina-angiotensina, en el tejido adiposo. La proteína de soya también ha demostrado ser un hipolipemiante importante y protectora de la función renal [96, 97]. Por estas razones, la proteína de soya en la dieta podría tener un efecto positivo sobre algunas patologías que acompañan a la obesidad.

Planteamiento del problema

El consumo de una dieta hiperenergética puede contribuir a la obesidad y pérdida de la funcionalidad del tejido adiposo, en donde dicho tejido es incapaz de responder a las señales del medio y regula deficientemente la producción de adipocinas y los procesos de diferenciación de los preadipocitos. Así, la disfunción del adipocito pudiera culminar con procesos patológicos como resistencia a la insulina. La proteína de soya se ha descrito como un componente de la dieta que tiene influencia positiva sobre el metabolismo del adipocito, su tamaño y su funcionalidad. Es posible, entonces, que la alimentación que contiene proteína de soya mantenga la función del adipocito a través de una disminución en la actividad de los componentes del sistema renina-angiotensina en el tejido adiposo. El decremento en el sistema mencionado se relacionaría con mayor sensibilidad a la insulina.

Justificación

La obesidad representa, en la actualidad, un problema de salud pública. Como enfermedad crónica, la obesidad forma parte del síndrome metabólico, en el cual se incluye también resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares e hipertensión.

Se cree que la proteína de soya pudiera tener un efecto protector contra el incremento de adiposidad y disfuncionalidad del tejido adiposo. La intención de la presente investigación es la de obtener conocimiento del efecto de la obesidad inducida por dieta y de la proteína de soya sobre la funcionalidad del tejido adiposo.

El conocimiento de los mecanismos por los que el tipo de proteína en la dieta puede modular la expresión de diversas adipocinas en el tejido adiposo es importante para desarrollar nuevas formas de prevención y tratamiento de la obesidad.

Hipótesis

En un modelo de obesidad inducida por dieta, la angiotensina II, tendrá influencia sobre la funcionalidad del adipocito.

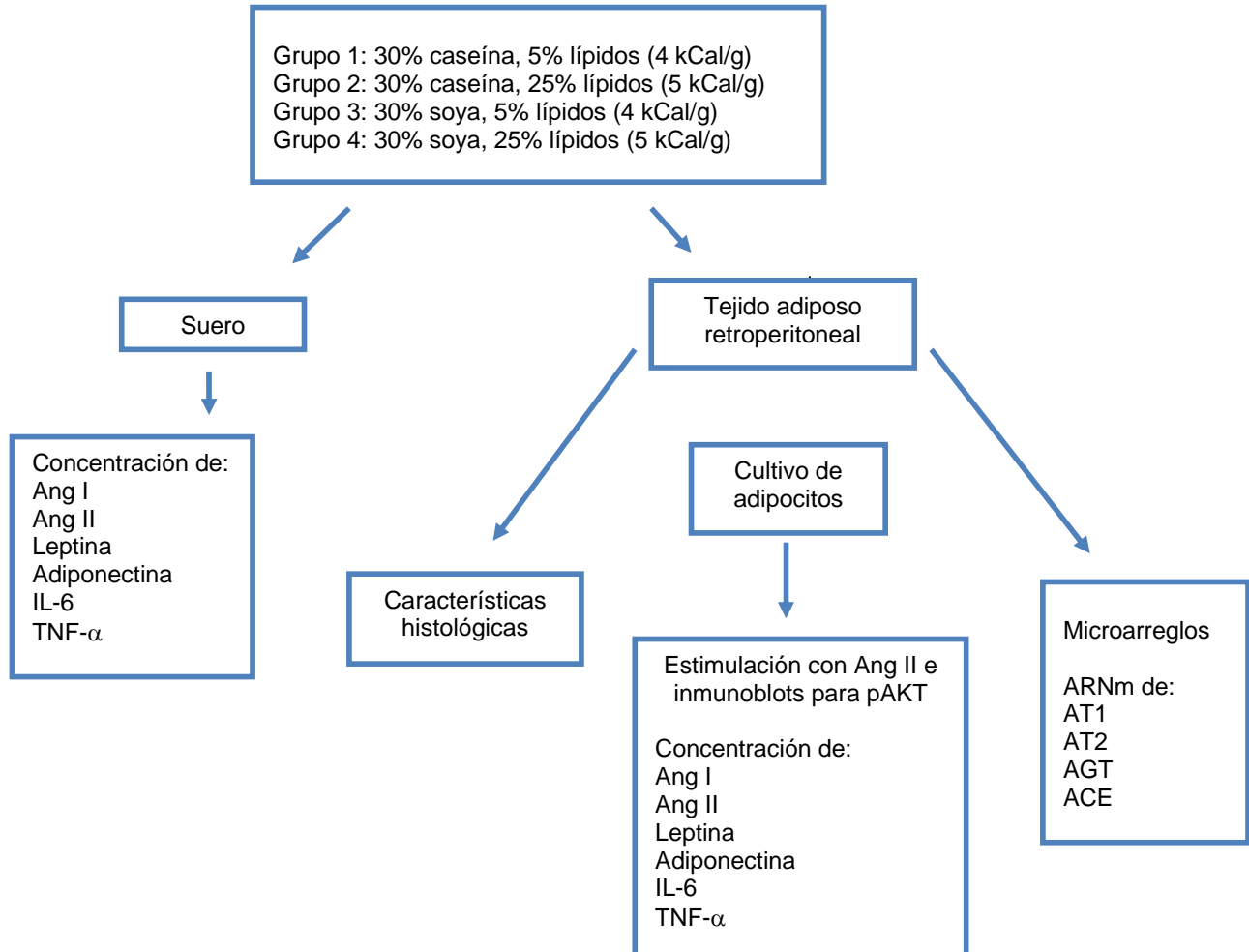
Objetivo general

Evaluar la participación de la angiotensina II en la funcionalidad del tejido adiposo visceral durante la obesidad inducida por dieta.

Objetivos específicos

- Estudiar en el tejido adiposo visceral de animales alimentados con dietas en las que se varía el tipo de proteína y la concentración de lípidos la expresión de genes del sistema renina-angiotensina, del metabolismo de lípidos y otros que estén asociados con la funcionalidad del tejido adiposo.
- Determinar la influencia *in vitro* de la angiotensina II sobre la fosforilación de AKT, involucrada en la señalización de la insulina en adipocitos obtenidos de tejido adiposo visceral de animales alimentados con las dietas experimentales.
- Medir la concentración de adipocinas y hormonas en suero y medio de cultivo de adipocitos viscerales provenientes de animales alimentados con las dietas experimentales.
- Evaluar la asociación entre la concentración de angiotensina II y el tamaño de los adipocitos viscerales de ratas alimentadas con las dietas experimentales.

Diseño experimental



Metodología

Alimentación de las ratas

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho con peso inicial de 100 g provenientes de Harlan Teklan México. Las ratas se mantuvieron en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (DIEB-INCMNSZ) en jaulas individuales con ciclos de luz/oscuridad de 12 h con libre acceso a la dieta y al agua por 180 días. El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética para uso de animales de experimentación del INCMNSZ. Se registró diariamente el consumo de alimento y el consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en cada dieta. La composición del aislado de proteína de soya y de las dietas que se administraron a los animales se explica en el Anexo 1 y 2, respectivamente. Todos los componentes de la dieta se obtuvieron de Harlan Teklad, excepto el aislado de proteína de soya, el cual se obtuvo de Protein Technologies.

Los grupos de estudio fueron los siguientes:

Grupo 1 o grupo control (Cas) [14]. Grupo de animales que se alimentó con 30% de caseína como fuente de proteína y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (4 kcal/g).

Grupo 2 (Cas HF). Grupo que se alimentó con 30% de caseína, 20% de lípidos en forma de manteca y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (5 kcal/g).

Grupo 3 (Soy). Grupo al cual se le trató con una dieta que contiene 30% de proteína de soya y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz (4 kcal/g).

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

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

Obtención de muestras y tejidos

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

Extracción de ARN total

El ARN total del tejido adiposo retroperitoneal se aisló por el método de Chomczynski [98]. Posteriormente, se analizó la integridad del ácido nucleico por medio de un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies) o por medio de un gel de agarosa (Anexo 3). La concentración de ARN se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm; a esta longitud de onda una densidad óptica equivale a 40 mg/ml, la pureza se determinó como óptima cuando la relación de la absorbencia a 260/280 nm era mayor a 1.8. El ARN obtenido se utilizó para medir el patrón de expresión génica por medio de microarreglos de expresión o para medir la expresión de ciertos genes por RT-PCR cuantitativo de tiempo real.

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

Para determinar si la proteína de soya en la dieta tiene efecto sobre la expresión génica y, por tanto, en la funcionalidad del tejido adiposo se midió la expresión de ciertos genes. Algunos de ellos se utilizaron para validar el microarreglo de expresión. Por ejemplo, se cuantificó la abundancia del mensajero de genes involucrados en el metabolismo de lípidos (SCD-1, FAS, HMG CoA reductasa, Applied Biosystems, Rn00594894, Rn00569117, Rn00565598), leptina (Applied Biosystems, Rn00565158) y genes del sistema renina angiotensina como Agt, ACE, AT1 y AT2 (Applied

Biosystems, Rn00593114, Rn01416296, Rn01435427 y Rn00560677_s1) usando un equipo de PCR tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). La técnica consiste en la obtención de ADN complementario a partir de ARN por medio de la acción de la transcriptasa reversa. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación de los genes mencionados utilizando el ADN complementario, la mezcla maestra (Applied Biosystems, 4304437) y los oligonucleótidos correspondientes. La mezcla se colocó en la placa termocicladora del sistema de detección mencionado. La detección se realizó utilizando sondas TaqMan para cada gen y para Hprt (Applied Biosystems Rn01527840) como control endógeno para normalizar los valores de expresión. Anteriormente, se realizó el rango dinámico de cada gen con el fin de conocer la concentración ideal de amplificación de los mismos.

Microarreglos de expresión

Para conocer la batería de genes que regula la proteína de soya en dieta, durante la obesidad, se utilizó la técnica de microarreglos de expresión. La intención de utilizar esta técnica fue conocer aquellos genes que podrían estar involucrados en la funcionalidad del tejido adiposo. El ARN de tres ratas por grupo se mezcló para preparar una muestra de 2.5 µg. Las cuatro muestras y su replicado técnico se hibridaron en arreglos de expresión (Affymetrix RAE 230 A). El ARN se convirtió en ADN complementario de una hebra por medio de la transcriptasa reversa Superscript II. La síntesis de la segunda hebra fue llevada a cabo por la ADN polimerasa T4, lo cual se siguió de transcripción in vitro utilizando dNTP's marcados con biotina para generar ARN complementario. Los productos de ARN complementario se fragmentaron en fracciones de 200 bases o menores; 15 µg del producto de fragmentación fueron adicionados al coctel de hibridación compuesto por 100 mM MES, 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20, 0.1 mg/ml of ADN de esperma y 0.5 mg/ml albúmina sérica bovina acetilada. Un volumen de 300 µl de la mezcla descrita fue calentado a 95°C e hibridados al arreglo por 16 horas a 45°C. Posteriormente, los arreglos se lavaron con amortiguadores de alta y baja astringencia que contenían 100 mM MES, 0.1 M NaCl y 6X SSPE, respectivamente y las muestras se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina. Para analizar las señales de fluorescencia de 15, 866 sondas se valió del aparato

GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA) y del sistema GCOS para obtener la intensidad de la señal y calidad de los datos del arreglo.

Análisis e interpretación de los datos de los microarreglos de expresión

El análisis de los datos incluyó dos procesos de normalización: normalización por cuantiles de los replicados técnicos y normalización por Loess. Para identificar los genes diferencialmente expresados se implementó un modelo lineal con acercamiento empírico de Bayes por medio del uso de los paquetes R y Limma [99, 100]. La selección de los genes modificados se basó en criterios estadísticos como el logaritmo de las posibilidades ≥ 3 y la jerarquización de los mismos por el logaritmo de las veces de inducción.

Las redes de interacciones biológicas de los genes regulados en los tejidos de los animales alimentados como se describió, se identificaron por medio del uso del programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Posteriormente, los valores de expression con significancia estadística se procesaron en el Programa R (<http://www.cran.r-project.org>) para su agrupamiento jerárquico.

Análisis histológico

Para evaluar las características morfológicas de los adipocitos provenientes del tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas según se explicó, se hizo un análisis histológico. Las muestras que habían sido almacenadas en formalina se trataron con solventes orgánicos para posteriormente ser embebidas en parafina. Los bloques se cortaron en secciones de cuatro micras de espesor utilizando un microtomo. Los mismos se posicionaron en un portaobjetos en donde la muestra fue desparafinada. La muestra fue, entonces, teñida con hematoxilina y eosina (colorantes catiónico y aniónico respectivamente) con el fin de evidenciar ADN y proteínas. Después, se determinó el área de los adipocitos, número y área de vasos sanguíneos usando un programa de análisis de imagen (Leica Q500-IW) adaptado a un microscopio (LeicaDMLS). Estos resultados se obtuvieron a partir de 10 datos de área en tres campos diferentes para cada laminilla o tejido de cada animal.

Cultivo de adipocitos

Con el objeto de conocer la activación de Akt y medir la liberación de hormonas y citocinas por adipocitos viscerales de ratas utilizadas en el estudio se prepararon

cultivos de adipocitos. Algunas de las ratas alimentadas con las dietas anteriormente mencionadas se anestesiaron para obtener aproximadamente 1g de tejido adiposo abdominal y epididimal. Para el aislamiento de las células se valió del método de Rodbell [101] con algunas modificaciones como se describe a continuación. El tejido adiposo se picó en amortiguador Krebs Ringer HEPES con adición del 2% albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (Roche, 10775835001). Se eliminó el amortiguador para posteriormente añadir 10 ml del mismo amortiguador complementado con 1.25 mg/ml de colagenasa tipo II (Roche) a 37° C con agitación a 100 ciclos/min durante 45 min.

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

Las células que quedaron en el paquete flotante se colectaron como adipocitos primarios, se contaron por el método de la gota colgante [102] y se sembraron 10⁵ células en cajas de Petri conteniendo 2 ml de medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062).

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

Determinación de la influencia de angiotensina II sobre la fosforilación de Akt.

Con el objeto de conocer la influencia de la proteína de soya sobre la señalización de insulina y el papel de la angiotensina sobre esta señalización, se determinó la fosforilación de Akt en los adipocitos de ratas tratadas. Las células se incubaron con angiotensina II (100 nM, Sigma, A9525) e insulina (10⁻⁷ M, Insuman, Aventis) y se recuperó la fracción que contiene proteínas para encontrar la proporción de Akt fosforilado en inmunoblots.

La extracción de proteínas se hizo por medio de la adición del amortiguador de lisis (Tritón 1%, NaCl 6.4 mM, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y 1 pastilla/ 10 ml de coctel de inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche

Diagnostics, 11 836 153 001)). El tratamiento de las células con dicho amortiguador se llevó a cabo a 4°C utilizando la pipeta para homogeneizar. Después de la centrifugación por 5 m a 4000 x g, se midió la concentración de proteína por el método de Lowry [103].

La separación de las proteínas se llevó a cabo por electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) y transferencia de proteínas a membranas de PVDF (polivinildifluoruro, Amersham, RPN 303 F) y su posterior bloqueo con leche descremada (BioRad, 170-6404) al 0.4%. Las membranas, entonces, fueron tratadas con anticuerpo primario (1: 250, 1:500 y 1: 1000) para Akt (Santa Cruz Biotechnology, conejo, sc8312), pAkt (Santa Cruz Biotechnology, conejo, sc7985-R) y tubulina (Santa Cruz Biotechnology, cabra, sc 7346), respectivamente. El anticuerpo secundario fue adicionado en una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-conejo o anti-cabra según la especie del anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology, sc2004 y sc2768). La detección de la proteína de interés se logró por medio de quimioluminiscencia a partir de reactivos de detección (Millipore, DAM 1482721). Las mismas membranas se utilizaron para la medición de las tres proteínas mencionadas valiéndose del amortiguador “stripping” o removedor. Por medio del programa Sigma Scan se obtuvieron tres veces los datos de área e intensidad de las bandas, estos datos se utilizaron para el cálculo de las unidades relativas de densidad de relacionadas con la concentración de proteína específica en cada muestra.

Medición de la concentración de adipocinas y hormonas en suero y medio de cultivo

Para el cumplimiento del objetivo que propone medir la liberación de adipocinas o presencia de adipocinas y hormonas en suero de ratas alimentadas según el grupo de estudio se utilizaron radioinmunoensayos comerciales. Así, la concentración de angiotensina I, angiotensina II fue determinada con radioinmunoensayos de Phoenix Pharmaceuticals, Inc Rk-002-01 y Rk-002-12. La concentración de leptina, TNF- α . IL-6 e insulina se determinó también por medio de un radioinmunoensayo que contiene un antígeno marcado radiactivamente Lincoplex (Millipore, RADPK-81K), así como la concentración de adiponectina (Millipore, RADPK-81K-ADPN).

Medición de la concentración de glicerol liberado por adipocitos en cultivo

La determinación de la concentración de glicerol se llevó a cabo según Yu y Zhu [104]. Los adipocitos en cultivo sin estímulo hormonal fueron utilizados para este propósito. El medio de cultivo se recolectó después de una hora y se midió la concentración de glicerol libre por medio de un ensayo colorimétrico (Trig/GB Roche Diagnostics).

Medición del contenido de triacilgliceroles y ADN en el tejido adiposo

El método de aislamiento y determinación de los triacilgliceroles y ADN se llevó a cabo conforme a Okuno [105]. Se pesaron 0.5 g de tejido adiposo y se congelaron a -70°C hasta el día de la extracción. Entonces, el tejido se descongeló y homogeneizó con el uso de un politrón en 10 mM de amortiguador Tris ajustado a pH 8.0 que contenía 150 mM de cloruro de sodio y 0.1% de tritón, calentado a 45°C . La solución homogeneizada resultante se utilizó para la determinación de triacilgliceroles por método colorimétrico (DiaSys, 1 5710 99 10 021). Un mililitro de la solución restante se incubó con una solución con SDS al 0,1%, proteínasa K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y EDTA (100 mM) a 37°C . Después de una hora de incubación, el ácido nucleico se extrajo por fenol-cloroformo y su concentración se midió por absorbencia a 260 nm.

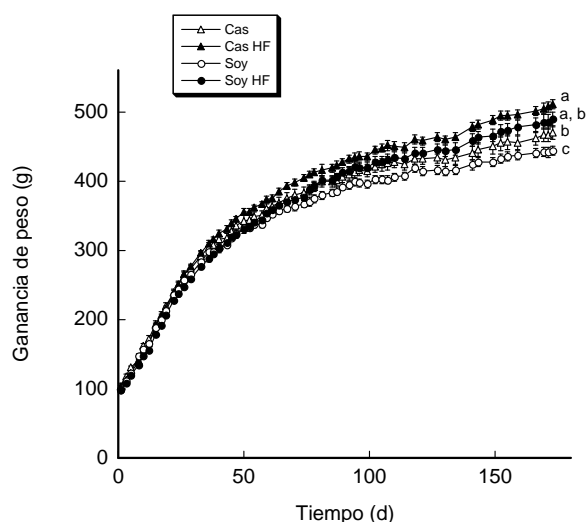
Análisis estadístico

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

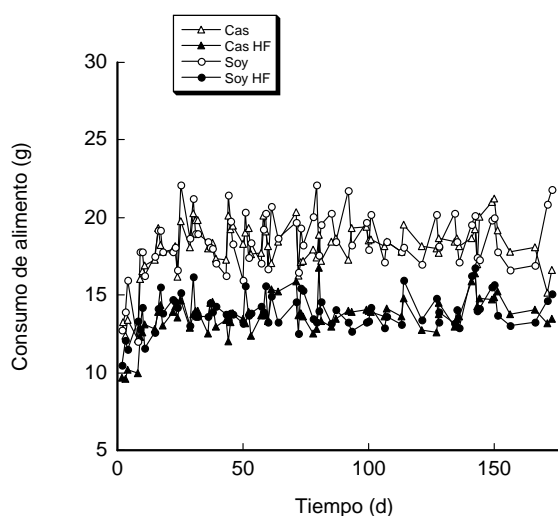
Resultados

1). Ganancia de peso, consumo de alimento, consumo de energía y peso del tejido adiposo retroperitoneal de las ratas alimentadas con diferente tipo de proteína y distinta concentración de lípidos.

De este juego de gráficas (gráficas 1-4) se puede notar el crecimiento lineal igual para todos los grupos antes de llegar a la edad adulta de los animales. En la etapa adulta, la diferencia de peso es relevante. Entonces, a pesar de que el consumo de alimento fue menor para los animales con dietas altas en grasa, la ganancia de peso fue mayor para dichos grupos, siendo el grupo que más peso ganó el que consumió caseína y alta concentración de lípidos. Esto sucedió independientemente del consumo energético, el cual resultó similar para todos los grupos. El peso del tejido adiposo retroperitoneal fue mayor para los animales alimentados con caseína y alta concentración de lípidos y tres veces menor para el grupo alimentado con proteína de soya. Esto quiere decir que la ganancia de peso coincide con un mayor tamaño del tejido adiposo visceral, fenómeno asociado con obesidad y riesgo al desarrollo de síndrome metabólico.

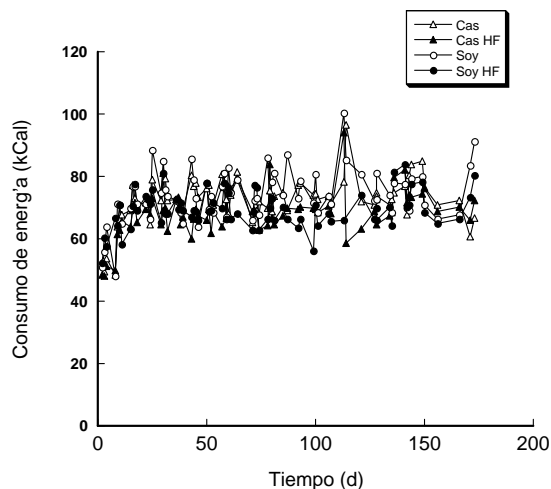


Gráfica 1. Ganancia de peso, n=15, a>b>c, p<0.05

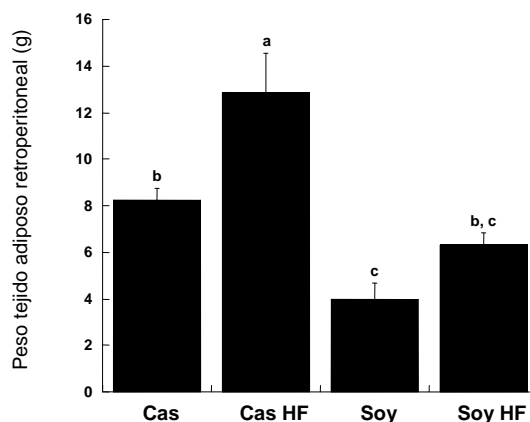


Gráfica 2. Consumo de alimento, n=15, p<0.05

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



Gráfica 3. Consumo de energía, n=15, a>b>c, p<0.05

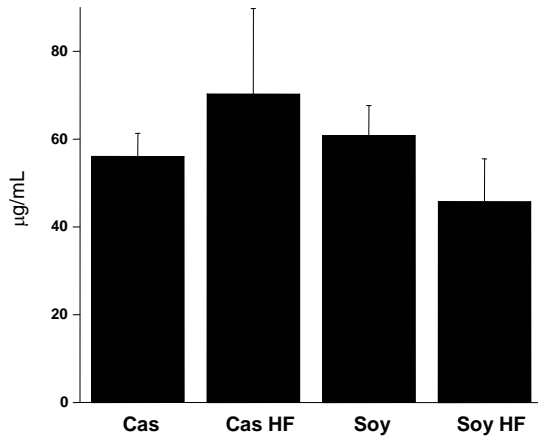


Gráfica 4. Peso del tejido adiposo retroperitoneal, n=15, a>b>c, p<0.05

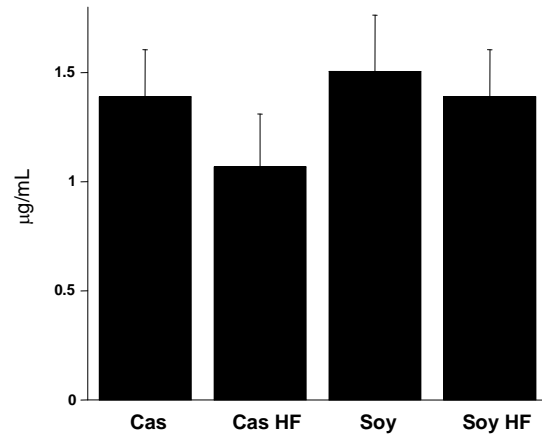
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas

2). Concentración de hormonas o adipocinas en suero o liberadas al medio de cultivo de adipocitos de ratas alimentadas con diferentes caseína o proteína de soya y 5 o 25% de lípidos.

La concentración de adiponectina en suero (gráfica 5) no alcanzó diferencias significativas aunque se nota que existe una tendencia a mayor concentración de la misma hormona en el suero de animales alimentados con caseína y 25% de lípidos. La adiponectina es la adipocina que se secreta en mayor proporción, por lo que la mayor concentración sérica de adiponectina podría ser reflejo de un mayor porcentaje de masa grasa en estos animales. De hecho, en el medio de cultivo, en el que se controla la cantidad de células adiposas, se observa una tendencia a menor liberación de adiponectina por parte de las células de animales alimentados con proteína de soya (gráfica 6).



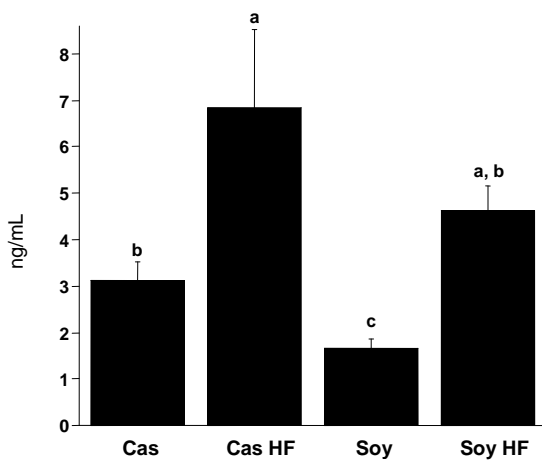
Gráfica 5. Concentración de adiponectina en suero, n=5



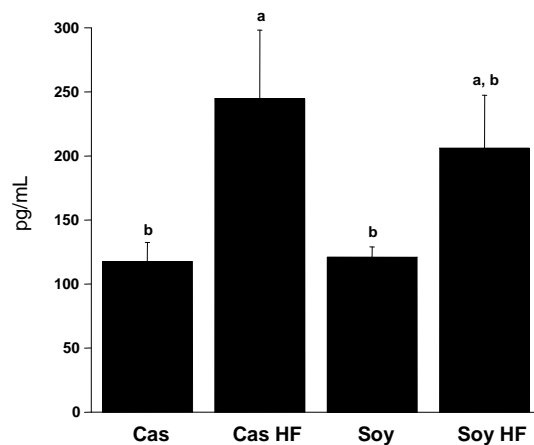
Gráfica 6. Concentración de adiponectina en el medio, n=5

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

Por su parte, la concentración de leptina en el suero (gráfica 7) de las ratas alimentadas con caseína y alta concentración de lípidos es mucho mayor que la leptina en el suero de las ratas alimentadas con proteína de soya. La concentración de leptina en suero se ha asociado con mayor liberación de la hormona (gráfica 8) y mayor expresión de la proteína en el tejido adiposo y con adiposidad, por lo que con estos resultados se justifica el modelo animal como un modelo de obesidad inducida por dieta.



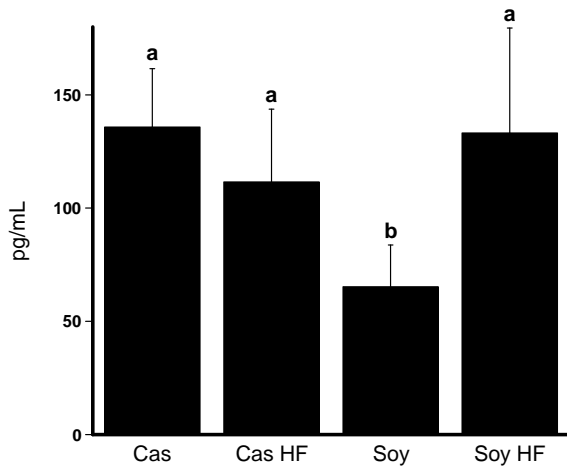
Gráfica 7. Concentración de leptina en suero, n=5, a>b>c, p<0.05



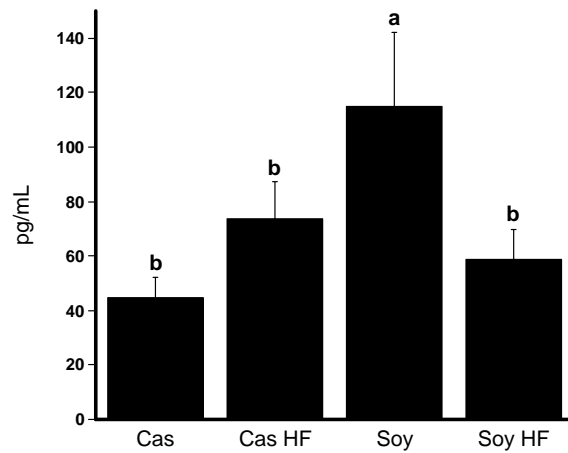
Gráfica 8. Concentración de leptina en el medio, n=5, a>b>c, p<0.05

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

Como se esperaba, la concentración sérica de interleucina-6 fue menor en los animales alimentados con caseína en comparación con aquellos alimentados con proteína de soya cuando la dieta lleva 5% de lípidos. Los adipocitos contribuyen de forma importante a la interleucina-6 total en el suero, pues una tercera parte [47] es producida por estas células. Esta citocina se ha relacionado con mayor liberación de ácidos grasos y resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Llama la atención que la concentración de la citocina en el medio de cultivo sea la opuesta a la sérica en los grupos de alimentación. Si el tejido adiposo es un órgano importante para la producción total de interleucina-6, como se mencionó, entonces los adipocitos en cultivo probablemente respondan a las altas concentraciones séricas de la citocina en el grupo alimentado con caseína para detener la secreción y recuperar las concentraciones normales de ésta (gráficas 9 y 10).



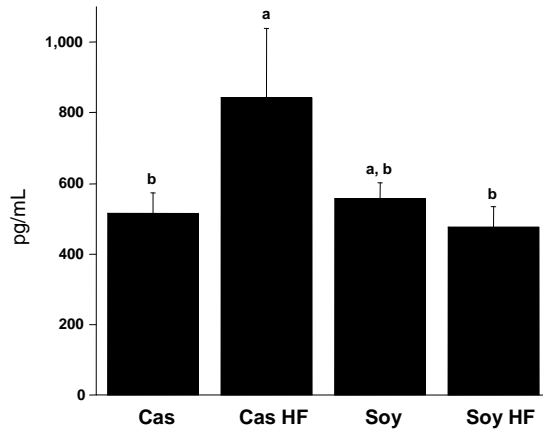
Gráfica 9. Concentración de IL-6 en suero, n=5, a>b, p<0.05



Gráfica 10. Concentración de IL-6 en el medio, n=5, a>b, p<0.05

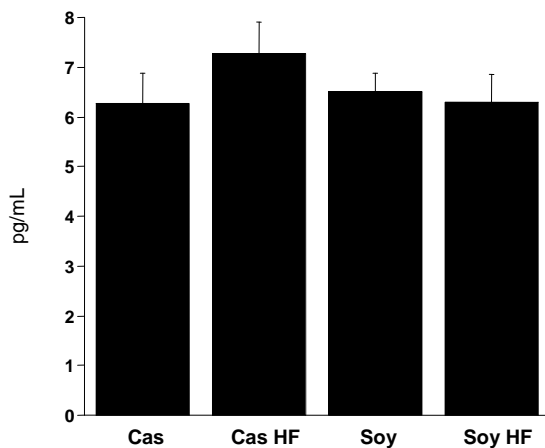
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas

Como se observa en la gráfica 11, existe mayor concentración de insulina en el suero de animales alimentados con caseína y 25% de lípidos comparado con el grupo de animales alimentados con soya y 25% de lípidos. La hiperinsulinemia se relaciona con menor sensibilidad a la insulina, por lo que los animales obesos podrían tener alteraciones metabólicas tales como la resistencia a la insulina.

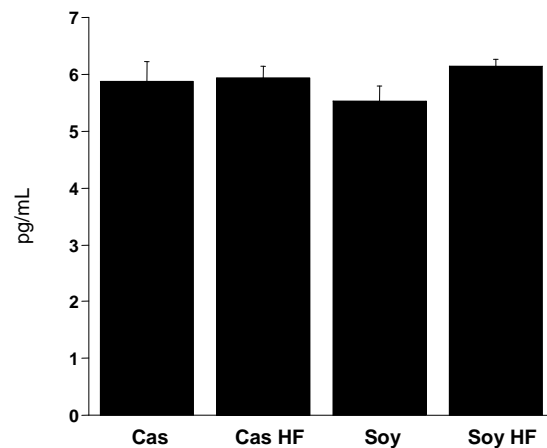


Gráfica 11. Concentración de insulina en suero, n=5, a>b, p<0.05

Otra adipocina que fue medida en suero y en el medio de cultivo de adipocitos fue TNF- α . En suero, la concentración de TNF- α no fue diferente entre los grupos. Esto quiere decir que no hubo una respuesta inflamatoria generalizada, dependiente de TNF- α en el modelo animal utilizado. En el medio de cultivo, la concentración de la citocina tampoco resultó significativamente distinta entre grupos de alimentación (gráficas 12 y 13).



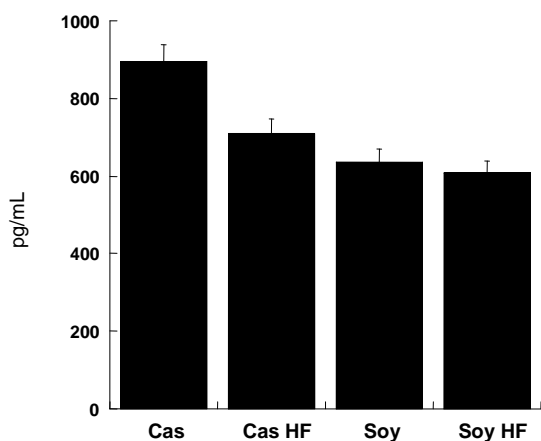
Gráfica 12. Concentración de TNF- α en suero, n=5



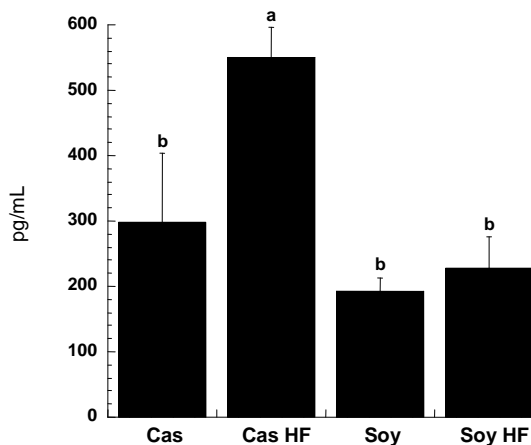
Gráfica 13. Concentración de TNF- α en el medio, n=5

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

La liberación de angiotensina I y II al medio de cultivo de adipocitos resultó distinta según el tipo de alimentación (gráficas 14-17). De hecho, las células de ratas alimentadas con proteína de soya liberan menor concentración de ambas hormonas comparadas con las células de ratas alimentadas con caseína cuando la alimentación se acompaña de alta concentración de lípidos. La concentración de angiotensina I y II en el suero no resultó diferente entre los grupos de alimentación, lo cual puede explicarse debido a que el hígado es el principal productor de dichas hormonas. En este modelo de obesidad, entonces, la síntesis de angiotensina I y II por parte del tejido adiposo no es suficiente para modificar las concentraciones circulantes de éstas.

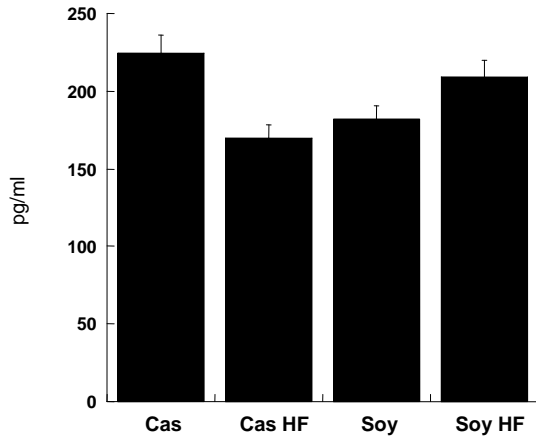


Gráfica 14. Concentración de angiotensina I en suero, n=5

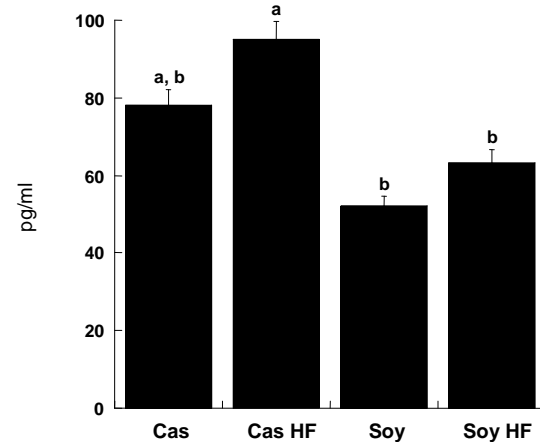


Gráfica 15. Concentración de angiotensina I en el medio, n=5, a>b, p<0.05

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



Gráfica 16. Concentración de angiotensina II en suero, n=5

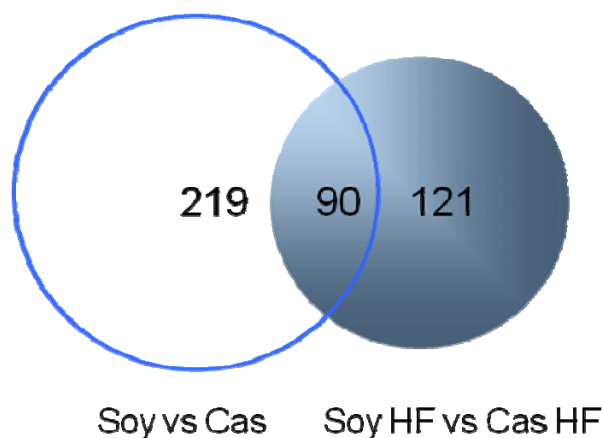


Gráfica 17. Concentración de angiotensina II en el medio, n=5, a>b, p<0.05

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

3). Patrón de expresión génica en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y distintas concentraciones de lípidos.

Los resultados del análisis de los microarreglos muestran que después del consumo de diferentes tipos de proteína, el patrón de expresión se modifica en el tejido adiposo. En el diagrama de Venn (gráfica 18) se muestra que la alimentación con proteína de soya y concentraciones normales de lípidos indujo el cambio en la expresión de 219 genes de los 14, 200 que detecta la técnica, en comparación con el grupo control o la alimentación con caseína. Cuando se contrastan los diferentes tipos de proteína bajo del consumo de altas concentraciones de grasa en la dieta se nota que se modificaron 121 genes. La intersección entre ambas comparaciones indica que el tipo de proteína en la dieta cambió la abundancia de 90 mensajeros. Quince de estos genes resultaron regulados negativamente y 75 positivamente.



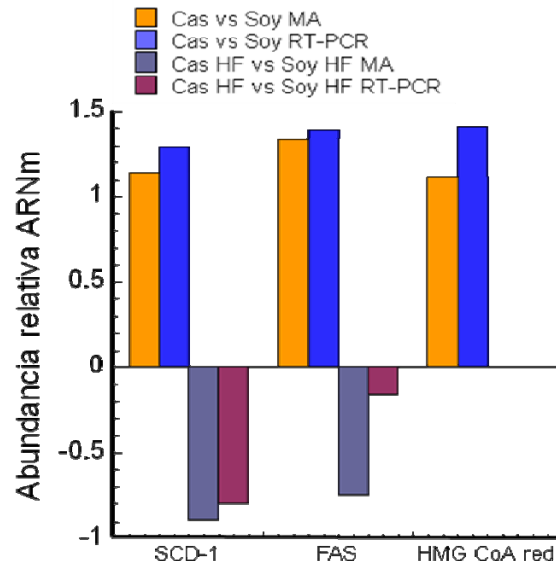
Gráfica 18. Diagrama de Venn indicando el número de genes diferencialmente expresados en el tejido adiposo retroperitoneal por el tipo de proteína en los microarreglos de expresión, n=3.

El agrupamiento jerárquico mostrado en la gráfica 20 de los genes diferencialmente expresados se muestra en mapa de calor. Con el objeto de validar los resultados de los microarreglos se utilizaron algunos genes como estearoil CoA desaturasa (SCD-1), la ácido grasos sintasa (FAS), la leptina y la hidroximetilglutaril CoA reductasa o HMG CoA reductasa y su medición por RT-PCR. La abundancia del mensajero de los genes comparte la misma tendencia entre el análisis de los microarreglos y el estándar de oro, el PCR (gráfica 19).

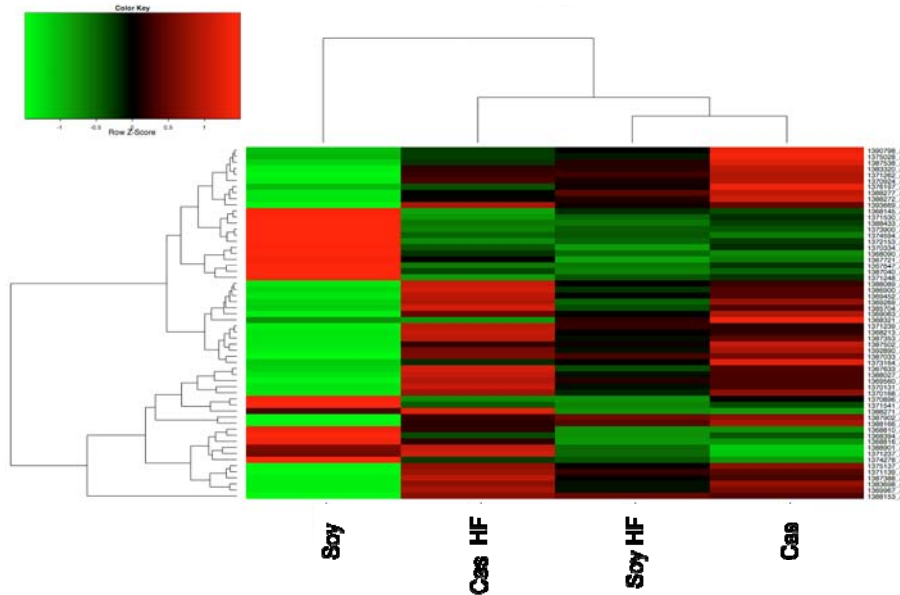
De los microarreglos de expresión se escogieron los genes diferencialmente expresados, y de éstos, aquéllos con actividad metabólica. En la siguiente tabla se despliegan dichos genes. El número de veces se refiere al número de veces de inducción de la expresión del gen, en donde el valor de 1 designa ningún cambio de expresión.

El cambio en la expresión génica nos da idea que el modelo de obesidad que hemos elegido trae cambios en la expresión de genes de enzimas metabólicas, especialmente, del metabolismo de lípidos y de hidratos de carbono. Así, podemos concluir que el patrón de expresión de genes metabólicos es diferente por el tipo de proteína y concentración de lípidos en la dieta. Además, de este cambio en la expresión, también se encontraron cambios en la expresión de genes de moléculas involucradas en

la respuesta inflamatoria, genes de adipocinas y genes del sistema renina angiotensina. Estos cambios se reflejan en la tabla 2, en donde se muestran los genes diferencialmente expresados que tienen relación con la funcionalidad del tejido adiposo.



Gráfica 19. Abundancia relativa de ARNm de algunos genes diferencialmente expresados en los microarreglos y validados por RT-PCR, n=3.



Gráfica 20. Mapa de calor que representa el agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados en los grupos de tratamientos dietarios, n=3

Tabla 2. Genes diferencialmente expresados por función biológica.

Gen	Cas vs Cas HF	Soy vs Soy HF	Cas HF vs Soy HF	Cas vs Soy
Sistema renina angiotensina y relacionados				
AGT			1.17	0.81
ACE		1.14		0.84
Agtr1a			1.13	
Agtr1b				0.91
Catepsina F, Z	0.85	1.33	1.14	1.16, 0.88
Adipocinas				
Apelina	0.85			
Leptina	0.49		1.16	1.13
Receptor de adiponectina		1.4		0.84
Receptor de leptina			0.92	
TNF 5			1.17	
TNFr 1, 5, 14	1.11	0.76	1.38	1.51, 1.23
Metabolismo de los ácidos grasos				
Acetil CoA aciltransferasa	0.72		1.44	
Acetil CoA carboxilasa alfa	1.98		0.69	
Acetil CoA deshidrogenasa, cadena larga		1.2		
Acetil CoA sintetasa	1.21			
Acil CoA deshidrogenasa, cadena muy larga				1.15
Enzima málica	1.42			
FAS	2.17		0.74	1.34
Glicerol-3-fosfato aciltransferasa, mitocondrial		0.89		1.14
Lipasa sensible a hormonas	0.7		1.52	
SREBF 1			1.27	
Carnitina aciltransferasa		1.17		
CPT 2			1.11	
Desaturasa 3 de los ácidos grasos	0.7		1.44	
Enoil CoA hidratasa/3-hidroxiacil CoA deshid				1.14
SCD 1	1.29		0.89	
SCD 2		0.88		0.82
UCP-1		0.59		1.8
Metabolismo del colesterol				
ABCG-1	0.86		1.28	
HidroximetilglutarilCoA reductasa	1.17			1.12
HidroximetilglutarilCoA sintetasa	0.88	1.34		0.87
Mevalonato cinasa	0.9			
Oxyesterol binding protein-like 11		1.2	1.23	0.81
SREBF 2		1.28		
Sterol O-acyltransferase 1	0.91			
VLDLr			1.24	1.14
Significancia en el adipocito				
Adipocyte specific adhesion molecule	1.35			
Adipose differentiation related protein	0.78		1.28	0.75

Albúmina			0.73	
CCAAT enhancer binding prot alpha	0.76		1.35	
CCAAT enhancer binding prot beta		1.71		
CCAAT enhancer binding prot delta			1.14	
CCAAT enhancer binding prot gamma			1.11	1.18
CREB 1	0.87			
Fatty acid binding protein 1, liver	1.1			
Fatty acid binding protein 3	0.5	0.6		1.5
Fatty acid binding protein 4, adipocyte	0.85		1.15	
Fatty acid binding protein 5, epidermal	0.78		1.25	
INSIG-1	0.67	0.84	1.37	
Malato deshidrogenasa			1.24	
Metaloproteasa de matriz extracelular 13		0.92		
Metaloproteasa de matriz extracelular 2			1.2	
Metaloproteasa de matriz extracelular 9		0.9		
Perilipinas	1.1			
Prostaciclina sintasa		1.18		
Receptor 3 de prostaglandina E	0.21		0.9	
Receptor 4 de prostaglandina E				1.16
Retinol binding protein 4, plasma	1.4			
Inhibidor tisular de metaloproteasas 1	0.84		1.23	
Inhibidor tisular de metaloproteasas 2			1.26	

Inflamación

Receptor para interferon γ 1	0.9			
Interleucina 11			0.92	
Interleucina 16				1.3
Interleucina 18				1.19

Señalización

SOCS 7	1.14		1.13	
STAT 3	1.11			
STAT 5		1.1		
Adenilil ciclasa 6	0.77			
Inositol 1, 4, 5-trisfosfato 3-cinasa B	0.9			
IRS 2	1.21			
IRS 3		1.43		0.72
PI3K subunidad regulat 1			1.35	1.14
PKA alfa 1, subunidad catalítica	0.88			
Sustrato 1 de AKT				0.78

Metabolismo de hidratos de carbono

6-fosfofructo-2 cinasa	0.49		0.94	1.29
Aconitasa		0.86		
Citrato sintasa		0.78	1.21	1.45
Fosfoenolpiruvato carboxicinas, mitocondrial		1.19		
Fosfofructocinasa		1.18		
Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa			1.4	
Glicerol-3 fosfato deshidrogenasa	0.68		1.59	2.99
Hexocinasa 1		0.66	1.36	1.85

Hexocinasa 2	0.8	0.91	1.25	
Fosforilasa del glucógeno				1.16
Malato deshidrogenasa			1.24	
NADH deshidrogenasa	0.87		1.36	
Piruvato carboxilasa			1.28	
Piruvato deshidrogenasa	1.15			1.7
Succinato deshidrogenasa, subunidad C				1.16

Apoptosis, proliferación celular

Caspasa 2	0.9	1.25	1.14	
Caspasa 3	0.86		1.18	
Kruppel-like factor 15	0.81			
Kruppel-like factor 4		1.18		0.89
Kruppel-like factor 5		1.15	1.19	0.84
Kruppel-like factor 6			1.34	1.3
Kruppel-like factor 9	0.77			

Otros

Brain and reproductive organ-expressed prot	0.91			
Caveolina		0.56		
Receptor de estrógenos 1	0.89			
Toll like receptor 4	1.14			
Glutación sintetasa		1.23		

Por medio del análisis de los microarreglos se exploraron las redes de interacciones biológicas potenciales activadas en el tejido adiposo utilizando el software Ingenuity Pathways Analysis (Figura 4). Para la comparación de genes modificados en el tejido adiposo de ratas alimentadas con proteína de soya o caseína y concentraciones adecuadas de lípidos se tomaron en cuenta 341 genes, obteniendo un score de 14 ($p < 0.05$). Posteriormente, se analizaron las posibles interacciones entre los grupos alimentados con alta concentración de lípidos, usando 303 genes con un score de 11 ($p < 0.05$). Para comparar al grupo que consumió proteína de soya y aquél que se alimentó con proteína de soya y 25% de lípidos, y al grupo que consumió caseína y al que se alimentó con caseína y 25% de lípidos se utilizaron 711 y 225 genes con scores de 9 y 22, respectivamente. En dichas comparaciones la leptina se muestra como un nodo central (conectado o relacionado a un mayor número de genes), indicando su importancia en el modelo de obesidad. La expresión de leptina se reduce después de la alimentación con proteína de soya y se aumenta al consumir altas concentraciones de lípidos. De hecho, la expresión de leptina por RT-PCR confirma los datos de los microarreglos, pues en la gráfica 21 observamos la expresión de leptina incrementada dos veces en el grupo Cas HF en comparación con el grupo Soy HF. También, la alta

concentración de lípidos en la dieta aumenta de forma significativa la abundancia del mensajero de leptina por RT-PCR.

Las redes también muestran una relación importante entre el cambio en la expresión de leptina y cambio en la expresión de moléculas involucradas en el metabolismo de lípidos. Así, cuando la expresión de leptina disminuye en respuesta al consumo de proteína de soya al comparar a los grupos Soy y Cas, se nota un aumento en la expresión de la acil coenzima A carboxilasa alfa; y la expresión tipo 1 del receptor para angiotensina se disminuye. Las comparaciones entre las distintas concentraciones de lípidos en la dieta, como se explicó, dan información sobre la alta concentración de lípidos causante de una mayor expresión de leptina en el tejido adiposo. Esto se relaciona con menor abundancia de los mensajeros acil coenzima A carboxilasa alfa y la ácido graso sintasa en ambos grupos alimentados con mayores concentraciones de lípidos.

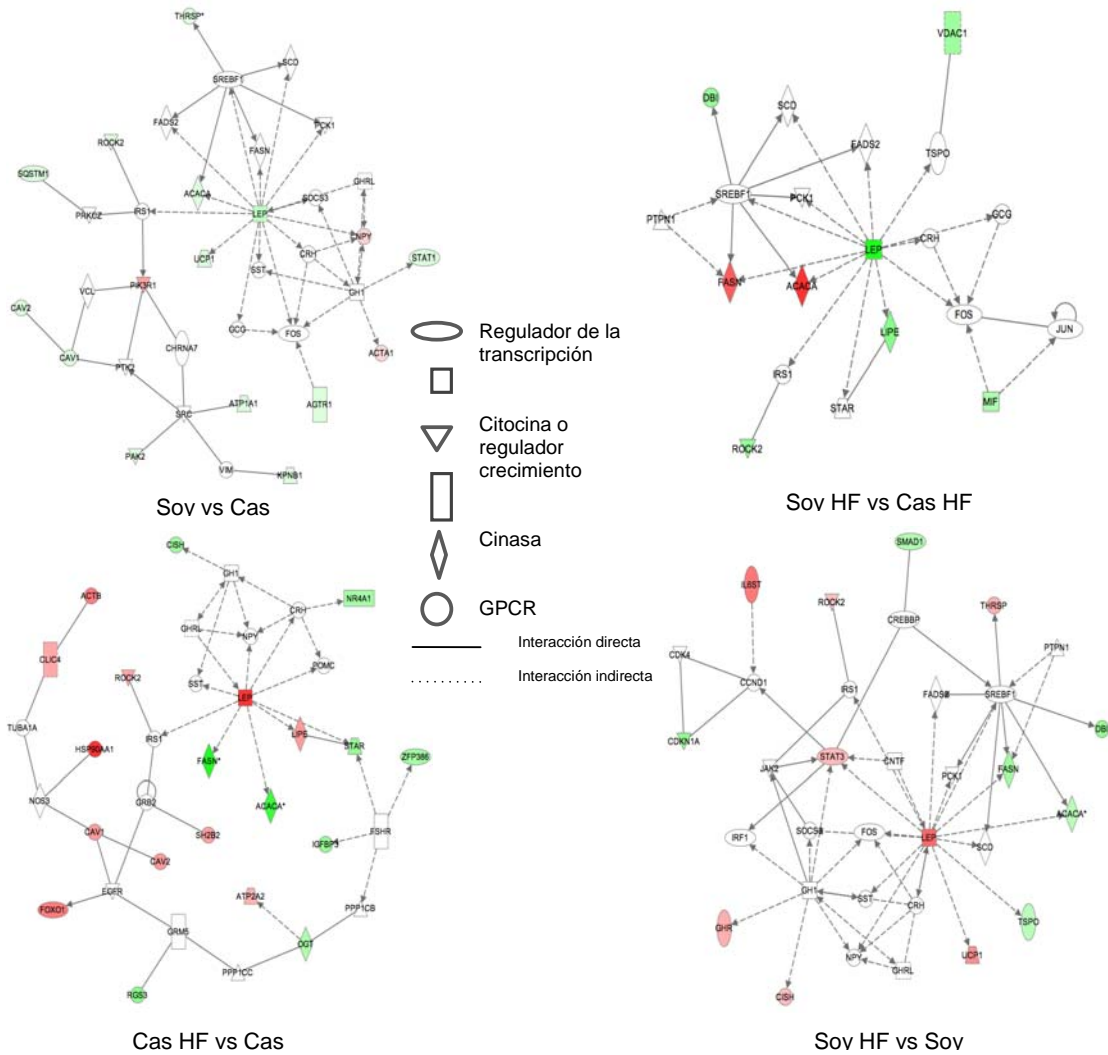
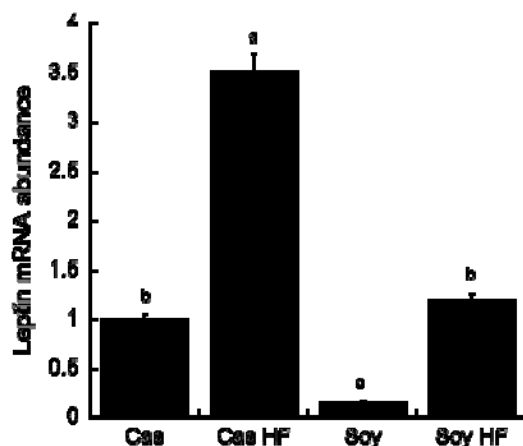


Figura 4. Vías de interacciones biológicas utilizando genes diferencialmente expresados en las diferentes alimentaciones, n=3. El color ● - denota menor inducción; el color ● - mayor inducción.



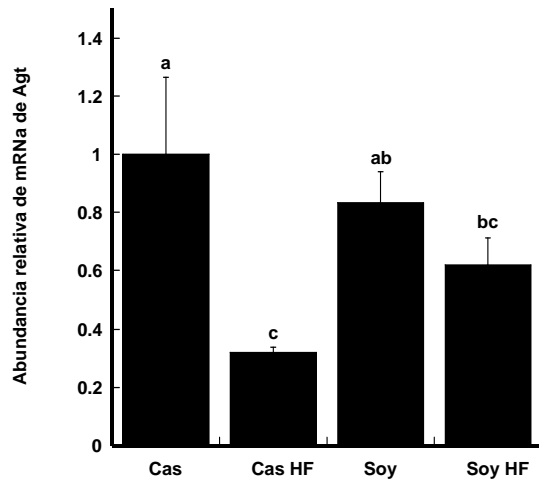
Gráfica 21. Abundancia relativa de ARNm de leptina en tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b>c, p<0.05

4). Expresión de genes involucrados en el sistema renina-angiotensina como el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina y los receptores AT1 y AT2 en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y distintas concentraciones de lípidos.

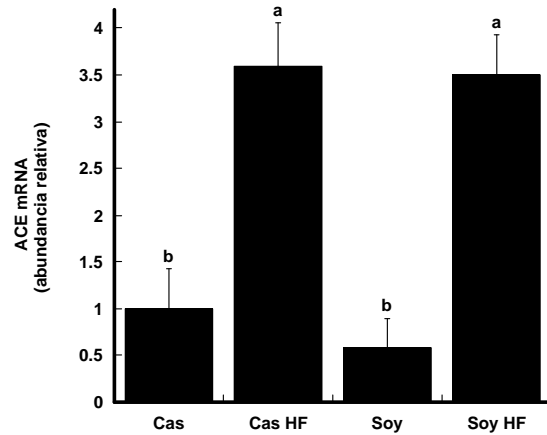
A pesar de que el tejido adiposo del grupo que fue alimentado con caseína y 25% de lípidos expresó tres veces menos angiotensinógeno (gráfica 22) que el grupo control [14] y también menos que el grupo Soy, la expresión del gen de la enzima convertidora de angiotensina (gráfica 23) fue mucho mayor para los grupos que fueron alimentados con un porcentaje normal de lípidos. Esto quiere decir que, probablemente, haya mayor producción de angiotensina II por parte del tejido adiposo de ratas a las que se les alimentó con alta concentración de grasa.

En cuanto a los receptores para angiotensina, la isoforma 1 (AT1) sería la responsable de los eventos que queremos demostrar, es decir, de la falla en la señalización de la insulina, pues en otros tipos celulares lo mismo sucede por medio de AT1. Además, la función de vasoconstricción, entre otras, la da el AT1. Por estas razones, resulta interesante notar que la expresión de AT1 (gráfica 24) es mayor en el tejido adiposo de ratas que consumieron caseína con respecto a aquellas que consumieron proteína de soya y bajas concentraciones de lípidos.

La expresión del receptor AT2 (gráfica 25), no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo, existe una tendencia a mayor abundancia del mensjero de AT2 en el tejido adiposo de ratas alimentadas con proteína de soya. Lo anterior tendría relevancia fisiológica, pues este receptor tiene funciones contrarias u opuestas al receptor AT1.

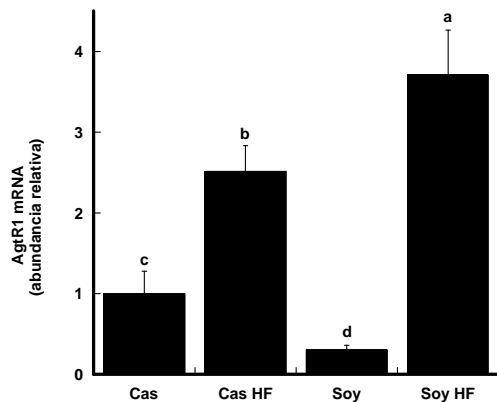


Gráfica 22. Abundancia de ARNm de angiotensinógeno, $a>b>c$, $p<0.05$

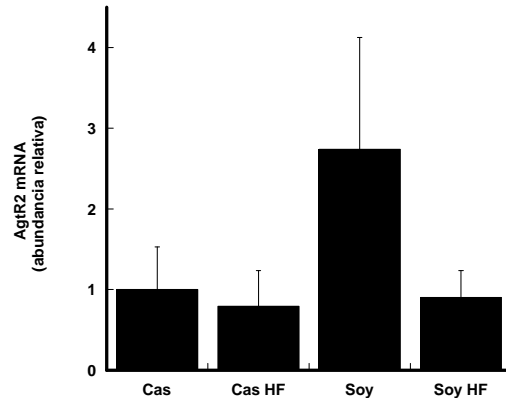


Gráfica 23. Abundancia de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina, $n=5$, $a>b$, $p<0.05$

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



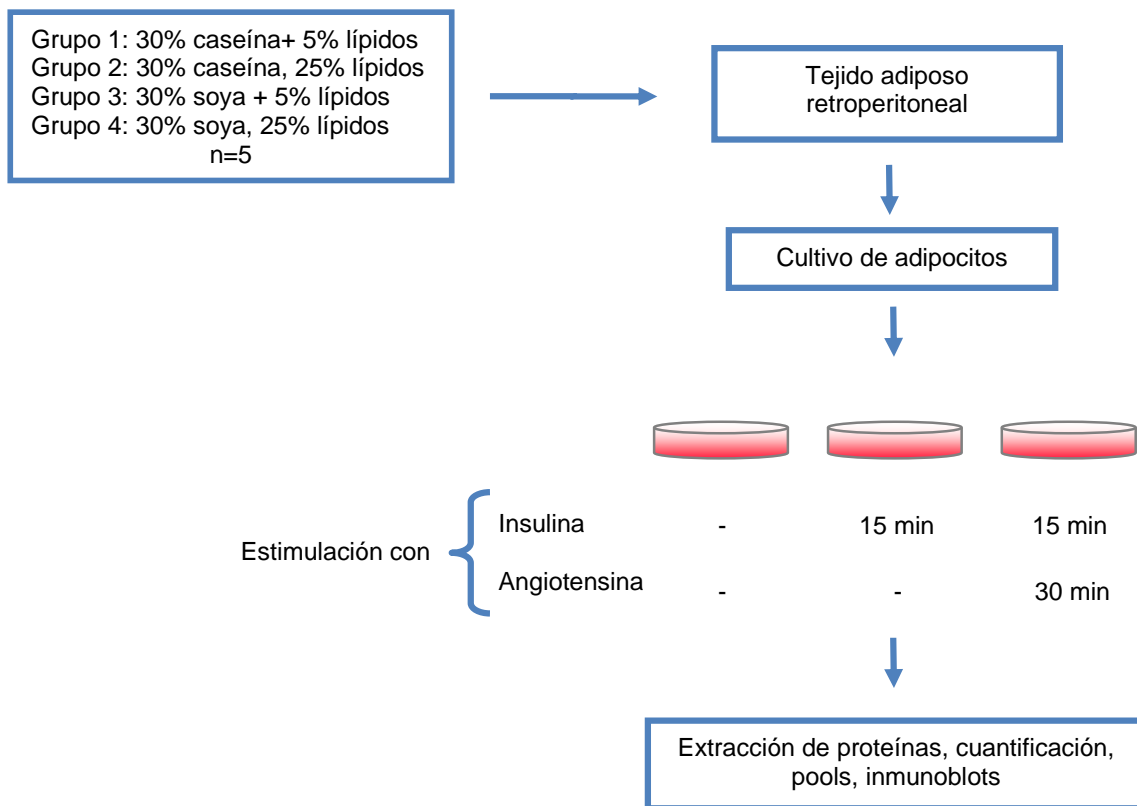
Gráfica 24. Abundancia de ARNm del receptor 1 para angiotensina, $a>b>c>d$, $p<0.05$

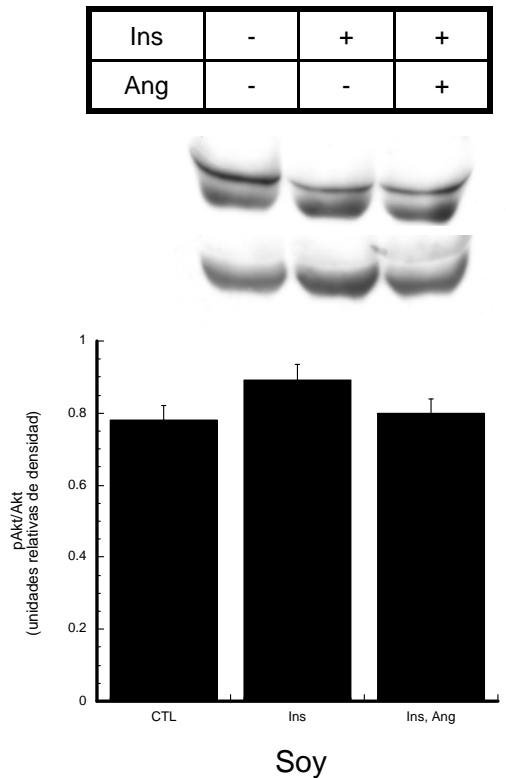
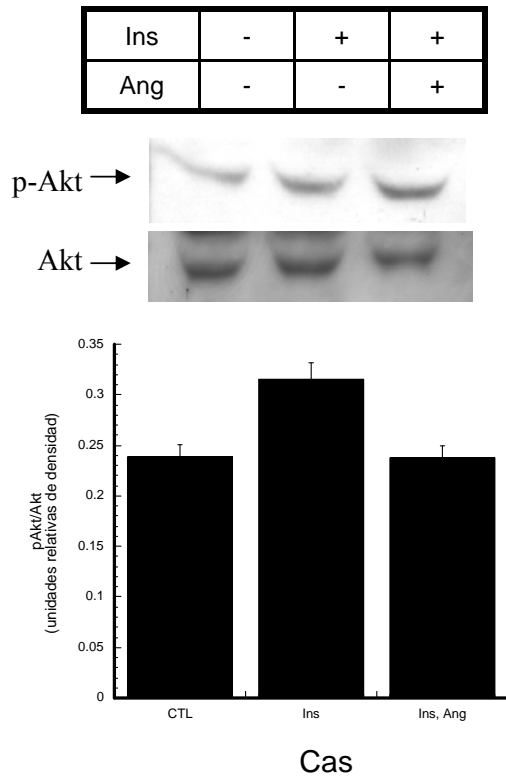


Gráfica 25. Abundancia de ARNm del receptor 2 para angiotensina, $n=5$

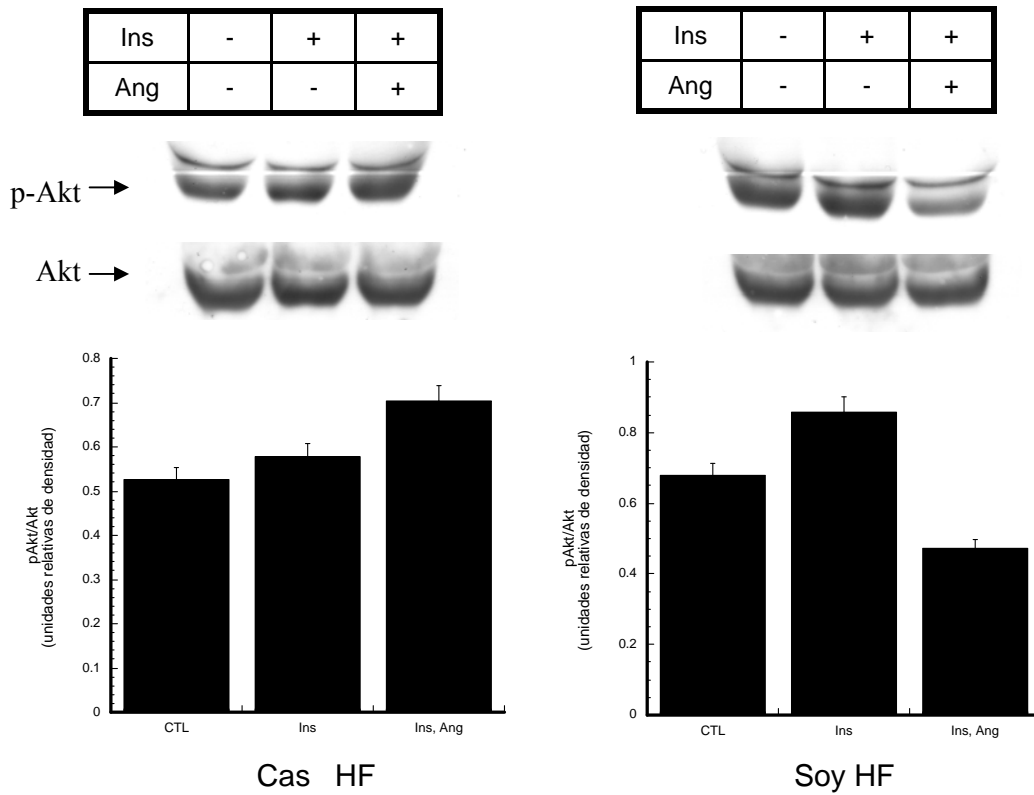
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas

5). Fosforilación de Akt en cultivos de adipocitos de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y distintas concentraciones de lípidos en respuesta a la insulina o al estímulo con insulina y angiotensina. Para determinar la presencia de Akt fosforilado, se obtuvo proteína de homogenados celulares luego de la estimulación hormonal como se muestra en el siguiente diagrama:

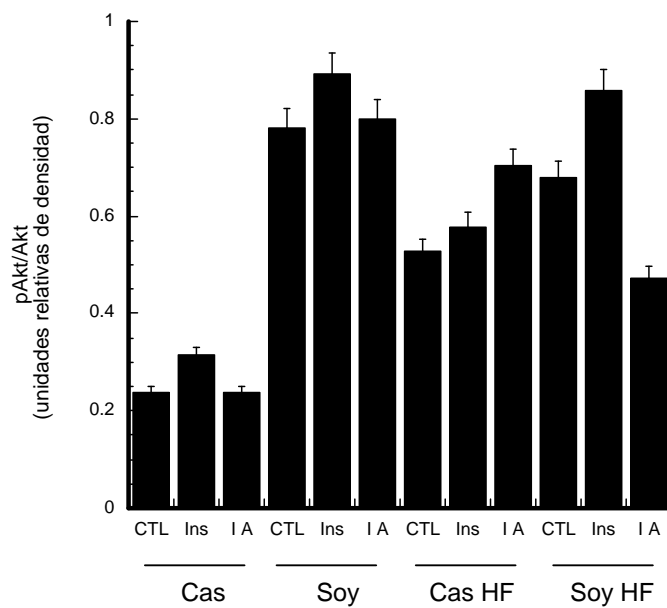




Gráficas 26 y 27. Presencia de AKT fosforilado en 100 µg de proteína de 5 millones de células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con Cas o Soy. Las concentraciones de insulina y angiotensina fueron 10^{-7} M y 100 nM respectivamente, en todos los casos, n=5.



Gráficas 28 y 29. Presencia de AKT fosforilado en 100 µg de proteína de 5 millones de células estimuladas con insulina o insulina y angiotensina o sin estimulación de animales alimentados con Cas HF o Soy HF. Las concentraciones de insulina y angiotensina fueron 10^{-7} M y 100 nM respectivamente, en todos los casos, n=5.



Gráfica 30. Presencia de AKT fosforilado en células estimuladas provenientes de todos los grupos dietarios, n=5

En las últimas figuras se muestra que la alimentación tiene efecto sobre la señalización de la insulina y su relación con la estimulación con angiotensina. En cuanto a la fosforilación de Akt en células de animales alimentados con caseína y proteína de soya, se nota que ésta alcanza los valores máximos cuando éstas se estimulan con insulina, como se esperaba (gráficas 26 y 27). Para las células adiposas de estos mismos animales, el máximo estado de fosforilación que se alcanza en los adipocitos estimulados con insulina, se revierte en respuesta al estímulo con angiotensina. Así, la angiotensina, disminuye de forma significativa o a niveles basales la fosforilación de Akt por insulina.

Cuando el consumo de lípidos excede la concentración normal en la alimentación con caseína como tipo de proteína (gráfica 28), llama la atención que la fosforilación de Akt sea mayor luego de la adición de angiotensina que tras el estímulo con insulina. En este caso, en células de animales obesos la angiotensina exagera los efectos de la insulina. En cuanto a los efectos de la angiotensina en adipocitos de animales alimentados con proteína de soya y alta concentración de lípidos (gráfica 29), éstos son comparables a los efectos que tiene la hormona sobre células de animales alimentados con 5% de lípidos. Es decir, en este grupo la angiotensina revierte los efectos de la insulina disminuyendo el estado de fosforilación de Akt hasta valores ligeramente por debajo del basal.

Si se comparan las escalas de densidad de las relaciones entre p-Akt y Akt, se nota que la proteína de soya alcanza valores mayores que la caseína, por lo que se concluye de la gráfica 30 que el consumo de proteína de soya tiene influencia positiva sobre la sensibilidad a la insulina. La alimentación con alta concentración de lípidos aumentó la fosforilación de Akt en el caso de las células de ratas alimentadas con caseína y se mantuvo en células de ratas alimentadas con proteína de soya.

6). Determinación del área de los adipocitos, celularidad por medio de la concentración de triacilgliceroles y ADN y presencia de vasos sanguíneos en el tejido adiposo retroperitoneal de de ratas alimentadas con diferentes tipos de proteína y distintas concentraciones de lípidos.

Las micrografías en la figura 5 muestran diferencias importantes, las cuales se confirman mediante la gráfica siguiente. Se nota que los adipocitos más pequeños resultaron los provenientes de ratas alimentadas con proteína de soya y los más grandes aquellos de ratas alimentadas con caseína y alta concentración de lípidos. De hecho, el análisis cuantitativo revela que el área de los adipocitos del tejido adiposo de las ratas de los grupos Cas HF y Soy HF está incrementado 46 y 52% con respecto a los grupos controles. Además, los adipocitos de ratas alimentadas con Soy HF son 50% más pequeños que aquellos provenientes de ratas alimentadas con Cas HF (gráfica 31).

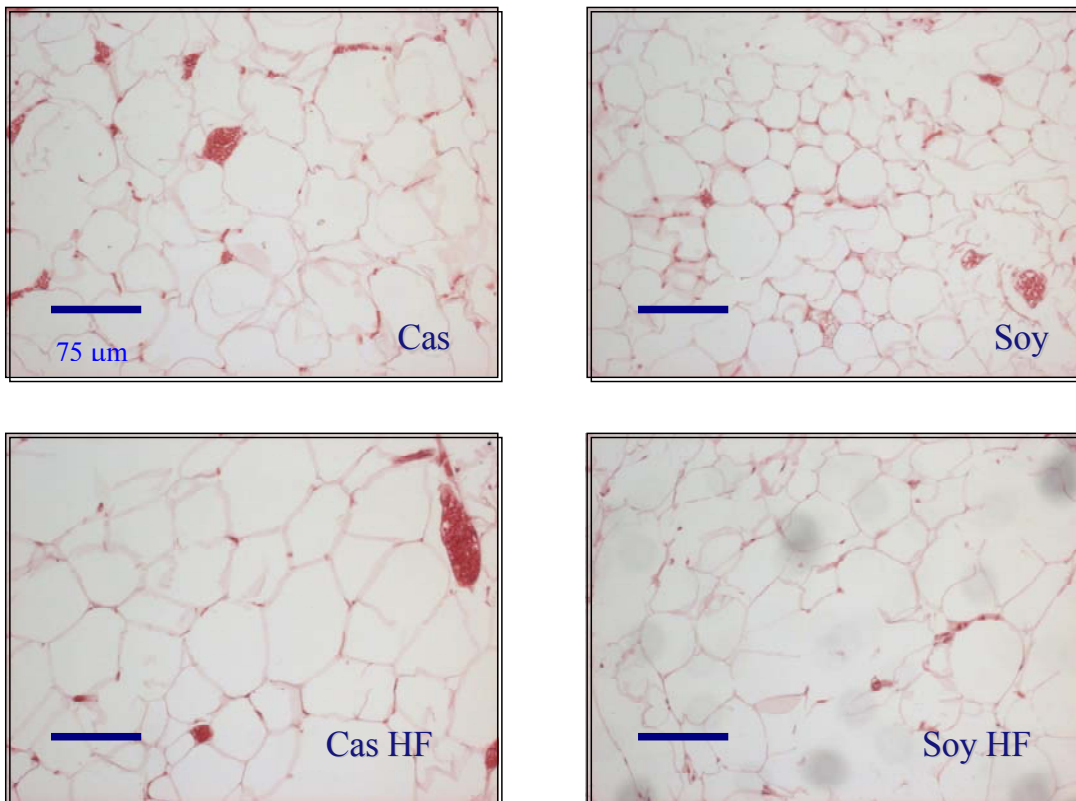
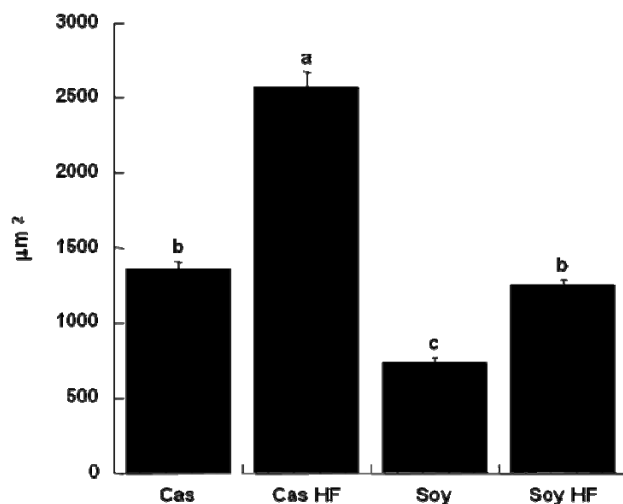
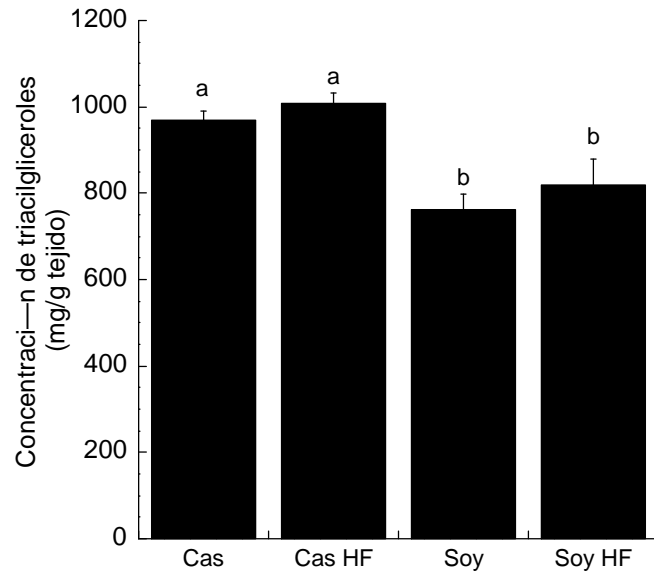


Figura 5. Micrografías ópticas representativas del tejido adiposo retroperitoneal de ratas alimentadas con caseína o soya y con distintas concentraciones de lípidos.



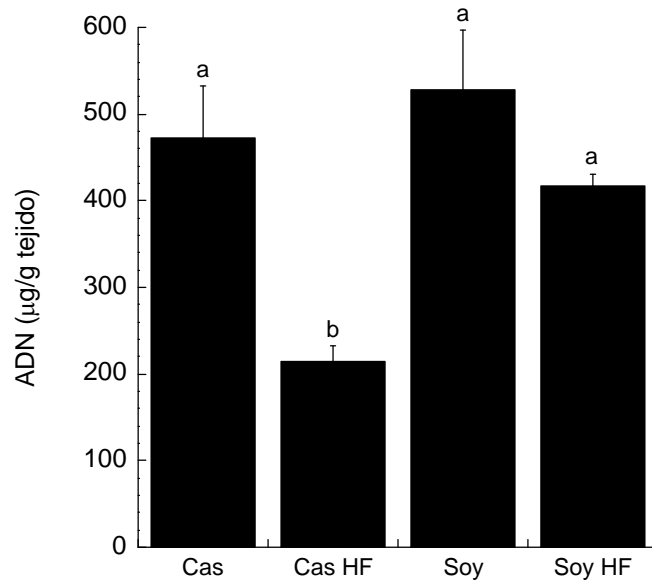
Gráfica 31. Área de adipocitos provenientes del tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b>c, p<0.05

El tejido adiposo de ratas alimentadas con caseína (Cas y Cas HF) contiene mayores concentraciones de triacilgliceroles por gramo de tejido que el tejido adiposo de ratas alimentadas con proteína de soya (Soy y Soy HF), lo cual se muestra en la gráfica 32. De forma muy interesante, el contenido de ADN en el tejido adiposo de los animales alimentados con Cas y Soy resultó mayor que el del grupo Cas HF con diferencias significativas entre el grupo Cas HF y Soy HF (gráfica 33). Así, la relación triacilgliceroles/ADN (gráfica 34) es dos veces mayor en el grupo Cas HF en comparación con el grupo Soy HF y, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre los grupos Cas y Soy, existe una tendencia a una menor relación en el grupo que consumió proteína de soya. Entonces, la diferencia observada en el área de las células adiposas no sólo se debe a un aumento en el contenido de triacilglicéridos, sino a un cambio en la celularidad entre los tejidos de ratas alimentadas con Cas HF y Soy HF.



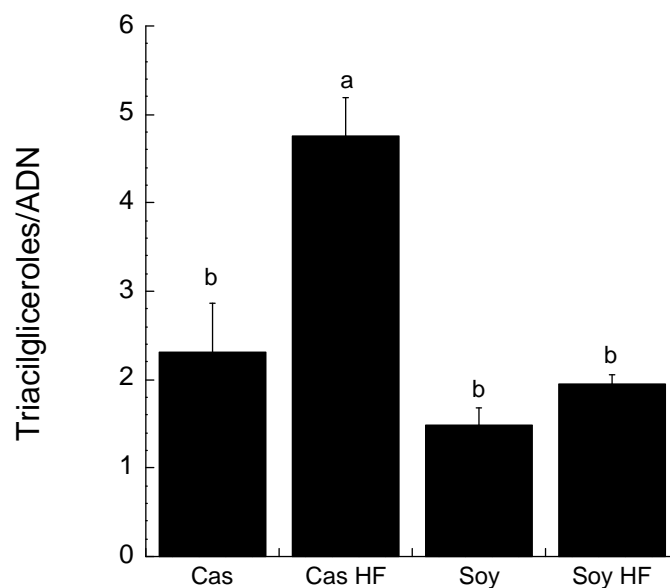
Gráfica 32. Concentración de triacilgliceroles en el tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b, p<0.05

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



Gráfica 33. Concentración de ADN en el tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b, p<0.05

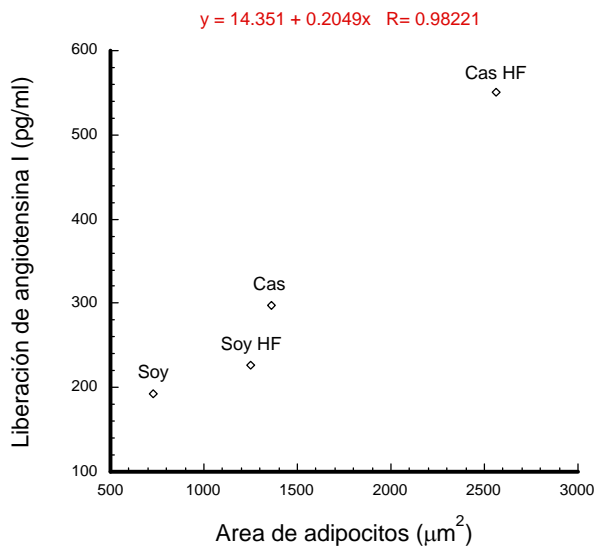
Los valores se expresan como promedios +/- el error estándar de la media.
Las letras distintas designan diferencias estadísticamente significativas



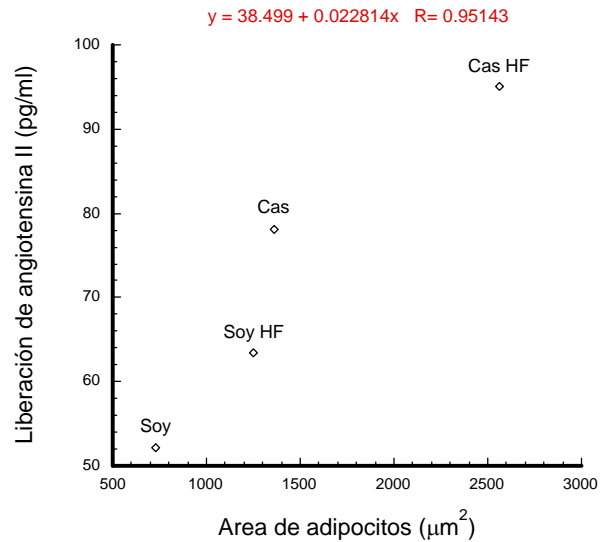
Gráfica 34. Relación triacilglicerolos/ADN en el tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b, p<0.05

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

También, se logró correlacionar el tamaño de los adipocitos con la liberación de angiotensina I y angiotensina II (gráficas 35 y 36). Existe, entonces, una relación directa entre el tamaño de los adipocitos y la liberación de angiotensina I y la hormona efectora. Como la secreción de leptina, la liberación de angiotensina por adipocitos viscerales se incrementa en el presente modelo de obesidad conforme al mayor área de las células adiposas.



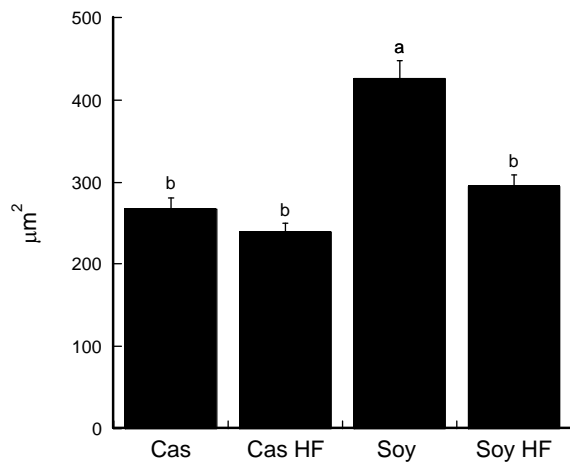
Gráfica 35. Correlación entre el área de adipocitos y liberación de angiotensina I al medio, n=3



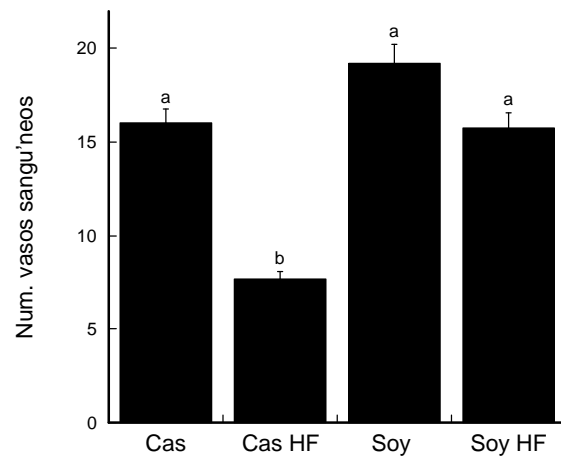
Gráfica 36. Correlación entre el área de adipocitos y liberación de angiotensina II al medio, n=3.

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

En las últimas gráficas (37 y 38) se obtuvieron datos acerca del número y área de los vasos sanguíneos en el tejido adiposo retroperitoneal de ratas bajo los distintos tratamientos dietarios. Existe mayor área de vasos sanguíneos en un 37% en el grupo alimentado con proteína de soya al compararla con el grupo alimentado con caseína. En cuanto al número de vasos sanguíneos, éste resultó 2 veces mayor en el tejido adiposo de ratas alimentadas con proteína de soya y 25% de lípidos en comparación con el grupo Cas HF. Estos resultados sugieren que el consumo de proteína de soya modifica los procesos angiogénicos manteniendo la vascularización del tejido adiposo.



Gráfica 37. Area de los vasos sanguíneos del tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b, p<0.05



Gráfica 38. Número de vasos sanguíneos en el tejido adiposo retroperitoneal, n=3, a>b, p<0.05

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

Discusión

En los últimos años se ha establecido que el adipocito tiene un papel fundamental en el manejo del exceso energético para prevenir acumulación de lípidos en tejidos no adiposos que no tienen la función de almacenar energía como hígado, corazón y páncreas. Dicha función propia del tejido adiposo se logra almacenando el exceso de lípidos dentro de la vacuola lipídica del adipocito o bien, sintetizando ácidos grasos a partir del exceso de glucosa. Además, como se comentó, los adipocitos liberan adipocinas que promueven la oxidación de ácidos grasos en órganos no adiposos por medio de la acción de la leptina, principalmente [106, 107]. Cuando los mecanismos anteriormente descritos se alteran, como ocurre durante el desarrollo de obesidad, los ácidos grasos son liberados en grandes cantidades desde el tejido adiposo, fenómeno que ha sido asociado a la resistencia a la leptina y lipotoxicidad [33].

El establecimiento de la obesidad se relaciona con el consumo exagerado de hidratos de carbono y lípidos [108-110]. Sin embargo, existen pocos estudios que intentan esclarecer los efectos de la proteína en la dieta y su relación con la obesidad. Algunos estudios previos han demostrado que la proteína de soya participa en la regulación del metabolismo de lípidos en el hígado por medio del factor de transcripción SREBP-1 [111] limitando el proceso lipogénico en el hígado y la concentración de ácidos grasos libres circulantes [112, 113]. También, nuestro grupo ha demostrado que la concentración de triacilglicerolos en el suero de animales alimentados con proteína de soya es menor que en animales alimentados con caseína. Estas evidencias sugieren que la proteína de soya podría tener influencia sobre la función y metabolismo del tejido adiposo.

Los resultados del presente trabajo demuestran que el consumo de la proteína de soya promueve menor ganancia de peso y menor peso del tejido adiposo retroperitoneal, a pesar de que no se observaron cambios en el consumo de energía. También, los animales alimentados con proteína de soya mantienen menores concentraciones circulantes de leptina, IL-6 e insulina que los animales alimentados con caseína. Los mecanismos por los cuales el consumo de proteína de soya induce cambios en las concentraciones de dichas hormonas en el suero no están bien descritos. Sin embargo,

nuestro grupo ha demostrado que el tratamiento dietario con proteína de soya disminuye la secreción de insulina por las células β del páncreas en comparación con el tratamiento con caseína como proteína control. Posiblemente la menor secreción de insulina esté dada por cambios en la expresión de Glut-2, disminuyendo la entrada de glucosa y teniendo como consecuencia menor secreción de la hormona [84]. También, la leptina tiene influencia sobre la síntesis y secreción de insulina por medio de modificaciones a nivel transcripcional y traduccional [84, 114, 115].

La menor concentración de insulina en el suero y la menor liberación de leptina se asocian a una mejor función de las hormonas sobre sus órganos blanco o bien, menor riesgo de resistencia a las mismas hormonas [115-117]. De este modo, el consumo de proteína de soya, al evitar la elevación en las concentraciones de las hormonas, aumentará su función. Esto es congruente con los resultados de la expresión global del tejido adiposo por microarreglos en donde encontramos una disminución en el mensajero de SOCS 7 (supresor of cytokine signaling o supresor de la señalización por citocinas 7) y aumento en la expresión de IRS 3 y sustrato 1 de Akt. Asimismo, el aumento en la acción de la insulina puede relacionarse con una mayor tendencia a la lipogénesis, la cual se muestra en las redes propuestas por resultados de los microarreglos. En estas redes la menor expresión de leptina por proteína de soya se asocia con mayor expresión de moléculas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos como FAS y ACC. En un trabajo anterior se muestra que PPAR α como gen blanco de la leptina se aumenta tras el consumo de proteína de soya en el tejido adiposo [118], así como PPAR γ , factor de transcripción que se ha visto involucrado en mayor sensibilidad a la insulina. Todos estos hallazgos indican la mejor acción o mayor sensibilidad a la insulina y leptina en el adipocito.

Otra molécula secretada por el adipocito, la adiponectina influye positivamente en la señalización de la insulina por aumentar la fosforilación de IRS 1 y 2 [117, 119]. En este trabajo, no encontramos cambios en la concentración sérica de adiponectina en contraste con Nagasawa [85], pero si una tendencia a mayor liberación de adiponectina por adipocitos de ratas alimentadas con proteína de soya y mayor expresión de su receptor en el mismo grupo de alimentación.

Además, la modificación en la presencia de hormonas o adipocinas por la proteína de soya se extiende al incluir a la angiotensina.

El angiotensinógeno, como se describió antes, es una adipocina que se secreta en mayores proporciones durante la obesidad. La expresión de angiotensinógeno y del receptor tipo I para angiotensina y la liberación de angiotensina I y II por adipocitos en cultivo se disminuyó por el consumo de proteína de soya. Se ha demostrado que la insulina puede contribuir a la hipocalcemia y ésta, a su vez, aumentar la síntesis de angiotensina II [120]. Asimismo, la angiotensina II promueve la secreción de leptina en células adiposas [121]. Entonces, la menor concentración de insulina mediada por la proteína de soya podría reducir la liberación de angiotensina por adipocitos y, en consecuencia, la leptina pudiera estar secretándose en menor proporción como sucede en este estudio.

El estímulo de adipocitos de ratas bajo los distintos tratamientos dietarios con insulina o con insulina y angiotensina nos dan información sobre la influencia de la angiotensina sobre la acción de la insulina. Esta influencia resultó diferente entre los grupos de alimentación, pues la estimulación con angiotensina en adipocitos del grupo alimentado con caseína y alta concentración de lípidos aumentó la fosforilación de Akt. En los demás grupos la estimulación tuvo efectos contrarios. En la literatura científica existe controversia en cuanto a la acción de la angiotensina sobre la señalización de la insulina [122-124]. La ambigüedad entre las conclusiones de los trabajos puede tener relación con las condiciones de alimentación, como aquí se demuestra. Por ejemplo, se ha encontrado mayor captura de glucosa y mayor fosforilación del receptor de insulina luego de la estimulación con angiotensina en adipocitos de ratas. Los animales utilizados para este estudio se obtuvieron en la edad adulta pesando 400 a 500 gramos y se mantuvieron con dieta comercial Chow [73]. Los datos del presente trabajo sugieren que en estados de obesidad la angiotensina puede estar aumentando la fosforilación de Akt en un esfuerzo de las células adiposas por mantener la captura de glucosa en condiciones donde existe exceso de sustratos energéticos y se requiera esterificar ácidos grasos.

Sin embargo, el consumo de un aislado de proteína de soya indujo mayor fosforilación de Akt que el consumo de caseína cuando la dieta estaba o no acompañada de un exceso de lípidos. Es decir, en condiciones basales y bajo la acción de la insulina, los adipocitos de animales alimentados con proteína de soya mantuvieron mayor fosforilación de Akt. Esto pudiera relacionarse con mayor sensibilidad a la insulina por activación de Akt y por menor expresión del receptor 1 para angiotensina y menor liberación de angiotensina en células adiposas, procesos que pudieran estar involucrados en la resistencia a la insulina.

La liberación de angiotensina también pudo correlacionarse con el tamaño de los adipocitos, los cuales resultaron de menor tamaño en ratas alimentadas con proteína de soya. Como se comentó, el mayor tamaño de los adipocitos se ha relacionado con mayor secreción de leptina. El aumento en el tamaño de las células también se ha asociado con hipoxia y disfunción del adipocito [125, 126]. De hecho, los adipocitos hipertróficos liberan mayor concentración de ácidos grasos libres a la circulación y conforman el tejido adiposo que es más comúnmente infiltrado de macrófagos [76, 127]. En relación a estas afirmaciones, la angiotensina, la cual se encontró aumentada en el medio de cultivo de células de ratas alimentadas con caseína, realza la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 mediada por $TNF\alpha$ en preadipocitos [128]. Asimismo, se ha propuesto que el tejido adiposo vascularizado, al contrario que el tejido adiposo hipóxico, funciona mejor al poder responder eficientemente a hormonas, poder llevar las adipocinas secretadas a los órganos blanco y ácidos grasos a diferentes tejidos bajo necesidades de energía [129]. Por otro lado, existe evidencia de que el proceso de formación de vasos sanguíneos induce, a su vez, adipogénesis [130]. Los resultados muestran, de forma muy interesante, que existe mayor número y área de vasos sanguíneos en el tejido adiposo de animales alimentados con proteína de soya. Entonces, en este estudio se demuestra que las células de ratas alimentadas con proteína de soya son más pequeñas y que el tejido adiposo de las mismas ratas es más vascularizado, contiene mayor número de células y menor expresión de citocinas proinflamatorias por microarreglos, sugiriendo un mayor proceso adipogénico, angiogénico y menor riesgo de inflamación y de acumulación de lípidos en tejidos no adiposos como páncreas o hígado.

Las modificaciones dadas en el tejido adiposo por el consumo de proteína de soya pueden también explicarse por el cambio en el patrón de expresión génica del tejido adiposo, pues por medio de microarreglos, se encontró que algunos genes involucrados en la función del adipocito como genes del sistema renina-angiotensina, de adipocinas, del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, así como genes de moléculas señalizadoras o de inflamación están modificados. Además, de forma muy interesante se encontraron genes diferencialmente expresados con función desconocida en el tejido adiposo. De forma más específica en tejido adiposo de ratas alimentadas con proteína de soya, se encontró mayor expresión de receptores de adipocinas como el receptor de adiponectina y de leptina. De forma contraria, la expresión de TNF y sus receptores se encontró disminuida. La expresión de algunos genes involucrados en el metabolismo de lípidos fue menor como la esteroil CoA desaturasa, la lipasa sensible a hormonas, así también fue menor para genes del metabolismo de colesterol. También se encontró una reducción en la expresión de interleucinas o moléculas proinflamatorias y en la expresión de genes que inducen apoptosis.

El aislado de proteína de soya que se utilizó para alimentar a las ratas del presente estudio contiene isoflavonas en 0.2% (ver Anexo 1.2). Entonces, los cambios que resultan de la alimentación con proteína de soya pudieran estar dados por la interacción entre las isoflavonas y el patrón de aminoácidos del aislado de la proteína de soya. Al respecto, se sabe que la genisteína, una isoflavona presente en dicho aislado, tiene influencia sobre la capacidad lipolítica del tejido adiposo y es un ligando de los PPARs [131, 132]. Sin embargo, es especialmente importante indicar que el contenido de isoflavonas en el aislado es muy pequeño y que se ha demostrado que el patrón de aminoácidos induce cambios metabólicos en células beta del páncreas [84]. Además, hay evidencia de que algunos péptidos resultantes de los procesos digestivos de proteínas de soya, específicamente, glicinina, son capaces de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina [94, 95]. Así, la menor liberación de angiotensina II por adipocitos de ratas alimentadas con proteína de soya pudiera explicarse por la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina mediada por los péptidos mencionados. Ciertamente, en estudios posteriores se puede evaluar la participación de cada uno de los componentes del aislado de proteína de soya en los cambios producidos en el tejido adiposo que aquí se describen.

Todos estos antecedentes apuntan a que la proteína de soya trae consecuencias favorables sobre la biología del adipocito. La funcionalidad del adipocito se ha intentado definir como la secreción regulada de adipocinas, el equilibrio entre la síntesis y oxidación de lípidos, sensibilidad a hormonas y un proceso de crecimiento del tejido adiposo que refleje capacidad de expansión del mismo. Por estas razones, el consumo de proteína de soya tiene capacidad de mantener la funcionalidad del adipocito por medio de adecuada síntesis de adipocinas, menor expresión de moléculas proinflamatorias mayor sensibilidad a hormonas, mayor capacidad adipogénica y menor secreción de angiotensina y, por lo tanto, mayor activación de Akt. Entonces, este trabajo podría dar pauta para una explicación sobre el vínculo molecular entre la hipertensión y resistencia a la insulina mediada por angiotensina y la disfunción del adipocito en condiciones de obesidad.

Finalmente, el consumo de proteínas de origen vegetal, específicamente el consumo de proteína de soya podría ser tomado en cuenta como una herramienta nutricia para la prevención de obesidad y sus consecuencias metabólicas.

Resumen de resultados

En el tejido adiposo retroperitoneal de ratas, el consumo de proteína de soya trae cambios en el patrón de expresión génica, evita el crecimiento de células adiposas por hipertrofia aumentando el número de células y número de vasos sanguíneos, mantiene la regulación en la secreción de adipocinas, disminuye las concentraciones séricas de insulina y liberación de angiotensina por adipocitos contribuyendo a la sensibilidad de la insulina por activación de Akt.

Conclusiones

El consumo de proteína de soya mantiene la funcionalidad del adipocito al inducir cambios en la morfología del tejido adiposo retroperitoneal, lo cual se asocia con cambios en la liberación de angiotensina y mayor sensibilidad a la insulina.

Bibliografía

- 1 Villa, A. R., Escobedo, M. H. and Mendez-Sanchez, N. (2004) [Estimates and trends of obesity prevalence through mortality rates associated of chronic diseases in Mexico]. *Gac Med Mex.* **140 Suppl 2**, S21-25
- 2 Olaiz-Fernández G, R.-D. J., Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, and J, S.-A. (2006) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. ed.)^eds.), Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México
- 3 Morrison, R. F. and Farmer, S. R. (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* **130**, 3116S-3121S
- 4 Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* **372**, 425-432
- 5 Lago, R., Gomez, R., Lago, F., Gomez-Reino, J. and Gualillo, O. (2008) Leptin beyond body weight regulation--current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cell Immunol.* **252**, 139-145
- 6 Geloën, A., Roy, P. E. and Bukowiecki, L. J. (1989) Regression of white adipose tissue in diabetic rats. *Am J Physiol.* **257**, E547-553
- 7 Sul, H. S., Smas, C., Mei, B. and Zhou, L. (2000) Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **24 Suppl 4**, S15-19
- 8 Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* **79**, 1147-1156
- 9 Gesta, S., Tseng, Y. H. and Kahn, C. R. (2007) Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* **131**, 242-256
- 10 Lee, C. H., Olson, P. and Evans, R. M. (2003) Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology.* **144**, 2201-2207
- 11 Karagiannides, I., Tchkonina, T., Dobson, D. E., Steppan, C. M., Cummins, P., Chan, G., Salvatori, K., Hadzopoulou-Cladaras, M. and Kirkland, J. L. (2001) Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **280**, R1772-1780

- 12 Schipper, B. M., Marra, K. G., Zhang, W., Donnenberg, A. D. and Rubin, J. P. (2008) Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* **60**, 538-544
- 13 Amri, E. Z., Ailhaud, G. and Grimaldi, P. A. (1994) Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J Lipid Res.* **35**, 930-937
- 14 Cases, J. A. and Barzilai, N. (2000) The regulation of body fat distribution and the modulation of insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **24 Suppl 4**, S63-66
- 15 McDevitt, R. M., Bott, S. J., Harding, M., Coward, W. A., Bluck, L. J. and Prentice, A. M. (2001) De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *Am J Clin Nutr.* **74**, 737-746
- 16 Huber, A. M., Gershoff, S. N. and Antoniadis, H. N. (1965) The Effect of Fasting and Refeeding on Isolated Rat Adipose Tissue Activity in the Presence of Crystalline and "Bound" Insulin. *Metabolism.* **14**, 619-624
- 17 Sebokova, E. and Klimes, I. (1997) Molecular and cellular determinants of triglyceride availability. *Ann N Y Acad Sci.* **827**, 200-214
- 18 Hirata, K., Dichek, H. L., Cioffi, J. A., Choi, S. Y., Leeper, N. J., Quintana, L., Kronmal, G. S., Cooper, A. D. and Quertermous, T. (1999) Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem.* **274**, 14170-14175
- 19 Lin, H. V., Kim, J. Y., Poci, A., Rossetti, L., Shapiro, L., Scherer, P. E. and Accili, D. (2007) Adiponectin resistance exacerbates insulin resistance in insulin receptor transgenic/knockout mice. *Diabetes.* **56**, 1969-1976
- 20 Horton, J. D., Shimomura, I., Ikemoto, S., Bashmakov, Y. and Hammer, R. E. (2003) Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J Biol Chem.* **278**, 36652-36660
- 21 Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Takeuchi, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Okazaki, H., Iizuka, Y., Ohashi, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., Nagai, R., Yamazaki, T., Kadowaki, T., Yamada, N., Osuga, J. and Shimano, H. (2007) SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res.* **48**, 1581-1591
- 22 Sewter, C., Berger, D., Considine, R. V., Medina, G., Rochford, J., Ciaraldi, T., Henry, R., Dohm, L., Flier, J. S., O'Rahilly, S. and Vidal-Puig, A. J. (2002) Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform

- expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes*. **51**, 1035-1041
- 23 Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. and Sul, H. S. (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. **279**, 47066-47075
- 24 Fredrikson, G., Tornqvist, H. and Belfrage, P. (1986) Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*. **876**, 288-293
- 25 Holm, C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*. **31**, 1120-1124
- 26 Bates, S. H. and Myers, M. G. (2004) The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med*. **82**, 12-20
- 27 Maffei, M., Fei, H., Lee, G. H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G. and Friedman, J. M. (1995) Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 6957-6960
- 28 Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. **269**, 546-549
- 29 Hoggard, N., Mercer, J. G., Rayner, D. V., Moar, K., Trayhurn, P. and Williams, L. M. (1997) Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. **232**, 383-387
- 30 Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J. F., Kurpad, A. J., Elias, C. F., Li, H., Elmquist, J. K., Kennedy, R. T. and Kulkarni, R. N. (2007) Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest*. **117**, 2860-2868
- 31 Lollmann, B., Gruninger, S., Stricker-Krongrad, A. and Chiesi, M. (1997) Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. **238**, 648-652
- 32 Bornstein, S. R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Path, G., Hauner, H., Tsokos, M., Chrousos, G. P. and Scherbaum, W. A. (2000) Immunohistochemical and ultrastructural

- localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*. **49**, 532-538
- 33 Unger, R. H. (2003) Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. **14**, 398-403
- 34 Nadler, S. T. and Attie, A. D. (2001) Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr*. **131**, 2078-2081
- 35 Unger, R. H., Zhou, Y. T. and Orci, L. (1999) Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 2327-2332
- 36 Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P. and Corvera, S. (2004) Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*. **114**, 1281-1289
- 37 Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. and Tobe, K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. **116**, 1784-1792
- 38 Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B. and Kadowaki, T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. **8**, 1288-1295
- 39 Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. **26**, 439-451
- 40 Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. **423**, 762-769
- 41 Yatagai, T., Nagasaka, S., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakamura, T., Kuroe, A., Nakai, Y. and Ishibashi, S. (2003) Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. **52**, 1274-1278
- 42 Cambuli, V. M., Musiu, M. C., Incani, M., Paderi, M., Serpe, R., Marras, V., Cossu, E., Cavallo, M. G., Mariotti, S., Loche, S. and Baroni, M. G. (2008) Assessment

- of adiponectin and leptin as biomarkers of positive metabolic outcomes after lifestyle intervention in overweight and obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**, 3051-3057
- 43 Perlmutter, D. H., Dinarello, C. A., Punsal, P. I. and Colten, H. R. (1986) Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest.* **78**, 1349-1354
- 44 Penforinis, P. and Marette, A. (2005) Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res.* **46**, 135-142
- 45 Tilg, H. and Moschen, A. R. (2008) Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* **14**, 222-231
- 46 Mattacks, C. A. and Pond, C. M. (1999) Interactions of noradrenalin and tumour necrosis factor alpha, interleukin 4 and interleukin 6 in the control of lipolysis from adipocytes around lymph nodes. *Cytokine.* **11**, 334-346
- 47 Greenberg, A. S., Nordan, R. P., McIntosh, J., Calvo, J. C., Scow, R. O. and Jablons, D. (1992) Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* **52**, 4113-4116
- 48 Jablons, D. M., Mule, J. J., McIntosh, J. K., Sehgal, P. B., May, L. T., Huang, C. M., Rosenberg, S. A. and Lotze, M. T. (1989) IL-6/IFN-beta-2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J Immunol.* **142**, 1542-1547
- 49 Rotter, V., Nagaev, I. and Smith, U. (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* **278**, 45777-45784
- 50 Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M. J., James, D. E., Kemp, B. E., Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A. (2006) Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* **55**, 2688-2697
- 51 Pickup, J. C., Mattock, M. B., Chusney, G. D. and Burt, D. (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* **40**, 1286-1292
- 52 Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. and Ranganathan, G. (2001) Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **280**, E745-751

- 53 Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G. and Broedl, U. C. (2008) Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* **14**, 741-751
- 54 Surwit, R. S., Feinglos, M. N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A. E., Opara, E. C., Kuhn, C. M. and Rebuffe-Scrive, M. (1995) Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism.* **44**, 645-651
- 55 Guyton, A., Hall JE. (1997) *Tratado de Fisiología Médica.* McGraw Hill Interamericana Editores, México
- 56 Endoh, M. and Blinks, J. R. (1988) Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res.* **62**, 247-265
- 57 Takanashi, M. and Endoh, M. (1991) Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol.* **261**, H611-619
- 58 Scheen, A. J. (2004) Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab.* **30**, 498-505
- 59 Engeli, S., Schling, P., Gorzelniak, K., Boschmann, M., Janke, J., Ailhaud, G., Teboul, M., Massiera, F. and Sharma, A. M. (2003) The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* **35**, 807-825
- 60 Horiuchi, M., Mogi, M. and Iwai, M. (2006) Signaling crosstalk angiotensin II receptor subtypes and insulin. *Endocr J.* **53**, 1-5
- 61 Crandall, D. L., Herzlinger, H. E., Saunders, B. D., Armellino, D. C. and Kral, J. G. (1994) Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res.* **35**, 1378-1385
- 62 Lu, H., Boustany-Kari, C. M., Daugherty, A. and Cassis, L. A. (2007) Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**, E1280-1287
- 63 Pausova, Z. (2006) From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **15**, 173-178
- 64 Massiera, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J. M., Quignard-Boulangé, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., Meneton, P. and

- Teboul, M. (2001) Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* **15**, 2727-2729
- 65 Gorzelnik, K., Engeli, S., Janke, J., Luft, F. C. and Sharma, A. M. (2002) Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens.* **20**, 965-973
- 66 Van Harmelen, V., Ariapart, P., Hoffstedt, J., Lundkvist, I., Bringman, S. and Arner, P. (2000) Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res.* **8**, 337-341
- 67 Hattori, Y., Akimoto, K., Gross, S. S., Hattori, S. and Kasai, K. (2005) Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia.* **48**, 1066-1074
- 68 Kouyama, R., Suganami, T., Nishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T., Kiso, M., Chiwata, T., Miyamoto, Y., Yoshimasa, Y., Fukamizu, A., Horiuchi, M., Hirata, Y. and Ogawa, Y. (2005) Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology.* **146**, 3481-3489
- 69 Boschmann, M., Ringel, J., Klaus, S. and Sharma, A. M. (2001) Metabolic and hemodynamic response of adipose tissue to angiotensin II. *Obes Res.* **9**, 486-491
- 70 Wei, Y., Sowers, J. R., Nistala, R., Gong, H., Uptergrove, G. M., Clark, S. E., Morris, E. M., Szary, N., Manrique, C. and Stump, C. S. (2006) Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* **281**, 35137-35146
- 71 Folli, F., Kahn, C. R., Hansen, H., Bouchie, J. L. and Feener, E. P. (1997) Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest.* **100**, 2158-2169
- 72 Yvan-Charvet, L., Even, P., Bloch-Faure, M., Guerre-Millo, M., Moustaid-Moussa, N., Ferre, P. and Quignard-Boulangue, A. (2005) Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* **54**, 991-999
- 73 Juan, C. C., Chien, Y., Wu, L. Y., Yang, W. M., Chang, C. L., Lai, Y. H., Ho, P. H., Kwok, C. F. and Ho, L. T. (2005) Angiotensin II enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo. *Endocrinology.* **146**, 2246-2254

- 74 Hajer, G. R., van Haeften, T. W. and Visseren, F. L. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* **29**, 2959-2971
- 75 Trayhurn, P., Wang, B. and Wood, I. S. (2008) Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* **100**, 227-235
- 76 de Ferranti, S. and Mozaffarian, D. (2008) The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem.* **54**, 945-955
- 77 Rutledge, A. C. and Adeli, K. (2007) Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev.* **65**, S13-23
- 78 Tschop, M. and Heiman, M. L. (2001) Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **109**, 307-319
- 79 Chang, S., Graham, B., Yakubu, F., Lin, D., Peters, J. C. and Hill, J. O. (1990) Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol.* **259**, R1103-1110
- 80 Getz, G. S. and Reardon, C. A. (2006) Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**, 242-249
- 81 Merkel, M., Velez-Carrasco, W., Hudgins, L. C. and Breslow, J. L. (2001) Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 13294-13299
- 82 Kasim-Karakas, S. E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L. C. and Goodman, M. N. (1996) Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med.* **128**, 208-213
- 83 Pagliassotti, M. J., Prach, P. A., Koppenhafer, T. A. and Pan, D. A. (1996) Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol.* **271**, R1319-1326
- 84 Noriega-Lopez, L., Tovar, A. R., Gonzalez-Granillo, M., Hernandez-Pando, R., Escalante, B., Santillan-Doherty, P. and Torres, N. (2007) 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.* **282**, 20657-20666
- 85 Nagasawa, A., Fukui, K., Kojima, M., Kishida, K., Maeda, N., Nagaretani, H., Hibuse, T., Nishizawa, H., Kihara, S., Waki, M., Takamatsu, K., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2003) Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**, 909-914

- 86 Young, V. R. (1991) Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J Am Diet Assoc.* **91**, 828-835
- 87 Messina, M. (1995) Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J Nutr.* **125**, 567S-569S
- 88 Adams, M. R., Golden, D. L., Franke, A. A., Potter, S. M., Smith, H. S. and Anthony, M. S. (2004) Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr.* **134**, 511-516
- 89 Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, K., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama, N. and Maebuchi, M. (2004) Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**, 352-359
- 90 Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K. and Ikeda, H. (1996) Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr.* **126**, 380-388
- 91 Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A. L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C. A. and Torres, N. (2005) Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res.* **46**, 1823-1832
- 92 Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-Newell, M. E. (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* **333**, 276-282
- 93 Nagasawa, A., Fukui, K., Funahashi, T., Maeda, N., Shimomura, I., Kihara, S., Waki, M., Takamatsu, K. and Matsuzawa, Y. (2002) Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm Metab Res.* **34**, 635-639
- 94 Mallikarjun Gouda, K. G., Gowda, L. R., Rao, A. G. and Prakash, V. (2006) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *J Agric Food Chem.* **54**, 4568-4573
- 95 Lo, W. M. and Li-Chan, E. C. (2005) Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *J Agric Food Chem.* **53**, 3369-3376
- 96 Trujillo, J., Ramirez, V., Perez, J., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Tovar, A. R., Munoz, R. M., Uribe, N., Gamba, G. and Bobadilla, N. A. (2005) Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation. *Am J Physiol Renal Physiol.* **288**, F108-116

- 97 Pedraza-Chaverri, J., Barrera, D., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O. N., Cruz, C., Murguia, F., Juarez-Nicolas, C., Correa-Rotter, R., Torres, N. and Tovar, A. R. (2004) Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sci.* **74**, 987-999
- 98 Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method for RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-159
- 99 Smyth, G. K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* **3**, Article3
- 100 Smyth, G. K. (2005) Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. pp. 397-420, Springer, New York
- 101 Rodbell, M. (1966) The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem.* **241**, 3909-3917
- 102 Banerjee, M. and Bhonde, R. R. (2006) Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology.* **51**, 1-5
- 103 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-275
- 104 Yu, Y.-H. and Zhu, H. (2004) Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**, E402-E410
- 105 Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* **101**, 1354-1361
- 106 Badman, M. K. and Flier, J. S. (2007) The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology.* **132**, 2103-2115
- 107 Suzuki, A., Okamoto, S., Lee, S., Saito, K., Shiuchi, T. and Minokoshi, Y. (2007) Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* **27**, 4317-4327
- 108 Genuth, S. M. (1976) Effect of high fat vs. high carbohydrate feeding on the development of obesity in weanling ob/ob mice. *Diabetologia.* **12**, 155-159

- 109 Buettner, R., Scholmerich, J. and Bollheimer, L. C. (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* (Silver Spring). **15**, 798-808
- 110 Noguchi, T. and Tanaka, T. (1995) Insulin resistance in obesity and its molecular control. *Obes Res.* **3 Suppl 2**, 195S-198S
- 111 Ascencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gomez-Perez, F. J., Hernandez-Pando, R. and Tovar, A. R. (2004) Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* **134**, 522-529
- 112 Torre-Villalvazo, I., Tovar, A. R., Ramos-Barragan, V. E., Cerbon-Cervantes, M. A. and Torres, N. (2008) Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr.* **138**, 462-468
- 113 Velasquez, M. T. and Bhathena, S. J. (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.* **4**, 72-82
- 114 Lee, M. J., Yang, R. Z., Gong, D. W. and Fried, S. K. (2007) Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem.* **282**, 72-80
- 115 Lee, M. J. and Fried, S. K. (2009) Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **296**, E1230-1238
- 116 Liuzzi, A., Savia, G., Tagliaferri, M., Lucantoni, R., Berselli, M. E., Petroni, M. L., De Medici, C. and Viberti, G. C. (1999) Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **23**, 1066-1073
- 117 Lu, J. Y., Huang, K. C., Chang, L. C., Huang, Y. S., Chi, Y. C., Su, T. C., Chen, C. L. and Yang, W. S. (2008) Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci.* **15**, 565-576
- 118 Frigolet, M. (2006) El efecto de la proteína de soya sobre la funcionalidad de los adipocitos. In Facultad de Química ed.)^eds.), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico
- 119 Yano, W., Kubota, N., Itoh, S., Kubota, T., Awazawa, M., Moroi, M., Sugi, K., Takamoto, I., Ogata, H., Tokuyama, K., Noda, T., Terauchi, Y., Ueki, K. and Kadowaki, T. (2008) Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J.* **55**, 515-522

- 120 Ferrannini, E. (1992) The haemodynamics of obesity: a theoretical analysis. *J Hypertens.* **10**, 1417-1423
- 121 Skurk, T., van Harmelen, V., Blum, W. F. and Hauner, H. (2005) Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res.* **13**, 969-973
- 122 Manrique, C., Lastra, G., Gardner, M. and Sowers, J. R. (2009) The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Med Clin North Am.* **93**, 569-582
- 123 Muscogiuri, G., Chavez, A. O., Gastaldelli, A., Perego, L., Tripathy, D., Saad, M. J., Velloso, L. and Folli, F. (2008) The crosstalk between insulin and renin-angiotensin-aldosterone signaling systems and its effect on glucose metabolism and diabetes prevention. *Curr Vasc Pharmacol.* **6**, 301-312
- 124 Fliser, D., Arnold, U., Kohl, B., Hartung, R. and Ritz, E. (1993) Angiotensin II enhances insulin sensitivity in healthy volunteers under euglycemic conditions. *J Hypertens.* **11**, 983-988
- 125 Bluher, M. (2009) Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **117**, 241-250
- 126 Wood, I. S., de Heredia, F. P., Wang, B. and Trayhurn, P. (2009) Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc.* 1-8
- 127 Jeong, S. and Yoon, M. (2009) Fenofibrate inhibits adipocyte hypertrophy and insulin resistance by activating adipose PPARalpha in high fat diet-induced obese mice. *Exp Mol Med.* **41**, 397-405
- 128 Asamizu, S., Urakaze, M., Kobashi, C., Ishiki, M., Norel Din, A. K., Fujisaka, S., Kanatani, Y., Bukahari, A., Senda, S., Suzuki, H., Yamazaki, Y., Iwata, M., Usui, I., Yamazaki, K., Ogawa, H., Kobayashi, M. and Tobe, K. (2009) Angiotensin II enhances the increase in monocyte chemoattractant protein-1 production induced by tumor necrosis factor- α from 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinol.* **202**, 199-205
- 129 Schling, P. and Loffler, G. (2002) Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiol Sci.* **17**, 99-104
- 130 Hausman, G. J. and Richardson, R. L. (2004) Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci.* **82**, 925-934
- 131 Szkudelska, K., Nogowski, L. and Szkudelski, T. (2000) Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **75**, 265-271

132 Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A. and Lowik, C. W.
(2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a
molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem.* **278**, 962-967

Anexos

Anexo1

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

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

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

Genisteína	1.38
Daidzeína	0.71
Gliciteína	0.19
Total	2.28

Anexo 2. Alimentación de las ratas (%)

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

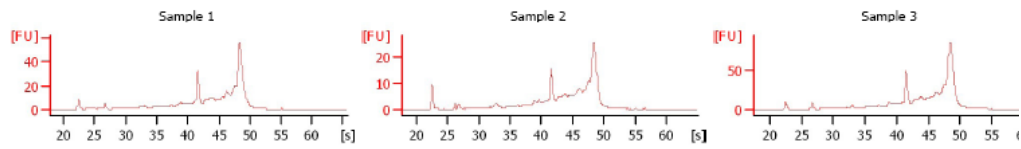
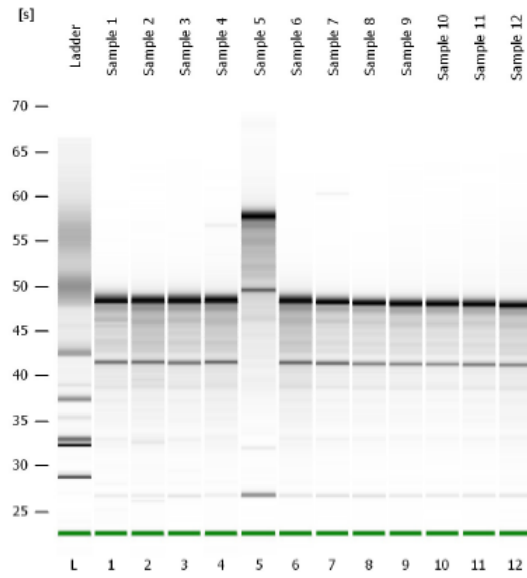
Mezcla de nutrimentos inorgánicos (g/kg)

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

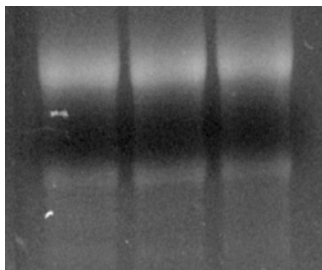
Mezcla de vitaminas (g/kg)

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

Anexo 3.1 Gel para comprobar integridad de ARN de tejido adiposo retroperitoneal en bioanalizador.



Anexo 3.2 Gel de agarosa al 1.5% para comprobar integridad de ARN de tejido adiposo retroperitoneal.



Anexo 4. Artículo publicado en la revista científica Journal of Nutritional
Biochemistry

White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions
after soy protein consumption in rats

Maria E. Frigolet^{1,2}, Nimbe Torres¹, Laura Uribe-Figueroa³, Claudia Rangel, Gerardo
Jimenez-Sanchez³, Armando R. Tovar¹

¹ Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición Salvador Zubirán, México, DF 14000. ² Posgrado en Ciencias Bioquímicas,
Facultad de Química, UNAM, México, DF 04510. ³ Instituto Nacional de Medicina
Genómica, México, DF 01900.

Corresponding author:

Dr. Armando R. Tovar

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Depto. Fisiología de la Nutrición,
Vasco de Quiroga No 15, Tlalpan, México, D, F., 14000, México

Phone: (525) 6553038 FAX: (525) 6551076

E-mail address: tovar.ar@gmail.com

Running head: Effect of soy protein on adipose tissue gene expression

Grants: This work was supported by CONACYT (grant: NT 46135-M). MEF received a
scholarship by CONACYT.

Key words: adipose tissue, soy protein, transcriptome, leptin, obesity

ABSTRACT

Obesity is associated with an increase in adipose tissue mass due to an imbalance between high dietary energy intake and low physical activity, and the type of dietary protein may contribute to its development. The aim of this work was to use genome profiling to study the effect of soy protein versus casein on white adipose tissue and the metabolic functions of adipocytes in rats with diet-induced obesity. The results showed that rats fed a Soy high-fat diet (Soy HF) gained less weight and had lower serum leptin concentrations than rats fed a casein high-fat diet (Cas HF), despite similar energy intake. Histological studies indicated that rats fed the Soy HF diet had significantly smaller adipocytes than those fed the Cas HF diet, and this was associated with a lower triglyceride/DNA content. Fatty acid synthesis in isolated adipocytes was reduced by the amount of fat consumed but not by the type of protein ingested, whereas adipocytes from rats fed the Soy diet showed less lipolysis than those from the high fat groups. Microarray analysis revealed that Soy protein consumption modified the expression of 90 genes involved in metabolic functions and inflammatory responses in adipose tissue. Network analysis showed that the expression of leptin was regulated by the type of dietary protein; leptin was identified as a central regulator of the expression of lipid metabolism genes in adipose tissue. Thus, Soy maintains the size and metabolic functions of adipose tissue through biochemical adaptations, adipokine secretion, and global changes in gene expression.

INTRODUCTION

An increase in adipose tissue is the main cause of the metabolic abnormalities that occur during the development of obesity [1-3]. This is because the adipocyte plays an important role in the management of excess dietary energy, releasing signaling molecules called adipokines that regulate the oxidation of metabolic fuels in several organs, including the liver, skeletal muscle, heart, and pancreas [1]. Thus, while adipocytes are performing their metabolic functions, the above tasks are also occurring, preventing the accumulation of lipids in non-adipose tissues and thus avoiding lipotoxicity [4].

Several adipokines play major roles in body energy homeostasis, primarily leptin [5, 6]. In addition to its function as a hypothalamic regulator of food intake [7], this hormone stimulates the leptin receptor in several tissues, mainly skeletal muscle, to increase fatty acid oxidation [8]. However, the contribution of other adipokines is also important to prevent or induce lipotoxicity and insulin resistance [9]. The secretion and proportion of these adipokines are of vital importance to avoid metabolic abnormalities that occur as a consequence of obesity.

Diet is a key factor that can modify the biochemical and molecular tasks of adipocytes. The type and amount of fat and carbohydrates in the diet stimulate to various extents the accumulation of lipids in adipocytes [10]. High fat diets promote the entrance of fatty acids from chylomicrons into fat cells, increasing their accumulation as triglycerides. In addition, high carbohydrate diets stimulate adipocyte lipogenesis, also increasing the amount of triglycerides in the lipid droplets of adipocytes [11, 12]. It has been shown that only a limited amount of triglycerides can be stored in the adipose tissue of each individual. This

depends on the tissue's capacity for expansion, which is genetically determined, and is a result of the number of metabolically functional adipocytes [13]. However, to date, there has been little evidence that dietary protein type may influence the gene expression profile and its consequences on the biochemistry and physiology of the adipose tissue, particularly during the consumption of a high-fat diet. It has been shown that the type of dietary protein modifies serum and hepatic lipids and body weight gain in different ways; in particular, soy protein has beneficial effects on blood lipids and body weight. [14-16]. In addition, we previously observed that soy protein was able to reduce carcass body fat and maintain lower adipocyte size in rates compared to a casein diet [15].

These data suggest that consumption of a soy diet may change the biochemical and molecular functions of adipocytes, which in turn reduces the metabolic syndrome abnormalities observed during obesity [15]. We have previously demonstrated that rats fed soy protein accumulate less body fat and that the adipocyte area of these rats is not expanded despite the high fat content in the diet. However, it is not known whether soy protein is able to modify the adipocyte transcriptome and metabolism, which could explain the phenotypic changes observed in these animals. Thus, the aim of the present study was to establish whether the consumption of a soy protein diet modifies the gene expression profile of adipose tissue. In addition, we wanted to determine whether these changes improve the lipogenic capacity, lipolytic capacity, and endocrine functions of these cells, which could explain the adipose tissue phenotype observed in rats fed soy protein.

METHODS AND MATERIALS

Animals. Four week-old male Sprague Dawley rats weighing an average of 100 g were bought from Harlan Teklad (Mexico City). All rats were housed in individual cages in a controlled temperature environment with a 12-h light/12-h dark cycle. All rats had free access to water and food. These rats were fed four different diets for 160 days. The diets were prepared from basic ingredients as described in Table 1. High-fat diets (25% fat; Cas HF and Soy HF) contained 5 kCal/g, and control diets (5% fat; Cas and Soy) contained 4 kCal/g. The diets had 30% of either soy protein or casein, and the dietary protein concentration was adjusted on the basis of protein purity (casein 90.6%, soy protein 86%). Twelve-hour fasted animals were killed with carbon monoxide and guillotine. The serum was stored at -20°C for measuring biochemical parameters, and adipose tissue was stored at -70°C for the extraction of RNA, DNA, or triglycerides. For adipocyte culture, the rats were killed as described, and the retroperitoneal fat pad was immediately minced and digested as explained below. The protocol for the present study was approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Serum biochemical parameters. The serum cholesterol and triglyceride concentrations were measured by colorimetric kits (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany). The serum free fatty acid (FFA) concentration was assayed with a FFA Half Micro Test (Roche Applied Science, Indianapolis IN). Serum leptin and adiponectin were

assayed by radioimmunoassay (RIA) kits (Linco Research, St. Charles, MO). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) was measured by ELISA (Alpco Diagnostics, Salem, NH), and insulin and interleukin-6 (IL-6) were measured by a Lincoplex kit (Linco Research, St. Charles, MO)

Real-time quantitative polymerase chain reaction. Total RNA was extracted from fat tissues by Chomczynski's method using guanidine thiocyanate [17]. For integrity analysis, 15 μ g of total RNA were separated by 1.0% agarose/2.2 M formaldehyde gel electrophoresis. Three hundred nanograms of total RNA from each animal were subjected to reverse transcription prior to PCR amplification with the Two-Step Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Parallel non-template control (NTC) reactions were run in the absence of RNA to detect nucleic acid contamination in the reaction mixtures. TaqMan fluorogenic probes and oligonucleotide primers were designed by Applied Biosystems. TaqMan PCR assays for each gene target were carried out in triplicate in 96-well optical plates with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems). For every PCR sample, an amplification plot was generated from the collected data, and a threshold cycle (CT) value was calculated with the software suite. With the use of the standard curve, CT values for each gene were used to calculate the initial quantity of cDNA. HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) was used as an invariant control. Taqman assays for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α ; Rn00566193_m1), PPAR γ (Rn00440945_m1), sterol-regulatory element binding protein-1 (SREBP-1; ATOVARPE1_PE1), HMG-CoA reductase (Rn00565598_m1), stearoyl coenzyme A desaturase (SCD-1; Rn00594894_m1), leptin (Rn00565158_m1),

fatty acid synthase (FAS; Rn00569117_m1), UCP-1 (Rn00562126), and HPRT (Rn01527840) were obtained from Applied Biosystems.

Microarray analysis.

Total RNA from the adipose tissue of 12 rats (3 Cas, 3 Soy, 3 Cas HF and 3 Soy HF) was isolated as previously described. The RNA quality of each sample was assessed with the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). The RNA samples from each diet were pooled to prepare a single 2.5- μ g sample. The four samples with one technical replicate each were labeled and hybridized to an Affymetrix Rat Expression Array 230A (RAE230A) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2.5 μ g of pooled RNA was converted to first-strand cDNA using Superscript II reverse transcriptase primed by a poly (T) oligomer. Second strand cDNA synthesis was carried out with T4 DNA polymerase, followed by an *in vitro* transcription, during which biotinylated dNTPs were incorporated into the generated cRNA. The cRNA products were fragmented into strands of 200 base pairs or less, and 15 μ g of the fragmentation product were added to the hybridization cocktail (100 mM 2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween-20, 0.1 mg/ml of herring sperm DNA, and 0.5 mg/ml acetylated bovine serum albumin). Then 300 μ l of each sample was heated to 95°C and hybridized to RAE230A (Affymetrix Inc.) for 16 hours at 45°C. The samples were washed with low (6X SSPE) and high (100 mM MES, 0.1 M NaCl) stringency buffers and stained with streptavidin-phycoerythrin. The RAE230A array contains 15,866 probesets for the analysis of approximately 14,200 genes from the UniGene (NCBI, 2002) GenBank (NCBI, Release 129, April 2002), and RefSeq (NCBI, June 2002) rat sequence data. A GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA) was used to collect fluorescent signal, and GCOS software (Affymetrix, Santa Clara CA)

was used to obtain intensity signal and quality data from the scanned arrays.

Analysis and functional interpretation of microarray data. Each microarray experiment was duplicated as a technical replicate for statistical robustness. Low-level data analysis included two normalization processes: quantile normalization [18] of technical replicates and Loess normalization applied to all microarrays to standardize the dynamic range of expression. To identify differentially expressed genes, a linear model with an empirical Bayes approach was implemented using R and the Limma package [19, 20]. The selection of differentially expressed genes was based on two statistical criteria. First, genes with log-odds ≥ 3 were selected. Then a hierarchical search of genes was performed based on log-fold changes. The expression values in Tables 3, 4 and 5 are represented as fold changes (FC) between Cas vs. Soy, or CasHF vs. SoyHF.

Biological interaction networks of regulated genes in adipose tissue from rats fed soy protein versus casein adequate or high fat diets were identified using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). For this purpose, a data set containing significantly up- or down-regulated genes was analyzed with the Ingenuity software. Expression values of genes exhibiting significance were processed by R software (<http://www.cran.r-project.org>) for hierarchical clustering analysis.

Adipocyte culture. Adipocytes were prepared from retroperitoneal fat pads. Fat depots were resected under aseptic conditions, and adipocytes were isolated by collagenase digestion according to the procedure of Rodbell [21] with minor modifications as described below. The fat pads were minced in Krebs-Ringer HEPES buffer (pH 7.4) containing 5

mM D-glucose, 2% bovine serum albumin, 135 mM NaCl, 2.2 mM CaCl₂·2H₂O, 1.25 mM MgSO₄·7H₂O, 0.45 mM KH₂PO₄, and 10 mM HEPES. Adipose tissue fragments were digested in Krebs-Ringer HEPES buffer with 1.25 mg/ml type II collagenase at 37°C with gentle shaking at 80 cycles/min for 45 min. The resultant cell suspension was diluted in 13 ml of cold Krebs-Ringer HEPES buffer. For washing, cells were resuspended in 50 ml of buffer and centrifuged at 400 x g for 5 min. The final wash was made with 13 ml of culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] containing 10% fetal bovine serum). Floating cells were collected as primary adipocytes, plated on 6-cm dishes, and cultured at 37°C in 5% CO₂. Each replicate of 10⁵ adipocytes was incubated with 2 ml of DMEM containing 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin mixture and 0.5 mM sodium [¹⁴C] acetate (18 dpm/pmol) for 3 h. Incorporation of [¹⁴C] acetate into fatty acids and cholesterol was determined as described below.

Fatty acid and cholesterol synthesis. After 3 h of incubation with 0.5 mM [1-¹⁴C] acetate (18-21 dpm/pmol), the medium was aspirated, and the cells were collected, washed with Krebs Ringer containing 10 mM HEPES pH 7.4, and lysed with 0.1 M NaOH. The medium and cell suspension were combined, and a 100-μl aliquot was removed for protein determination. For each cell suspension, 2 ml of ethanol, 1 ml 75% KOH, 10 μl [1,2 ³H] cholesterol (111 000 dpm/pmol) carrier solution, and 10 μl [9,10 (n) ³H] oleic acid (17 760 dpm/pmol) carrier solution were added before cholesterol and fatty acid extraction. Cholesterol was extracted with 3.5 ml petroleum ether, and the resultant aqueous phase was used to extract fatty acids with 3 ml hexane. Both phases were evaporated to dryness. The residues were spotted onto silica gel TLC plates and developed in chloroform for

cholesterol analysis or in heptane: diethyl ether: acetic acid (90:30:1) for fatty acid analysis. Spots were visualized with iodine vapors, excised, placed in scintillation vials with scintillation solution, and then counted. The results are expressed as picomoles of [¹⁴C] acetate incorporated into fatty acids or cholesterol per μg of cellular protein.

Glycerol release from adipocytes. The measurement for glycerol content was performed according to Yu and Zhu [22]. Briefly, primary adipocytes were incubated in DMEM containing fetal bovine serum for 1 h. Then the medium was collected, and free glycerol was measured by colorimetric analysis (Trig/GB Roche Diagnostics).

Determination of triglyceride and DNA in adipose tissue. The isolation and determination of triglyceride and DNA content was performed according to Okuno [23]. Briefly, 0.5 g of adipose tissue was removed and frozen at -70°C. For measurements, the tissue was thawed and homogenized in 10 mM Tris buffer, pH 8.0 containing 150 mM sodium chloride and 0.1% triton at 40-50°C with a polytron homogenizer. Fifty microliters of the homogenized solution was used for triglyceride determination as described above. One milliliter of the homogenized solution was incubated with a solution containing SDS, proteinase K, and EDTA at 37°C. DNA was extracted by the phenol-chloroform extraction method. The amount of DNA was measured by its absorbance at 260 nm.

Quantification of adipocyte size. Paraffin sections of fixed fat pads were stained with hematoxylin and eosin (HE) and analyzed with a Leica microscope equipped with a digital

camera. For each sample, three areas and 10 cells in each area were evaluated. Cell areas were obtained using Leica software for digital imaging processing.

Statistical analysis. Results obtained in this study are presented as the means \pm SEM and were evaluated with one-way or two-way ANOVA, followed by Fisher's protected least significant difference test when the interaction was significant, to determine statistical differences. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ and are indicated by letters in the figures (a>b>c>d).

RESULTS

Weight gain, energy intake, and biochemical parameters.

At the end of the study, rats fed Cas HF or Soy HF diet gained significantly more weight than the respective control groups. However, rats fed Cas HF diet had significantly more retroperitoneal adipose tissue weight than rats fed Soy HF. These results are in agreement with a previous study from our lab demonstrating that soy protein induces less weight gain and less total body fat (15). Differences in weight gain were not attributed to changes in energy intake since the amount of kCal/day consumed on average for each group was not significantly different. Rats fed Soy diets had lower serum triglyceride and free fatty acid concentrations than rats fed Cas diets. Serum cholesterol concentration did not show a significant difference among groups (Table 2). Animals fed Cas HF or Cas diets showed higher serum leptin concentrations than those fed Soy HF or Soy diets, respectively (Figure 7C). Rats fed Cas diets also had higher concentrations of serum adiponectin than groups fed Soy diets. However, the adiponectin/leptin ratio was significantly higher in control rats

than those fed high-fat diets, indicating that high dietary fat content reduces serum adiponectin concentration as adipose tissue mass increased. *In vitro* studies demonstrated that isolated adipocytes from rats fed Soy released more adiponectin than those from the other groups (data not shown). On the other hand, there were no significant differences in serum concentrations of IL-6 and TNF α among the groups. Thus, soy protein consumption has a beneficial effect on biochemical and hormonal parameters despite the consumption of a high-fat diet.

Histological analysis of adipose tissue

Adipose tissue from rats fed the Cas HF diet (Fig. 1B) contained bigger adipocytes than tissue from rats fed Cas (Fig. 1A), Soy (Fig. 1C), or Soy HF (Fig. 1D). Quantitative analysis of adipocyte size showed that animals fed high-fat diets had bigger adipocytes than the respective control groups. Adipocytes from rats fed Soy HF or Cas HF diets were 72 and 80% larger, respectively, than those of the control groups. Moreover, adipocytes of rats fed the Soy HF diet were 49% smaller than those of rats fed the Cas HF diet (Fig 2A).

Triglyceride and DNA content in adipose tissue.

Adipose tissue from rats fed Cas or Cas HF diets contained higher levels of triglyceride per g tissue than rats fed Soy or Soy HF diets (Fig 2B). Interestingly, the amount of DNA content per g tissue was significantly higher in rats fed Cas or Soy diets than in rats fed Cas HF or Soy HF diets (Fig 2C). As a result, the triglyceride/DNA ratio was significantly higher in rats fed the Cas HF diet than in the other groups, indicating a large extent of adipocyte hypertrophy. Statistical analysis indicated that adipose tissue from rats fed Soy

protein diets maintained a low triglyceride/DNA ratio, suggesting an active adipogenic process that avoids adipocyte hypertrophy (Fig 2D). Thus, the difference in size observed in the histological studies between adipocytes from rats fed Soy HF and Cas HF diets was not only due to a difference in the amount of triglyceride stored, but also to an important difference in the number of adipocytes. Our results are in agreement with a previous study, which used histological studies of a different fat pad (epididymal) to demonstrate that rats fed Soy protein produced smaller adipocytes [15]. Thus, soy protein maintains high adipose tissue cellularity, preventing hypertrophy.

Fatty acid and cholesterol synthesis in isolated adipocytes.

To determine the capacity of adipocytes of rats fed Soy HF or Cas HF diets to synthesize lipids, we measured the incorporation of [^{14}C] acetate into fatty acids and cholesterol. As shown in figures 3A-B, rats fed high-fat diets showed a significant decrease in the rate of incorporation of radiolabeled acetate into fatty acids and cholesterol as compared to the control groups fed soy protein or casein. [^{14}C] acetate was mainly incorporated into fatty acids, indicating that adipocytes actively synthesize fatty acids; however, only a small fraction was incorporated into cholesterol. Addition of high fat content to the soy protein or casein diets reduced the rate of [^{14}C] incorporation into fatty acids by 53 and 77%, respectively, as compared to the control groups.

Glycerol release from isolated adipocytes.

To establish if there was a difference in the lipolytic capacity of the adipocytes of the groups studied, we measured the amount of glycerol released into the medium from incubated adipocytes. The data showed that adipocytes from rats fed the Soy diet released

significantly less glycerol than cells from the groups fed HF diets. Adipocytes from rats fed Cas diets tended to release more glycerol than those from rats fed Soy diets, although the difference did not reach statistical significance. (Fig 3C).

Transcriptome analysis of adipose tissue.

To study the effect of dietary protein type on the adipose tissue transcriptome of rats fed adequate or HF diets, we measured changes in global gene expression using Affymetrix RAE 230A arrays. Data on significantly regulated genes are summarized in figure 4A. After adequate fat consumption, expression levels of 219 genes (out of 14,200 genes analyzed) were significantly different between rats fed Soy and Cas (fold change > 1.4). After high fat consumption, expression levels 121 genes were significantly different between rats fed Soy and Cas. Analysis of genes differentially expressed in rats fed Soy or Cas diets and those fed Soy HF or Cas HF diets showed that 90 genes were differentially expressed as a result of the type of the dietary protein consumed (Fig 4A). Fifteen of these genes were downregulated, and 75 were upregulated by soy protein consumption. A list of regulated genes involved in adipose tissue metabolism is shown in Table 3. These genes fall into several different categories of biological function, including the renin-angiotensin system, adipokines, lipid metabolism, cytokines, signaling, and carbohydrate metabolism. qRT PCR analysis was performed for selected genes, which confirmed the array results (Fig. 4B). A hierarchical clustering of genes that were differentially regulated in adipose tissue of rats fed Soy versus Cas for 160 days is shown in figure 5. In addition to lipid and carbohydrate metabolism genes, this analysis showed that genes involved in the immune system, cytoskeleton regulation, and signal transduction were overrepresented. Genes that were highly over- or under-expressed in adipose tissue of rats fed Cas compared to Soy are

shown in Tables 4, and Cas HF versus Soy HF are shown in Table 5. Interestingly, the function of many of the latter genes in adipose tissue remains unknown. We also searched the potential biological interaction networks that are activated in the adipose tissue of rats fed Soy, Cas, Soy HF, and Cas HF diets using the Ingenuity Pathways Analysis. For the comparison of genes in the adipose tissue of rats fed soy protein or casein with adequate fat content, 341 genes were considered for the network analysis, obtaining a score of 14 ($p < 0.05$) (Fig 6A). Subsequently, we analyzed these interactions in adipose tissue between the groups fed Soy HF and Cas HF diets, using 303 genes for this purpose, and the maximal score was 11 ($p < 0.05$) (Fig 6B). For the comparing the Soy versus Soy HF diet and the Cas versus Cas HF diet, 711 and 225 genes were considered for network analysis, with scores of 9 and 22, respectively. In the last two comparisons, the leptin gene was greatly induced and appeared as a main node. Additionally, the networks showed that soy protein consumption reduced leptin expression as compared to casein consumption. In contrast, consumption of Soy HF or Cas HF diets increased leptin expression compared to consumption of Soy or Cas diets, as observed in the network analysis of figs 6C and 6D.

Leptin mRNA expression in adipose tissue.

Since leptin was found to be a central node in the network analysis, we measured by qRT-PCR the expression of leptin mRNA in adipose tissue from rats fed each of the experimental diets. There was an agreement between the network analysis and leptin mRNA expression because adipose tissue from rats fed Soy HF or Soy expressed

significantly less leptin mRNA than the respective groups fed Cas HF or Cas (Fig. 7A). Secretion of leptin from cultured adipocytes (Fig. 7B), as well as serum leptin concentration (Fig. 7C) from rats fed Cas or Soy diets, followed a similar trend in leptin mRNA abundance, particularly in the groups fed high-fat diets. Therefore, it seems that the type of dietary protein can influence adipocyte leptin expression, thus modulating the cell's metabolic response.

Regulation of gene expression in adipose tissue by soy protein.

Expression of PPAR γ and PPAR α (Fig. 8A, 8C) was significantly higher in the Soy group than the Cas group, indicating a more active adipogenic and oxidative capacity in rats fed soy protein. We did not observe significant differences in the expression of SREBP-1, FAS, or UCP-1 between the Soy and Cas groups (Fig. 8B, 8E, 8D). The addition of high fat content to the diet reduced the expression of PPAR γ , PPAR α , SREBP-1, and FAS but increased UCP-1 mRNA concentration.

DISCUSSION

Obesity has been associated with the consumption of high-carbohydrate or high-fat diets [11, 24, 25]. However, few studies have focused on the effect of dietary protein on the development of obesity. Our results show that the type of dietary protein has a significant influence on adipose tissue phenotype. This is the first study to analyze in depth the genomic and metabolic changes that occur in adipose tissue as a result of the consumption

of dietary soy protein. Soy diets reduced adipocyte size due to a reduction in the triglyceride/DNA ratio, indicating an increase in fat cell number and thus preventing hypertrophy. In contrast, Cas diets produced the opposite effect. We believe that these changes are in part the result of hormonal modifications, as the findings of this study and evidence from previous studies [26, 27] both demonstrate that soy protein prevents excessive elevation of serum insulin and leptin concentrations. We have previously demonstrated that consumption of soy protein was able to stimulate insulin secretion to a lower extent [27]. In addition, we found in this study that soy protein reduced leptin mRNA expression in adipose tissue, resulting in low levels of circulating serum leptin.

The specific mechanism by which soy protein reduces leptin mRNA expression is not known. A possible explanation is that the prevention of hyperinsulinemia by soy protein reduces the abundance of leptin mRNA. It has been postulated that a feedback loop between adipose tissue and the pancreas regulates the secretion of leptin and insulin, respectively. It is known that leptin regulates insulin secretion by several mechanisms: by increasing β -oxidation and decreasing lipogenesis, thus preventing β -cell lipotoxicity [28]; by activating K_{ATP} channels in the β -cell [29]; and by reducing insulin mRNA levels [30]. On the other hand, insulin modulates leptin synthesis and secretion via both transcriptional and translational mechanisms [31, 32]. Thus, soy protein, by maintaining normal serum insulin and leptin concentrations, leads to an improved sensitive response to these hormones in target organs and tissues, including adipocytes. These hormonal changes are also responsible for maintaining low retroperitoneal adipose tissue weight. In fact, it has

been demonstrated that serum leptin concentration is associated with the amount of adipose tissue [33, 34].

Several studies have shown that serum leptin not only regulates hypothalamic and peripheral tissues but also regulates adipocyte metabolism by a paracrine mechanism [35]. Our microarray analysis showed increased STAT3 and decreased SOCS7 expression in adipose tissue of rats fed the Soy diet, suggesting that soy protein contributes to leptin sensitivity. Although SOCS7 has been shown to enhance insulin sensitivity [36], its function in adipocytes is unknown. Furthermore, it has been established that PPAR α is a target gene of leptin in non-adipose tissues such as liver [4]. Our results suggest that leptin may also stimulate PPAR α expression in adipose tissue; however, more studies are needed to understand this interaction. Nevertheless, the increase of PPAR α by soy protein can promote adipocyte fatty acid oxidation, preventing triglyceride over-accumulation in adipocytes and thus reducing hypertrophy, as observed in this study.

Soy protein also seems to stimulate insulin sensitivity in adipose tissue. We have previously demonstrated that consumption of soy protein increases peripheral insulin sensitivity. Our results extend this finding to adipose tissue, where microarray analysis showed an increased expression of IRS-3 and Akt. We were expecting a significant increase in lipogenesis mediated by insulin in rats fed the soy protein diet; however, despite the trend observed for SREBP-1, statistical significance was not reached for the rate of incorporation of [^{14}C] acetate into fatty acids. Addition of high fat to the diets reduced adipocyte lipogenesis for both the Soy and Cas diets. However, rats fed Soy HF had less of

a decrease in lipogenesis. It is important to determine the role of SREBP-1 in controlling lipogenesis in adipose tissue because there is controversial evidence in the literature indicating that SREBP-1 may [37] or may not [38] contribute to adipocyte lipogenesis.

Interestingly, the lower serum leptin concentration in rats fed soy protein was associated with an increase in PPAR α and PPAR γ mRNA in adipose tissue. Thus, our results reflect an active balance between fatty acid synthesis and oxidation, leading to smaller adipocyte area and increased adipogenic capacity of adipose tissue in rats fed soy protein. An increase in PPAR γ by soy protein also reduced the expression of inflammatory genes (Table 3). In fact, high expression of PPAR γ , an essential transcription factor for preadipocyte differentiation, has been associated with a decrease in systemic inflammation accompanied by a decrease in adipocyte expression of proinflammatory cytokines [39]. Furthermore, the increase in PPAR γ after the consumption of soy protein was associated with an increase in the expression of the adiponectin receptor. It has been reported that adiponectin receptor expression in white adipose tissue is controlled by PPAR γ [40]. Thus, the effect of adiponectin on adipocytes is mediated by the amount of adiponectin receptor, as well as the concentration of serum adiponectin. Nonetheless, in the present study, serum adiponectin was reduced in the Soy groups, in contrast to a previous study showing that consumption of this protein increases serum adiponectin concentration [41]. However, it is unclear whether the secretion of this hormone is different in short-term versus long-term dietary treatments, but this could explain the ambiguity between results.

Other potential sites of regulation of lipogenesis and lipolysis in adipocytes by the type of dietary protein were explored through biological interaction networks among differentially regulated genes using Ingenuity Pathways analysis. This analysis revealed an important finding, that one of the central modified genes (or nodes) was leptin. Leptin expression was downregulated in the adipose tissue of rats fed Soy or Soy HF diets as compared to those fed Cas or Cas HF. When leptin expression was downregulated by soy protein, there was an increase in the expression of fatty acid synthase (FAS or FASN in the pathway analysis) and acetyl CoA carboxylase alpha (ACC or ACACA). In contrast, addition of HF to diet caused upregulation of leptin in adipose tissue and decreased FAS and ACC expression. Furthermore, downregulation of leptin expression by soy protein was accompanied by a decrease in the expression of the hormone sensitive lipase (HSL or LIPE in the pathway analysis), an important enzyme in the regulation of adipocyte lipolysis [42] with no significant change in the expression of uncoupling protein 1 (UCP1), which is involved in the thermogenic process [43].

Our results also showed that the dietary protein type significantly modified a large set of genes involved in different biological functions, including the renin-angiotensin system, adipokines, lipid metabolism, cytokines, signaling genes, carbohydrate metabolism, immune response, cytoskeleton, and certain unknown genes. Some of these genes, such as fatty acid binding protein, leptin and its receptor, Na^+/K^+ -ATPase, phosphofructokinase, pyruvate dehydrogenase, heat shock proteins, and adenylate cyclase play metabolic roles. In addition to changes in the expression of metabolic genes, we found a set of genes that were the most overexpressed, including Similar to immunoglobulin heavy chain 6, glycosylation dependent cell adhesion molecule 1, acidic nuclear phosphoprotein 32 family

member A, claudin 10, phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2, and profilin 1, among others, or underexpressed, such as Similar to cornifin A, Keratin complex 1 acidic gen 19, and myosin-like polypeptide kinase. However, the biological roles in adipose tissue of some of these genes remains unknown.

The addition of high fat content to the diets increased the serum free fatty acid concentration in the Cas HF group more than in the Soy HF group. This pattern was also seen for the release of glycerol from adipocytes in these groups. Excessive release of free fatty acids is related to an increase in adipocyte size, elevated macrophage infiltration, and a limited capacity of adipocytes to accommodate excess energy surplus; these factors, together with altered adipokine secretion, leads to ectopic lipid deposition [44]. Therefore, there is an increase in the flux of free fatty acids from the adipocyte to non-adipose tissues. When lipids over-accumulate in non-adipose tissues during overnutrition, fatty acids enter deleterious pathways. One such pathway is ceramide production, which, through increased nitric oxide formation, causes apoptosis of β cells, myocardium, and skeletal muscle, leading to type 2 diabetes, cardiomyopathy, and insulin resistance, respectively [45]. In the liver, ceramide overproduction is associated with hepatic steatosis, which under certain circumstances may lead to fibrosis and cirrhosis. Our group has demonstrated that soy protein has a protective role against lipid accumulation and lipotoxicity in the pancreas and liver of different animal models of obesity, such as diet-induced obesity rats and Zucker fa/fa rats. The findings of these previous studies suggest that lipid accumulation in non-adipose tissues is influenced by a reduced rate of influx of fatty acids from adipose tissue into the bloodstream [15, 27, 46].

In summary, the type of dietary protein modifies the gene expression profile of adipose tissue, resulting in biochemical changes that affect its metabolic functionality. The type of protein consumed also influences adipocyte size and function, which is associated with the development of obesity and its complications. Our results indicate that soy protein prevents obesity and adipocyte hypertrophy, maintains lipid synthesis and oxidation equilibrium, changes gene expression patterns, and reduces the expression of inflammatory genes. Therefore, soy protein could be used as a dietary strategy for the prevention or treatment of the metabolic abnormalities of obesity.

REFERENCES

1. Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology*. 2007; 132:2103-15.

2. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1997; 145:614-9.
3. Stevens G, Dias RH, Thomas KJ, et al. Characterizing the epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med.* 2008; 5:e125.
4. Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *Faseb J.* 2001; 15:312-21.
5. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395:763-70.
6. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem.* 2001; 276:5629-35.
7. Cohen P, Zhao C, Cai X, et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest.* 2001; 108:1113-21.
8. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, et al. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:4317-27.
9. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008; 34:2-11.
10. Ramirez I, Friedman MI. Dietary hyperphagia in rats: role of fat, carbohydrate, and energy content. *Physiol. Behav.* 1990; 47:1157-63.

11. Genuth SM. Effect of high fat vs. high carbohydrate feeding on the development of obesity in weanling ob/ob mice. *Diabetologia*. 1976; 12:155-9.
12. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001; 2:282-6.
13. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2007; 65:S7-12.
14. Davis J, Higginbotham A, O'Connor T, et al. Soy protein and isoflavones influence adiposity and development of metabolic syndrome in the obese male ZDF rat. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51:42-52.
15. Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragan VE, et al. Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr*. 2008; 138:462-8.
16. Velasquez MT, Bhathena SJ. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci*. 2007; 4:72-82.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method for RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162:156-59.
18. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003; 19:185-93.
19. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004; 3:Article3.

20. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: editors. Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, R. New York: Springer; 2005. pp. 397-420.
21. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem.* 1966; 241:3909-17.
22. Yu Y-H,Zhu H. Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286:E402-E10.
23. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest.* 1998; 101:1354-61.
24. Buettner R, Scholmerich J,Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007; 15:798-808.
25. Noguchi T,Tanaka T. Insulin resistance in obesity and its molecular control. *Obes Res.* 1995; 3 Suppl 2:195S-98S.
26. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, et al. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* 2004; 134:522-9.
27. Noriega-Lopez L, Tovar AR, Gonzalez-Granillo M, 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; 282:20657-66.
28. Unger RH, Zhou YT,Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:2327-32.

29. Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, et al. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 1997; 46:1087-93.
30. Pallett AL, Morton NM, Cawthorne MA, et al. Leptin inhibits insulin secretion and reduces insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 238:267-70.
31. Lee MJ, Fried SK. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296:E1230-8.
32. Lee MJ, Yang RZ, Gong DW, et al. Feeding and insulin increase leptin translation. Importance of the leptin mRNA untranslated regions. *J Biol Chem*. 2007; 282:72-80.
33. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 967:379-88.
34. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999; 130:671-80.
35. Wang MY, Orci L, Ravazzola M, et al. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:18011-6.
36. Banks AS, Li J, McKeag L, et al. Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J Clin Invest*. 2005; 115:2462-71.
37. Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, et al. Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. *J Biol Chem*. 2003; 278:36652-60.

38. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res.* 2007; 48:1581-91.
39. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest.* 2007; 117:2621-37.
40. Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes.* 2005; 54:3358-70.
41. Nagasawa A, Fukui K, Kojima M, et al. Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 311:909-14.
42. Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, et al. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res.* 2001; 9:119-28.
43. Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J.* 2000; 345 Pt 2:161-79.
44. Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, et al. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19:146-52.
45. Kusminski CM, Shetty S, Orci L, et al. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 2009;
46. Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, et al. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res.* 2005; 46:1823-32.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Hematoxylin and eosin staining reveals decreased adipocyte size in retroperitoneal adipose tissue from rats fed soy protein.* Adipose tissue from rats fed A) casein (Cas), B) casein high fat (Cas HF), C) soy protein (Soy), and D) soy protein high fat (Soy HF) for 160 days. Results represent the mean \pm SEM, n=5. Means without a common letter differ, p<0.05.

Figure 2. *Soy protein consumption prevents adipocyte hypertrophy.* A) Adipocyte area, B) Adipose tissue triglyceride content, C) Adipose tissue DNA content, and D) Adipose tissue triglyceride/DNA ratio from rats fed casein (Cas), casein high fat (Cas HF), soy protein (Soy) and soy protein high fat (Soy HF) for 160 days. Results represent the mean \pm SEM, n=5. Means without a common letter differ, $p < 0.05$.

Figure 3. *High-fat diets promote decreased lipogenesis and increased lipolysis in vitro.* A) [^{14}C] acetate incorporation into fatty acids. B) [^{14}C] acetate incorporation into cholesterol. C) Glycerol release from retroperitoneal adipocytes of rats fed casein (Cas), casein high fat (Cas HF), soy protein (Soy) and soy protein high fat (Soy HF) for 160 days. The results represent the mean \pm SEM, n=5. Means without a common letter differ, $p < 0.05$.

Figure 4. *Soy protein diet induces differential gene expression in adipose tissue, based on Affymetrix RAE 230A arrays validated by qRT PCR.* A) Venn plot representing number of modified genes in adipose tissue of rats fed soy protein (Soy) versus casein (Cas), and soy protein high fat (Soy HF) versus casein high fat (Cas HF) and intersected genes between these comparisons. B) Fold changes of genes analyzed by quantitative real-time-PCR and compared with their corresponding fold changes detected by microarray.

Figure 5. *Hierarchical clustering of soy protein modified genes.* A hierarchical search of genes was based on log-fold changes. All of these expressed genes in the RAE 230A chip were clustered based on their expression patterns across the 12 samples using R software.

Figure 6. *Generation of biological interaction networks identifies central genes.* Ingenuity Pathway Analysis was used to search for biological interaction networks. Four networks scored best. A) Soy versus Cas, B) Soy HF versus Cas HF, C) Cas HF versus Cas, and D) Soy HF versus Soy. Color-coding: red, upregulated genes; green, downregulated genes. The intensity of the colors indicates the degree of up- or downregulation, respectively; a greater intensity represents a higher degree of regulation.

Figure 7. *Leptin.* mRNA abundance in adipose tissue (A), its secretion from isolated adipocytes (B), and serum concentration (C), from rats fed casein (Cas) or soy protein (Soy), and Cas high fat (Cas HF) or Soy high fat (Soy HF) diets. Results represent the mean \pm SEM, n=5. Means without a common letter differ, $p < 0.05$.

Figure 8. *Expression of lipogenic and fatty acid oxidation genes.* Relative mRNA abundance of PPAR γ (A), SREBP-1 (B), and PPAR α (C), UCP-1 (D) and FAS (E) was measured by qRT-PCR and normalized to HPRT from rats fed casein (Cas) or soy protein (Soy), and Cas high fat (Cas HF) or Soy high fat (Soy HF) diets. Results represent the mean \pm SEM, n=5. Means without a common letter differ, $p < 0.05$.

Table(s)

TABLE 1. Composition of experimental diets.

Ingredients (%)	Cas	Soy	Cas HF	Soy HF
Casein ¹ or soy protein ²	33.11	34.09	33.11	34.09
Dextrose	27.86	27.37	17.86	17.37
Cornstarch	27.86	27.37	17.86	17.37
Corn oil	5	5	5	5
Lard	0	0	20	20
Mineral mix ³	5	5	5	5
Vitamin mix ⁴	1	1	1	1

¹ "Vitamin-free" casein, Harlan Teklad research diets, Madison, WI.

² Supro 710, Solae, México City.

³ Rogers-Harper, Harlan Teklad research diets, Madison, WI.

⁴ AIN-93-VX, Harlan Teklad research diets, Madison, WI: (mg/Kg diet): nicotinic acid, 150; calcium pantothenate, 80; pyridoxine-HCl, 35; thiamin HCl, 30; riboflavin, 30; folic acid, 10; D-biotin, 1; vitamin B12; 0.1; DL-alpha tocopheryl acetate, (500 IU/g), 750; vitamin A palmitate (500,000 IU/g), 40; vitamin D₃ (cholecalciferol, 500,000 IU/g), 10; vitamin K (phylloquinone), 3.75.

TABLE 2. Weight gain, food and energy intake, serum triglyceride, cholesterol and free fatty acid concentration, and adiponectin/leptin ratio in rats fed casein or soy protein containing adequate or high fat content for 160 days.

Parameter	Cas	CasHF	Soy	SoyHF	p-value		
					Protein	Fat	
Weight gain (g)	364 ± 8.44	409 ± 7.90	346 ± 6.91	396 ± 11.1	0.0785	<0.0001	NS
Food Intake (g/d)	19.5 ± 0.1	12.8 ± 0.7	17.8 ± 0.7	13.9 ± 0.4	0.0662	<0.0001	NS
Energy intake (kCal/d)	75.4 ± 3.7	78.4 ± 3.3	77.1 ± 3.4	74.9 ± 2.9	0.0655	NS	NS
Retroperitoneal adipose tissue weight (g)	8.22 ± 0.53 ^b	12.9 ± 1.7 ^a	4.0 ± 0.7 ^c	6.3 ± 0.5 ^{b,c}	NS	NS	0.0294
Serum triglycerides (mmol/L)	0.42 ± 0.09	0.43 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.0261	NS	NS
Serum cholesterol (mmol/L)	2.29 ± 0.05	2.50 ± 0.08	2.08 ± 0.05	2.57 ± 0.06	NS	NS	NS
Free fatty acids (mmol/L)	1.13 ± 0.08	1.72 ± 0.17	0.99 ± 0.05	1.26 ± 0.02	0.0005	<0.0001	0.0123
Serum adiponectin (µg/ml)	56.1 ± 5.3	70.2 ± 19.5	60.8 ± 6.9	45.7 ± 9.7	0.033	NS	NS
Adiponectin/leptin ratio	2.28 ± 0.12	0.88 ± 0.01	3.54 ± 0.58	1.38 ± 0.25	NS	0.0007	NS
Serum IL-6 (pg/ml)	135 ± 25.7	112 ± 32.2	65.5 ± 18.2	133 ± 46.4	NS	NS	NS

Serum Glucose (mmol/L)	5.05 ± 0.07	6.83 ± 0.06	5.00 ± 0.29	6.24 ± 0.15	NS	< 0.001	NS
Serum insulin (pg/ml)	515 ± 59.8 ^b	845 ± 195 ^a	115 ± 27.2 ^c	478 ± 55 ^b	NS	NS	0.05
Serum TNF- α (pg/ml)	6.28 ± 0.60	7.27 ± 0.63	6.51 ± 0.37	6.29 ± 0.57	NS	NS	NS

Values are means ± SEM. Different letters superscripts indicate significant differences among row (P < 0.05). n=15 rats/per group.

TABLE 3. Differentially expressed transcripts of metabolically relevant genes in adipose tissue of rats fed casein or soy protein and casein or soy protein high fat diets for 160 days.

Affymetrix ID	Gene	C vs S (FC)	p value	CHF vs SHF (FC)	p value
Renin-angiotensin system					
1387791_at	Angiotensin converting enzyme	0.84	0.033		
1369439_at	Angiotensin receptor 1b	0.91	0.045		
Adipokines					
1387748_at	Leptin	2.18	0.003		
	Leptin receptor			0.92	0.05
1388373_at	Adiponectin receptor	0.84	NS		
1371876_at	Tumor necrosis factor 5			1.17	0.006
1376327_at	Tumor necrosis factor receptor 14	1.51	0.003		
Lipid metabolism					
1386880_at	Acetyl CoA acyltransferase 2			1.44	0.002
1370893_at	Acetyl CoA carboxylase alpha			0.69	0.027
	Acyl CoA dehydrogenase, very long chain	1.15	0.042	1.18	0.0214
1367708_a_at	Fatty acid synthase	1.34	0.008	0.74	0.0077
1387132_at	Hormone sensitive lipase			1.52	0.0067
1375852_at	Hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase	0.87	0.021		
1375209_at	Oxyesterol binding protein-like 11	0.81	0.016	1.23	0.0165
1369098_at	Very low density lipoprotein receptor	1.14	0.013	1.24	0.0055
1390383_at	Adipose differentiation related protein	0.75	0.038		
1371038_at	CCAAT enhancer binding protein gamma	1.18	0.007	1.11	0.046

1367660_at	Fatty acid binding protein 3	1.5	0.002		
1368271_a_at	Fatty acid binding protein 4			1.15	0.035
1368941_at	Prostaglandin E receptor	1.16	0.016	0.9	0.016
1368989_at	Tissue inhibitor of metalloproteinase3	1.4	0.017	0.41	0.0002
Cytokines					
1376895_at	Interleukin 16	1.3	0.0007		
1369665_a_at	Interleukin 18	1.19	0.007		
1370728_at	Interleukin 13 receptor, alpha 1			1.15	0.0085
Signaling					
1370196_at	Signal transducer and activator of transcription 3	0.91	0.038		
1377131_at	Suppressor of cytokine signaling 7			1.13	0.044
1372879_at	AKT 1 substrate 1	0.78	0.015	1.18	0.048
1368486_at	Insulin receptor substrate 3	0.72	0.022		
1370114_a_at	PI3K, regulatory subunit 1	1.14	0.009	1.35	0.028
Carbohydrate metabolism					
1369794_a_at	6-phosphofructo-2-kinase	1.29	0.0096	1.91	3.2 E-05
1369967_at	Citrate synthase	1.45	0.0002	1.21	0.0083
1369560_at	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	2.99	1.29E-05	1.59	0.0029
AFFX_Rat_Hexokinase_M_at	Hexokinase 1	1.85	0.00097	1.36	0.034
1368674_at	Liver glycogen phosphorylase	1.16	0.008		
1383698_at	Piruvate dehydrogenase E1 alpha 1	1.7	8.1E-05		
1386917_at	Piruvate carboxylase			1.28	0.036
1371311_at	Succinate dehydrogenase, subunit C	1.16	0.023		

TABLE 4. Transcripts of genes highly over or under expressed in adipose tissue of rats fed casein vs soy protein diet for 160 days.

Affymetrix ID	Gene	Fold change	p value
Over-expressed			
1387902_a_at	Similar to IG KAPPA CHAIN V-V REGION K2 PRECURSOR	8.47	9.37E-07
1388166_at	Similar to immunoglobulin heavy chain 6 (Igh-6)	5.39	1.17E-06
1368337_at	Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	3.03	0.0014
1369560_at	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	2.99	1.29E-05
1369063_at	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A		2.47E-06
1370967_at	Claudin 10	2.37	0.0098
1368551_at	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	2.23	0.0069
1387748_at	Leptin	2.18	0.0029
1368321_at	Early growth response	2.15	2.58E-05
1370131_at	Caveolin	2.10	6.22E-05
Under-expressed			
1370863_at	Keratin complex 2, basic, gene	0.62	2.70E-05
1367721_at	Syndecan 4	0.61	0.0007
1371725_at	Myosin, heavy polypeptide 9	0.61	0.0291
1371237_a_at	Metallothionein 1a	0.61	0.0002

1368145_at	Purkinje cell protein 4	0.57	5.11E-06
1368810_a_at	Myelin basic protein	0.56	0.0004
1372153_at	Type I keratin KA15	0.55	1.93E-06
1371541_at	Myosin, light polypeptide kinase	0.52	0.0004
1388433_at	Keratin complex 1, acidic, gene 19	0.46	6.67E-06
1371248_at	Similar to Cornifin A (Small proline-rich protein 1A)	0.38	9.25E-06

TABLE 5. Transcripts of genes highly over or under expressed in adipose tissue of rats fed casein high fat diet in comparison with those fed soy protein high fat diet for 160 days.

Affymetrix ID	Gene	Fold change	p value
Over-expressed			
1387748_at	Leptin	2.24	0.0024
1367605_at	Profilin 1	2.20	0.044
1387630_at	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	2.05	0.0037
1388271_at	Similar to Metallothionein-2	1.97	1.94E-05
1368821_at	Follistatin-like 1	1.92	0.0077
1369794_a_at	6-phosphofructo-2-kinase	1.91	3.17E-05
1370135_at	Caveolin 2	1.88	0.00043
1369736_at	Epithelial membrane protein 1	1.87	0.00183
1367660_at	Fatty acid binding protein 3	1.81	0.00019
1387769_a_at	Inhibitor of DNA binding 3	1.78	0.0038
Under-expressed			
1371248_at	Similar to Cornifin A (Small proline-rich protein 1A)	0.78	0.0260
1368806_at	Selenoprotein P, plasma, 1	0.77	0.0257
1367896_at	Carbonic anhydrase	0.76	0.0188
1367708_a_at	Fatty acid synthase	0.74	0.0077
1398364_at	Similar to chromosome 1 open reading frame 63	0.74	0.000998
1367555_at	Albumin	0.73	0.0394
1387189_at	Solute carrier family 22, member 3	0.71	0.0036
1398390_at	Similar to Small inducible cytokine B13 precursor (CXCL13) (B lymphocyte chemoattractant)	0.70	0.0055
1368321_at	Early growth response 1	0.70	0.0030
1370893_at	Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	0.69	0.0268

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

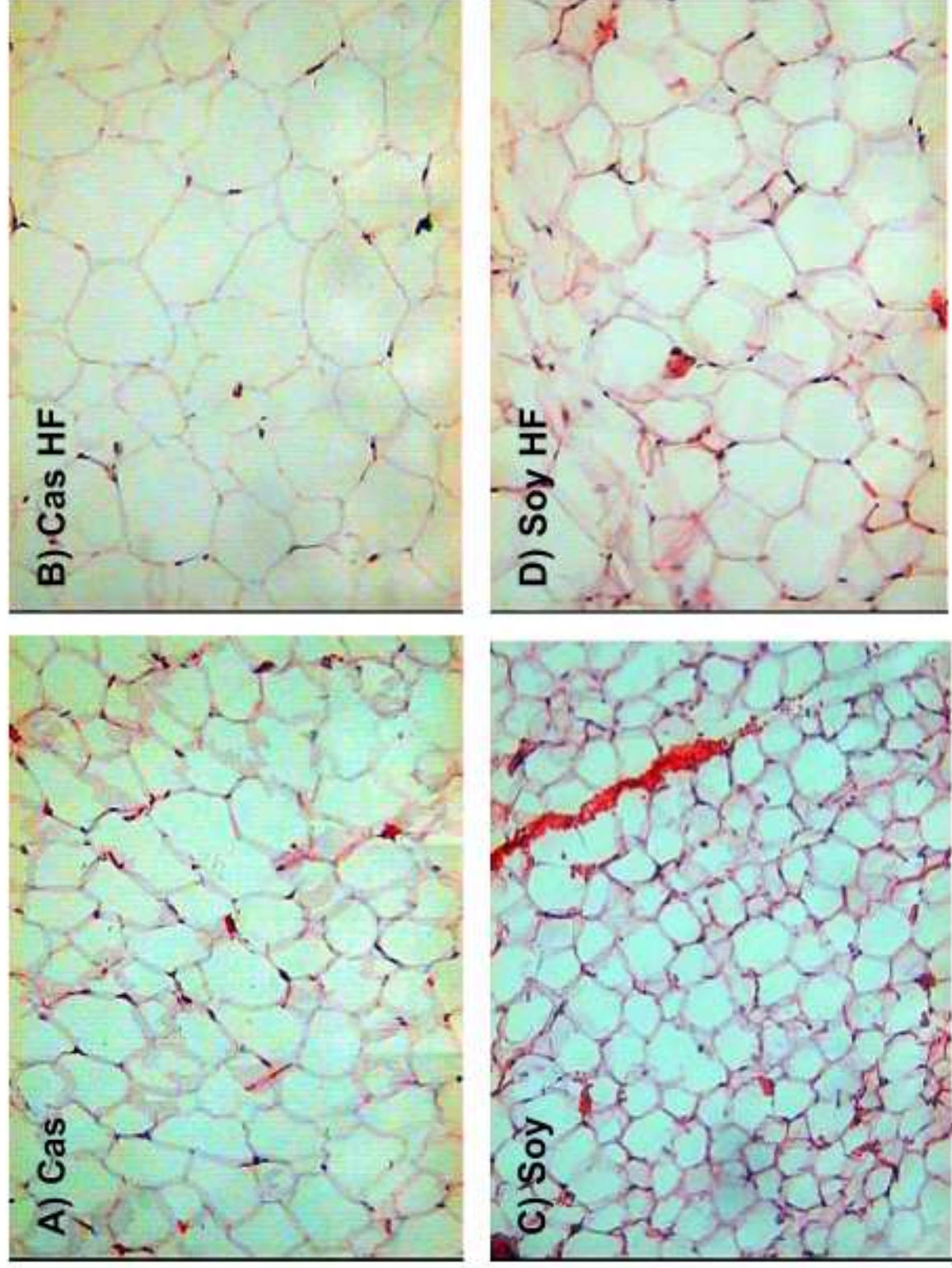


Figure 1

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

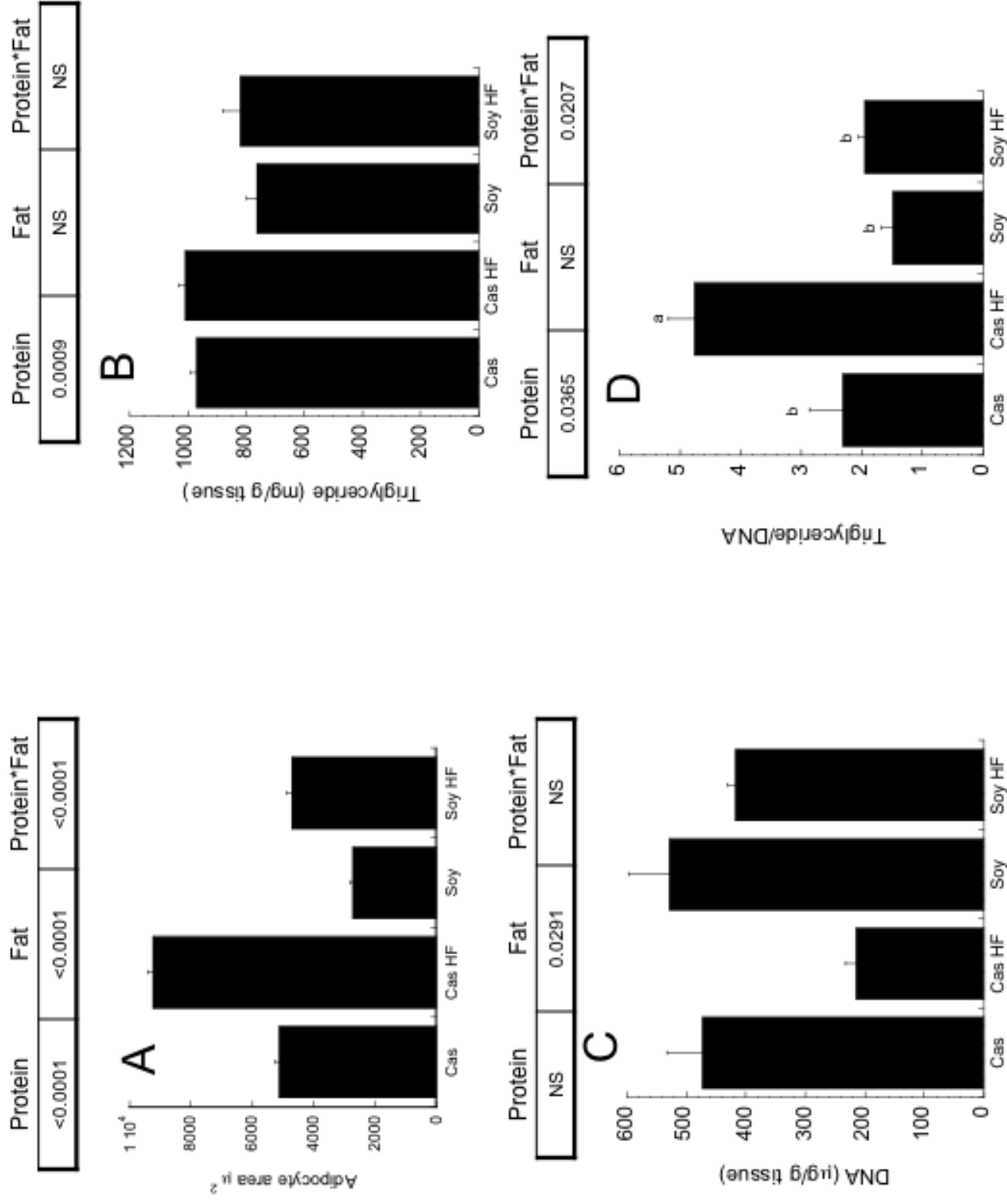


Figure 2

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

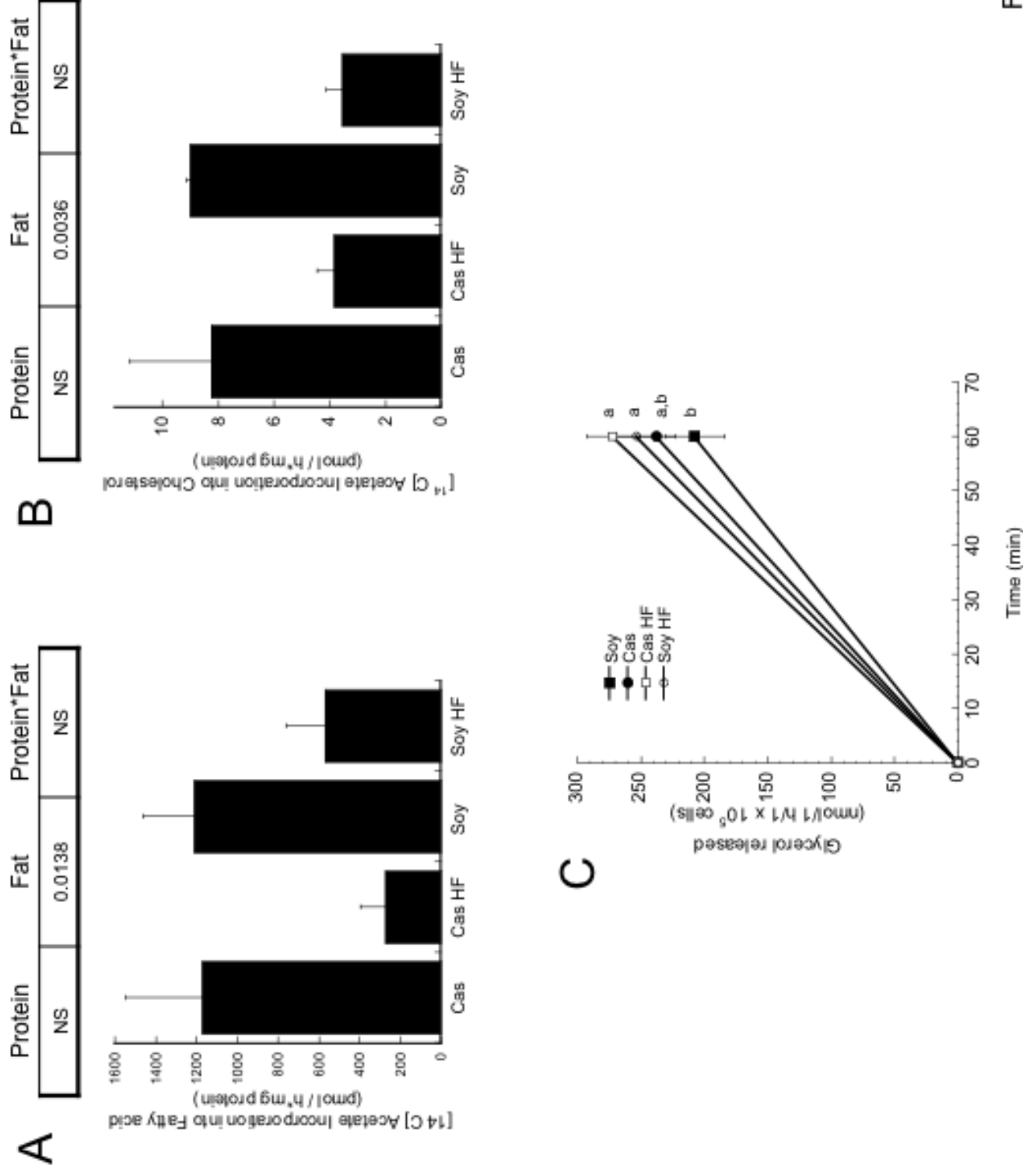


Figure 3

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

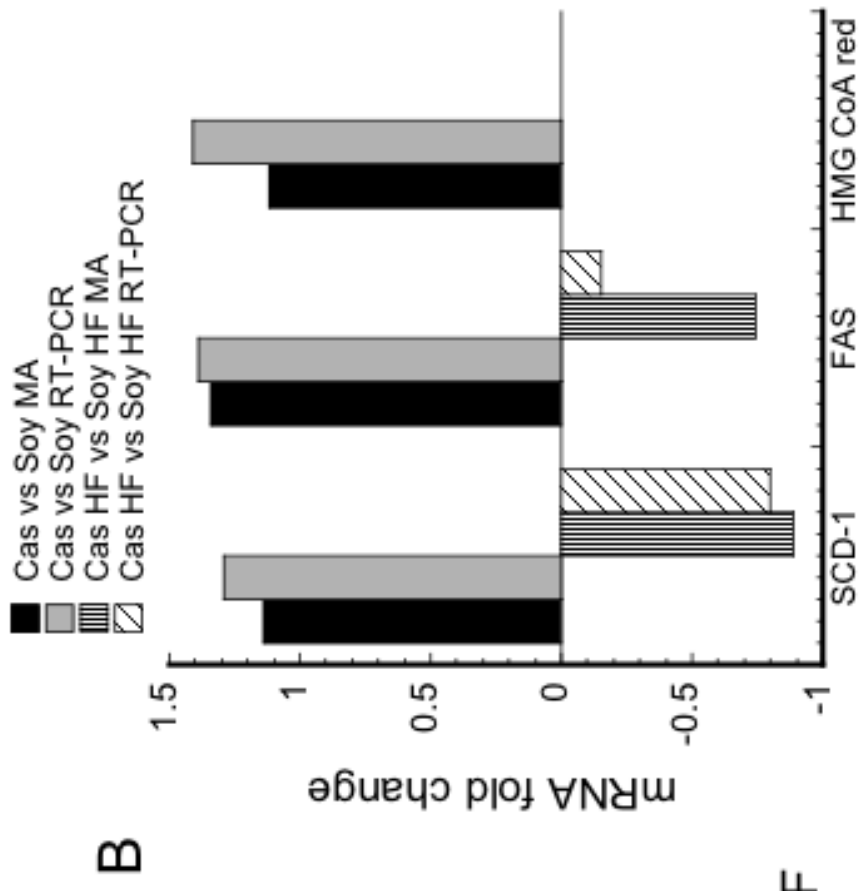


Figure 4

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

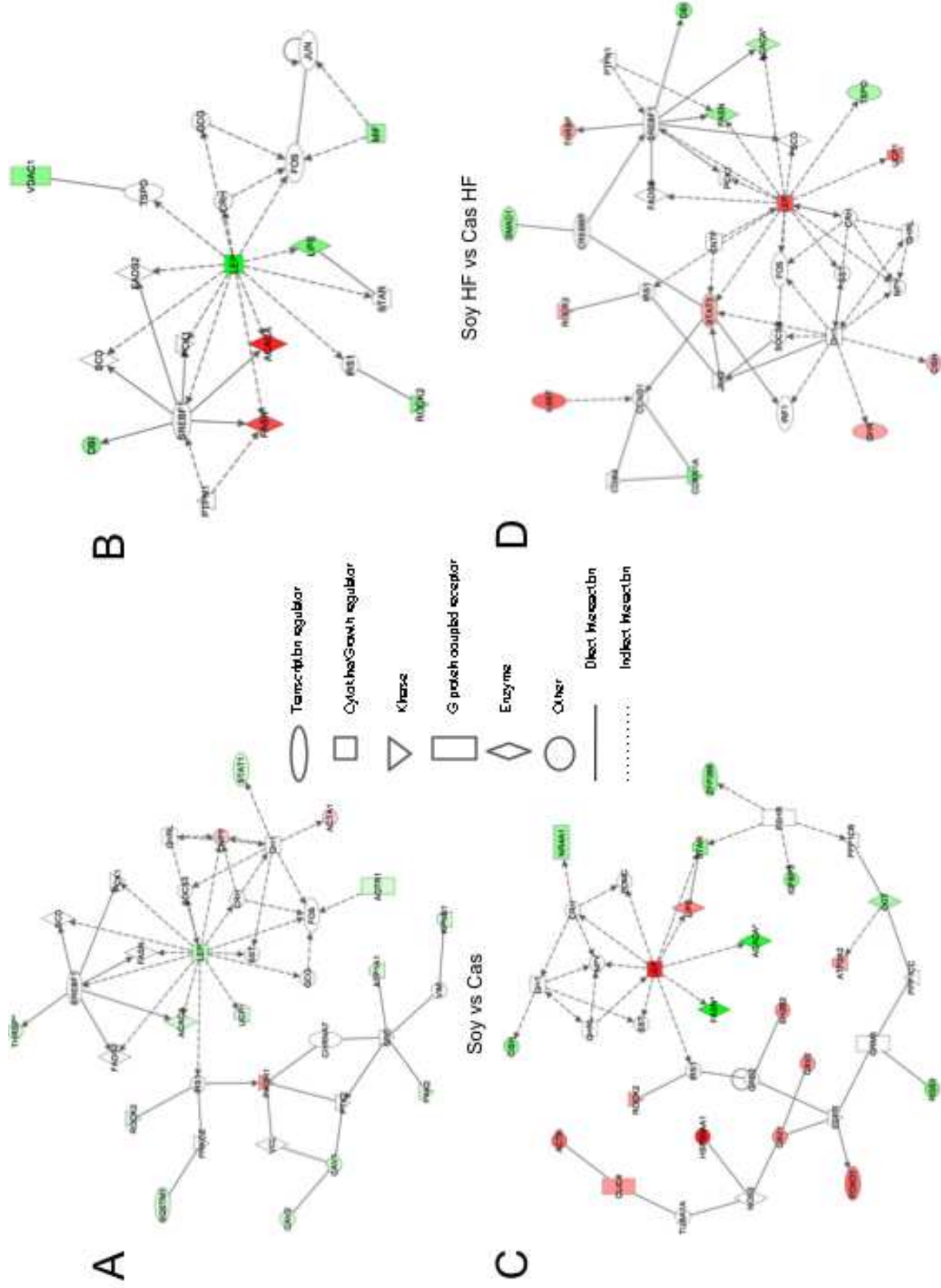


Figure 6

Soy HF vs Soy

Cas HF vs Cas

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

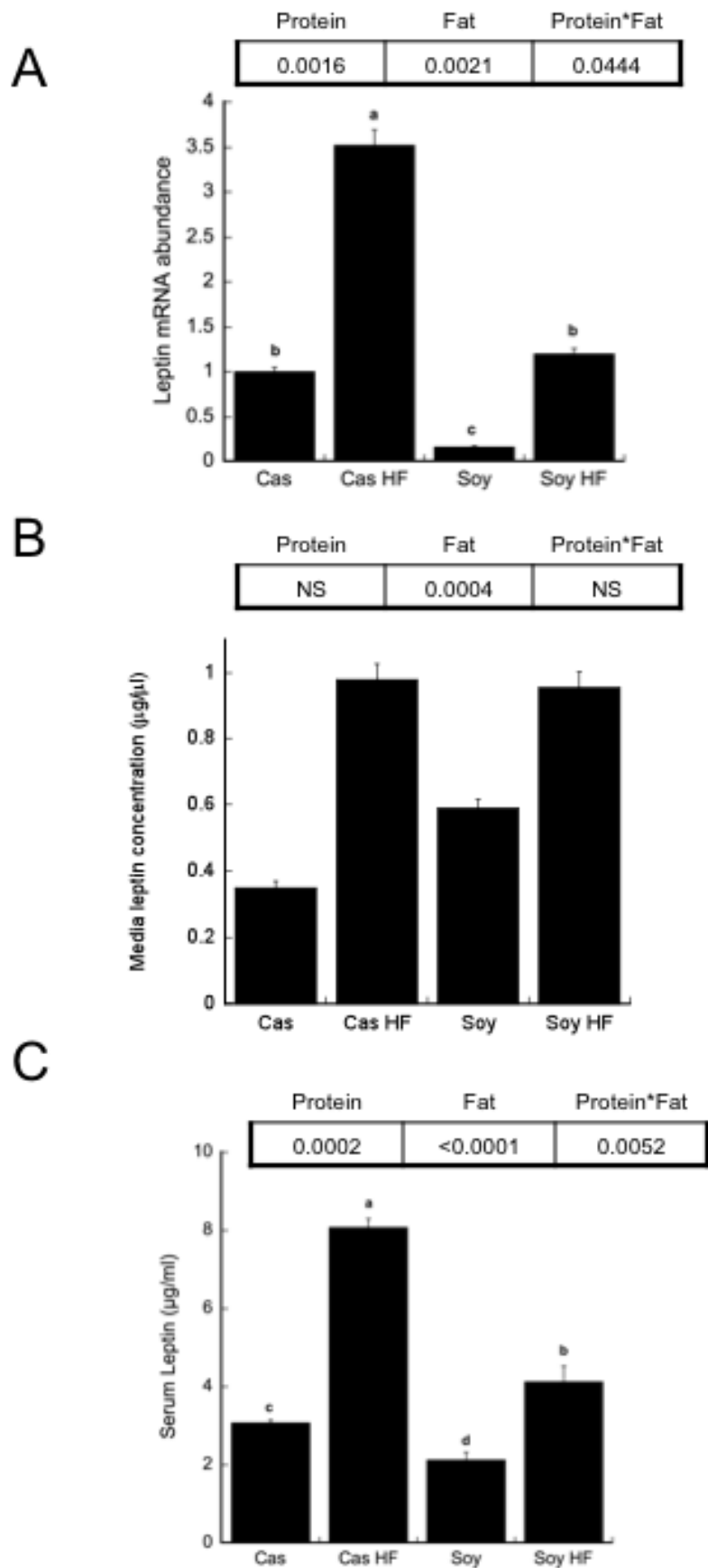


Figure 7

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

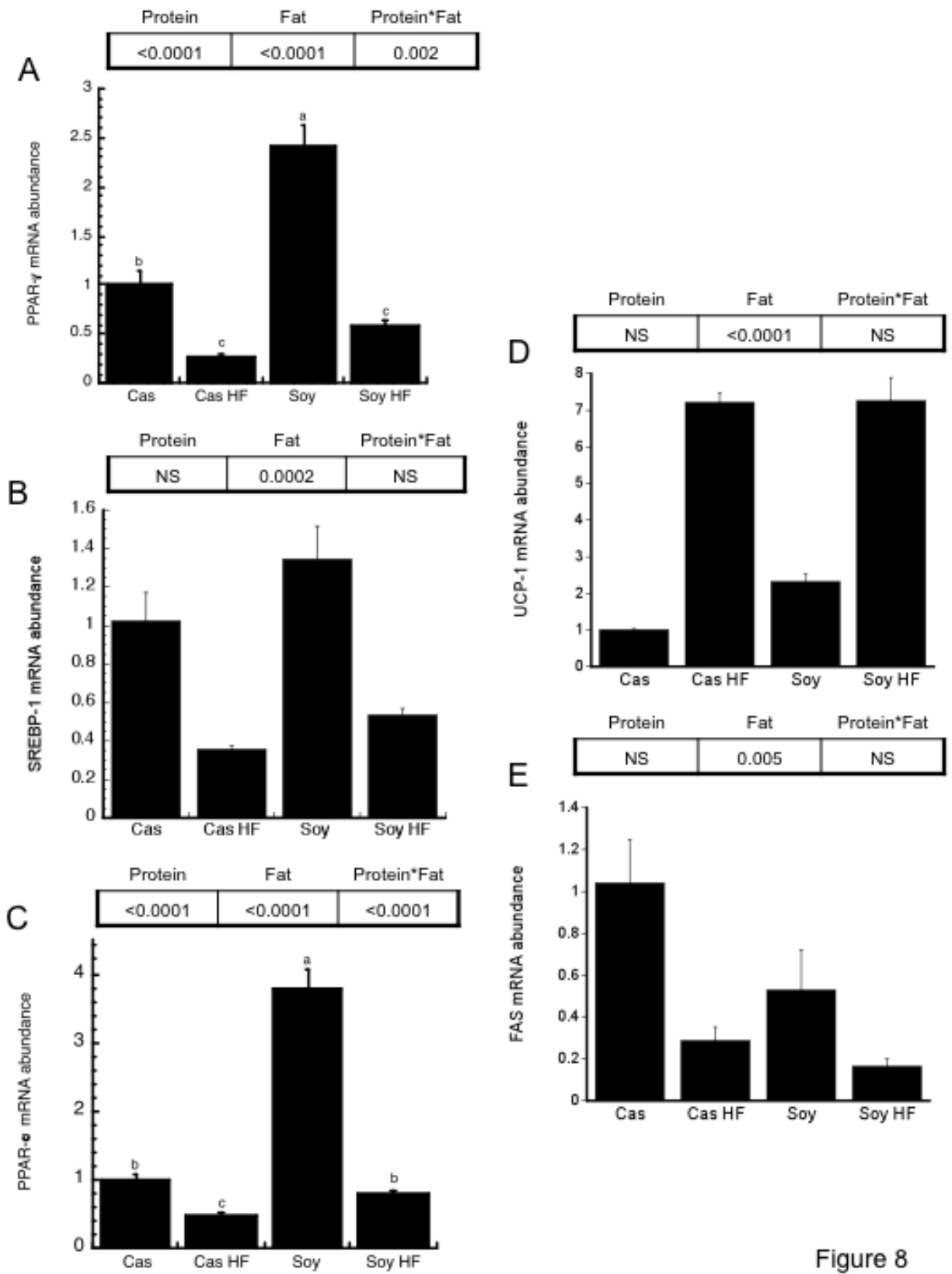


Figure 8