



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EFFECTO PROTECTOR DE LA PROTEÍNA DE SOYA SOBRE LA  
LIPOTOXICIDAD DEL CORAZÓN EN UN MODELO DE OBESIDAD  
INDUCIDA POR DIETA**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
Licenciado(a) en Nutrición  
P R E S E N T A

**Fabiola González Castelazo**

**Bajo la Dirección de:**

**Dr. Armando Tovar Palacio**

**Jefe del Depto. Fisiología de la Nutrición**

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador**

**Zubirán (INCMNSZ)**

**Codirector**

**Dr. Ivan Torre Villalvazo**

**Depto. Fisiología de la Nutrición**

**(INCMNSZ)**



**Pachuca,Hgo., Julio 2009.**

# **INDICE**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. RESUMEN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. ABSTRACT</b>   | <b>2</b>  |
| <b>3. MARCO TEÓRICO</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3.1. OBESIDAD</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3.1. a. FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y DEL<br/>SÍNDROME METABÓLICO</b>                       | <b>4</b>  |
| <b>3.1. b. OBESIDAD Y PROBLEMAS CARDIOVASCULARES</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3.2. LIPOTOXICIDAD</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3.3. PROTEÍNAS DE UNIÓN A ELEMENTOS REGULATORIOS DE<br/>ESTEROLES (SREBPs)</b>                | <b>9</b>  |
| <b>3.3. a. FAMILIAS DE SREBPs</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3.4. SERINA PALMITOIL TRANSFERASA (SPT)</b>   | <b>10</b> |
| <b>3.5. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES<br/>DE PEROXISOMAS (PPAR<math>\alpha</math>)</b> | <b>13</b> |
| <b>3.6. SOYA</b>   | <b>14</b> |
| <b>3.6. a. CONTENIDO NUTRIMENTAL</b>   | <b>14</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.6. b. BENEFICIOS DE LA SOYA</b>  | <b>16</b> |
| <b>4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>   | <b>17</b> |
| <b>5. JUSTIFICACIÓN</b>   | <b>18</b> |
| <b>6. OBJETIVOS</b>   | <b>19</b> |
| <b>6.1. OBJETIVO GENERAL</b>  | <b>19</b> |
| <b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>  | <b>19</b> |
| <b>7. HIPÓTESIS</b>   | <b>19</b> |
| <b>8. METODOLOGÍA</b>   | <b>20</b> |
| <b>8.1. a. SELECCIÓN DE LA MUESTRA</b>                                      | <b>21</b> |
| <b>8.1. b. PREPARACIÓN DE DIETAS</b>  | <b>22</b> |
| <b>8.1. c. OBTENCIÓN DE TEJIDOS</b>   | <b>22</b> |
| <b>8.2. DETERMINACION DE METABOLITOS EN SUERO</b>                           | <b>23</b> |
| <b>8.3. HISTOLOGÍAS</b>   | <b>23</b> |
| <b>8.4. ANÁLISIS DE CONTENIDO DE RNA mensajero<br/>POR PCR- Tiempo Real</b> | <b>23</b> |
| <b>8.4. a. CUANTIFICACIÓN DE RNA</b>  | <b>24</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>8.4. b. ELECTROFORESIS DE RNA</b>  | <b>25</b> |
| <b>8.5. EXTRACCIÓN DNA</b>  | <b>26</b> |
| <b>8.5.a. ELECTROFORESIS DE DNA</b>   | <b>27</b> |
| <b>8.6. EXTRACCION DE LÍPIDOS (TG Y CHOL)</b>   | <b>28</b> |
| <b>8.7. DETERMINACIÓN DE CERAMIDAS POR EL MÉTODO<br/>DIACIL GLICEROL CINASA (DGK)</b> | <b>28</b> |
| <b>8.7.a. DENSITOMETRÍAS</b>  | <b>29</b> |
| <b>8.8. COMPOSICION CORPORAL</b>  | <b>29</b> |
| <b>8.9. ANALISIS ESTADISTICO</b>  | <b>30</b> |
| <b>9. RESULTADOS</b>  | <b>30</b> |
| <b>10. DISCUSIÓN</b>  | <b>45</b> |
| <b>11. CONCLUSIONES</b>   | <b>49</b> |
| <b>12. PERSPECTIVAS</b>   | <b>50</b> |
| <b>13. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>51</b> |

## **LISTA DE FIGURAS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico</b>                               | <b>5</b>  |
| <b>Figura 2. Isoformas de las SREBP</b>   | <b>10</b> |
| <b>Figura 3. Ruta de ceramidas</b>  | <b>12</b> |
| <b>Figura 4. Composición de la soya</b>   | <b>15</b> |
| <b>Figura 5. Esquema de la Metodología</b>  | <b>20</b> |
| <b>Figura 6. Método para determinar ceramidas</b>                                     | <b>29</b> |
| <b>Figura 7. Ganancia de peso y consumo de alimento</b>                               | <b>31</b> |
| <b>Figura 8. Contenido de proteína y grasa corporal</b>                               | <b>33</b> |
| <b>Figura 9. Glucosa, insulina, colesterol y triacilgliceroles en suero.</b>          | <b>35</b> |
| <b>Figura 10. Tinción de corazón con Rojo Oleoso</b>                                  | <b>37</b> |
| <b>Figura 11. Expresión génica de PPAR<math>\alpha</math> y de SREBP-1 en corazón</b> | <b>39</b> |
| <b>Figura 12. Contenido de ceramidas en corazón</b>                                   | <b>40</b> |
| <b>Figura 13. Expresión génica de SPT1 y TNF<math>\alpha</math> en corazón</b>        | <b>42</b> |
| <b>Figura 14. Inducción de Apoptosis a células HepG2 con Thapsigargina</b>            | <b>43</b> |
| <b>Figura 15. Se muestra la integridad del ADN</b>                                    | <b>44</b> |

## **LISTA DE TABLAS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1. Contenido de la dieta control y experimental</b>                         | <b>22</b> |
| <b>Tabla 2. Reactivos para la preparación de muestras<br/>para la electroforesis</b> | <b>25</b> |
| <b>Tabla 3. Reactivos para la preparación de muestras<br/>para la electroforesis</b> | <b>27</b> |

## 1. RESUMEN

En los últimos años la prevalencia de obesidad ha aumentado drásticamente, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades que forman parte del síndrome metabólico como dislipidemia, diabetes mellitus e insuficiencia cardíaca. El mecanismo por el cual, el aumento en el volumen de tejido adiposo que define a la obesidad y que causa acumulación excesiva de lípidos en tejidos distintos al adiposo es denominado lipotoxicidad. Dicha acumulación podría causar muerte celular programada o apoptosis, a través de la formación de ceramidas. Por otro lado, estudios han demostrado efecto benéfico del consumo de proteína de soya sobre la concentración de colesterol y triacilgliceroles en suero y tejidos como el hígado, por lo que la presente investigación tuvo por objetivo conocer el efecto del consumo de la proteína de soya sobre la lipotoxicidad cardíaca en un modelo de obesidad inducida por dieta. Se utilizaron ratas Sprague Dawley las cuales se dividieron en 2 grupos control alimentados con proteína de soya y caseína como fuente de proteína y dos con dietas altas en grasa con las mismas proteínas. Después de 180 días de tratamiento, se obtuvieron los corazones para determinar la acumulación de grasa, ceramidas y la expresión de los genes PPAR $\alpha$ , SREBP-1, SPT-1 y TNF $\alpha$ . Los resultados mostraron reducción en la concentración de colesterol y triacilgliceroles en corazón de las ratas alimentadas con la dieta alta en grasa con proteína de soya respecto a las alimentadas con caseína. También se observó un aumento en la expresión de PPAR $\alpha$  indicando mayor oxidación de ácidos grasos, reducción en la síntesis de lípidos mediada por SREBP-1 y reducción en la síntesis de ceramidas y respuesta inflamatoria mediadas por SPT-1 y TNF $\alpha$  respectivamente. En conclusión, la proteína de soya evitó el desarrollo de lipotoxicidad cardíaca en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

**Palabras clave:** Obesidad, lipotoxicidad, corazón, soya.

## 2. ABSTRACT

In recent years the prevalence of obesity has increased dramatically, as a risk factor for the development of diseases that are part of the metabolic syndrome such as dyslipidemia, diabetes mellitus and heart failure. The mechanism by which the volume of adipose tissue that defines obesity and alterations that occur in different organs, is known as lipotoxicity, which is defined as excessive accumulation of lipids in non-adipose tissues such as liver, islets pancreatic, cardiac and skeletal muscle. This accumulation can cause programmed cell death or apoptosis, through the formation of ceramides. Furthermore, studies have shown beneficial effects of consumption of soy protein on the concentration of cholesterol and triacylglycerol in serum and tissues as the liver, so this research aimed to study the effect of consumption of soy protein on cardiac lipotoxicity in a model of diet-induced obesity. Sprague Dawley rats were used which were divided into 2 control groups fed soy protein and casein as a protein source and two high-fat diets with the same proteins. After 180 days of treatment, the hearts were obtained to determine the accumulation of fat, ceramides and the expression of genes SREBP-1, SPT-1 and TNF $\alpha$ . The results showed reduction in the concentration of cholesterol and triacylglycerol in the heart of rats fed high-fat diet with the high fat diet with soy protein with respect to those fed with. Also observed an increase in the expression of PPAR $\alpha$ , indicating increased fatty acid oxidation, reduction in the synthesis of lipids mediated by SREBP-1 and reduction in the synthesis of ceramides and inflammatory response mediated by SPT-1 and TNF $\alpha$ , respectively. In conclusion, soy protein prevented the development of cardiac lipotoxicity in rats fed a diet high in fat.

**Key Words:** Obesity, lipotoxicity, heart, soy.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. OBESIDAD**

La obesidad se considera una pandemia que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo.<sup>1</sup> Es una enfermedad frecuente en México, ya que estadísticas recientes muestran que el 70% de los mexicanos adultos tienen problemas de peso.<sup>2</sup> Según la Encuesta Nacional de la Salud 2006 (ENSA-2006) alrededor del 30% de los mexicanos mayores de 20 años padece esta enfermedad.<sup>3,4</sup>

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un almacenamiento excesivo de tejido adiposo en el organismo, resultado de un desequilibrio en la utilización de energía y acompañado de alteraciones metabólicas que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud, asociada en la mayoría de los casos a patologías como diabetes, hipertensión, enfermedad de corazón, resistencia a la insulina, dislipidémias, entre otras.<sup>5,6</sup>

Existen diferentes clasificaciones de obesidad, la más común se basa en la estimación del índice de masa corporal (IMC). Para la Organización Mundial de Salud (OMS), un IMC de 25 a 29.9 indica sobrepeso; de 30 a 34.9, obesidad leve; de 35 a 39.9, obesidad moderada; y un IMC mayor de 40 indica obesidad severa, independientemente del género.<sup>7,8</sup>

De acuerdo a la acumulación de grasa la obesidad se clasifica en dos tipos: androide y ginecoide. Cuando la grasa se acumula preferentemente en cintura y cadera se denomina ginecoide, y cuando la grasa se localiza en el abdomen se le llama androide.<sup>9,10</sup>

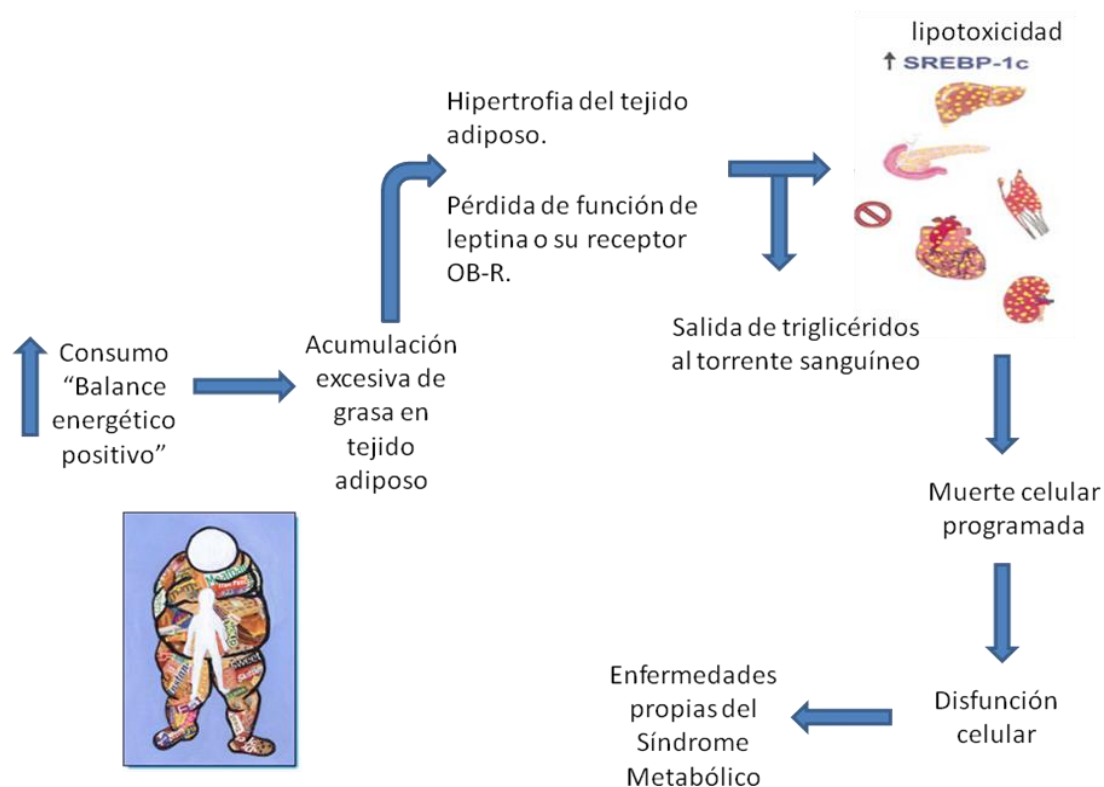
Según las características morfológicas de las células en el tejido, existe la obesidad hiperplásica, que se caracteriza por el aumento del número de células adiposas, mientras la hipertrófica por el aumento del volumen de los adipositos.<sup>11</sup>

La obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles en adultos, tal es el caso de aterosclerosis, resistencia a la insulina e hiperlipidemia. De manera particular, la obesidad visceral es un marcador precoz del síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular, ya que está asociada con mayor riesgo de hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerosis e infarto, por lo que prevenir la incidencia de obesidad es el primer paso para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles.<sup>2,3,12</sup>

### **3.1.a FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y DEL SÍNDROME METABÓLICO**

La obesidad se desarrolla cuando el aporte de energía al organismo es mayor a la cantidad de energía que se elimina en el metabolismo basal y ejercicio, generando un balance energético positivo.<sup>13</sup> La obesidad genera alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, es por esa razón que se asocia con el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión e hiperlipidemia, dando origen a la diabetes y problemas cardiovasculares.<sup>2</sup>

Normalmente el tejido adiposo almacena temporalmente el exceso de energía de la dieta en forma de triacilgliceroles, cuando los diversos órganos y tejidos del cuerpo requieren energía para realizar sus actividades metabólicas, éstos los obtienen a partir de los ácidos grasos que el tejido adiposo libera a la circulación bajo dichas condiciones, proceso que está controlado eficientemente por la hormona leptina que es liberada por el tejido adiposo y se sabe tiene señales que son esenciales para la regulación del almacén periférico de lípidos.<sup>14</sup> Sin embargo, en los casos de obesidad, el tejido adiposo sufre hipertrofia, y la cantidad de ácidos grasos que el tejido adiposo libera pueden exceder a la cantidad que los tejidos son capaces de utilizar, aunado a una resistencia que se presenta a la acción de la leptina (Fig. 1).<sup>15,16</sup> Normalmente, los tejidos compensan este exceso de energía al aumentar la tasa de oxidación de ácidos grasos para mantener la homeostasis intracelular. El mecanismo por el cual ocurre este ajuste involucra la expresión de un factor de transcripción denominado receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$  por sus siglas en inglés).<sup>17</sup>



**Figura 1. Fisiopatología del Síndrome Metabólico.** La obesidad comienza con un balance energético positivo donde la energía consumida excede a la utilizada, esto permite una mayor acumulación de grasa en tejido adiposo. Dicha acumulación hace que el adiposo sufra hipertrofia y sea incapaz de almacenar mas grasa así que esta sale en forma de triglicéridos al torrente sanguíneo y se sitúa en órganos no adiposos ocasionando disfunción celular lo que provoca se desarrollen enfermedades que forman parte del Síndrome Metabólico dependiendo del órgano afectado.<sup>18</sup>

PPAR $\alpha$  es un receptor nuclear activado por ácidos grasos, de manera que es a través de él que los lípidos que ingresan a los tejidos actúan como señales para realizar ajustes metabólicos. PPAR $\alpha$  induce la transcripción de enzimas oxidativas de ácidos grasos como la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), la acil CoA oxidasa (ACO) y la proteína desacoplante mitocondrial 2 (UCP-2).<sup>19</sup> El aumento en el contenido de estas enzimas promueve la oxidación mitocondrial o  $\beta$ -oxidación del excedente de ácidos grasos y la energía generada puede ser disipada como calor.

La regulación de este mecanismo compensatorio requiere de la secreción de leptina por los adipocitos y de la presencia del receptor de leptina (OB-R) en los tejidos donde esta va a actuar.

La ruta de señalización del receptor de leptina involucra a las proteínas JAK2 Y STAT3, las cuales se encargan de activar la expresión de genes como el PPAR $\alpha$ .<sup>20</sup> En la obesidad el aumento en el tejido adiposo incrementa la concentración de leptina circulante, generando un estado de resistencia. Dicha resistencia reduce la activación de JAK2 y STAT3 evitando la expresión de PPAR $\alpha$  y de ahí la oxidación de lípidos en los tejidos, esto altera la señalización y provoca que el exceso de ácidos grasos en tejidos no adiposos se acumule.

Para poder entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la obesidad y sus consecuencias metabólicas así como para desarrollar tratamientos para combatirla, se han generado distintos modelos animales de obesidad, que se pueden dividir en genéticos y dietarios. Los modelos genéticos son roedores que poseen una mutación en algún gen involucrado en el metabolismo energético como la rata Zucker fa/fa ó el ratón db/db que carecen del receptor de leptina (ObRb). Sin embargo, la obesidad humana rara vez es causada por una alteración monogénica como en los modelos anteriores. Más bien, como en la mayoría de las enfermedades, el riesgo de desarrollar obesidad y síndrome metabólico depende en la interacción del bagaje genético con el ambiente, que se compone principalmente de la dieta y la actividad física. Debido al importante papel que juega la dieta en el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico en humanos, los modelos de obesidad inducida por dieta (DIO) son muy importantes para el estudio del desarrollo de la obesidad y sus consecuencias metabólicas.

Las ratas y ratones son los modelos más utilizados para generar obesidad inducida por dieta debido a que pueden desarrollar obesidad y algunos otros factores asociados con el síndrome metabólico en relativamente poco tiempo. En la DIO la concentración de la leptina aumenta progresivamente en proporción con el incremento de peso corporal.<sup>21,22</sup> Al inicio del tratamiento, el consumo crónico de energía genera un balance energético positivo. Sin embargo, la acción de la leptina a través de su acción sobre PPAR $\alpha$  protege a

los distintos órganos de la acumulación de lípidos incrementando la oxidación de ácidos grasos.<sup>23</sup> Este efecto de la leptina mantiene el balance energético en equilibrio.<sup>24</sup> Sin embargo, con el tiempo, el desarrollo de resistencia a la acción de la leptina impide el mantener este equilibrio, y entonces se da un incremento en la acumulación de ácidos grasos en hígado, páncreas, músculo esquelético y corazón, los cuales alteran la función normal de los tejidos, proceso denominado lipotoxicidad.<sup>25</sup>

### **3.1. b. OBESIDAD Y PROBLEMAS CARDIOVASCULARES**

En 1950 el 6.2% de las muertes en la población mexicana, ocurrieron por enfermedad cardiovascular, en el 2000 la prevalencia fue del 32% apareciendo como la segunda causa de muerte, datos recientes muestran un 33.2% siendo la cardiopatía isquémica la primer causa de muerte en ambos sexos.<sup>4</sup> Una de las causas del padecimiento de esta enfermedad es el incremento de la obesidad, que va de la mano con hipertensión arterial y el desarrollo de diabetes.<sup>2</sup>

En la obesidad, el trabajo al que es sometido el miocardio es mayor que en un sujeto de peso normal, ya que el exceso de tejido adiposo requiere un aumento en la vascularización y un mayor volumen sanguíneo generando hipertensión sanguínea. Este aumento en la precarga predispone a una dilatación ventricular izquierda que aunado a la elevación de la poscarga, conlleva a la hipertrofia ventricular izquierda.<sup>26</sup> Debido a esta hipertrofia hay una disminución de la elasticidad del ventrículo, ocasionando disfunción diastólica del ventrículo izquierdo.<sup>27</sup>

Así, la obesidad está relacionada con la hipertensión arterial y con otros problemas cardiovasculares como isquemia e insuficiencia cardiaca. En la revisión de Messerli en 1982, se expone que los pacientes con obesidad muestran una disminución de la contracción ventricular llevando a la insuficiencia cardiaca congestiva probablemente debido a una adaptación cardiaca a la obesidad e hipertensión.<sup>28</sup>

La obesidad también es uno de los factores de riesgo que deterioran al endotelio vascular, junto con el tabaco, el estrés y la edad; por lo que es importante el desarrollar la prevención para evitar estos factores de riesgo.<sup>29</sup>

### **3.2. LIPOTOXICIDAD**

La lipotoxicidad se define como la acumulación excesiva de triacilglicérolos en tejidos no adiposos que pueden alterar las funciones normales de las células e incluso inducir muerte celular. Este crecimiento en la acumulación de ácidos grasos en la célula provee sustratos para rutas metabólicas no oxidativas, en especial la síntesis de ceramidas que llevan a disfunción y muerte celular por apoptosis, también denominada muerte celular programada.<sup>30</sup>

El mecanismo por el cual ocurre la lipotoxicidad se está entendiendo recientemente. Por un lado, el consumo elevado de energía genera resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, la cual aumenta la actividad de los factores de transcripción que estimulan la lipogénesis, como la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1 (SREBP-1 por sus siglas en inglés).<sup>31</sup> Esto incrementa la síntesis y acumulación de lípidos en los tejidos, principalmente triacilglicérolos.

Por otro lado, con el desarrollo de obesidad, incrementa el número de adipocitos disfuncionales, los cuales se caracterizan por liberar un exceso de ácidos grasos a la circulación, que son transportados al interior de tejidos no adiposos, contribuyendo a la excesiva acumulación de lípidos en la obesidad.<sup>32</sup>

La lipotoxicidad se presenta en el hígado, músculo esquelético, islotes pancreáticos y miocardio donde se ha observado incremento en el contenido de ceramidas. Altos niveles de estos productos metabólicos se cree causan las complicaciones comunes de la obesidad, como son resistencia a la insulina, enfermedad cardíaca y diabetes por interrumpir la función celular y finalmente promueven la muerte programada (lipoapoptosis).<sup>33</sup>

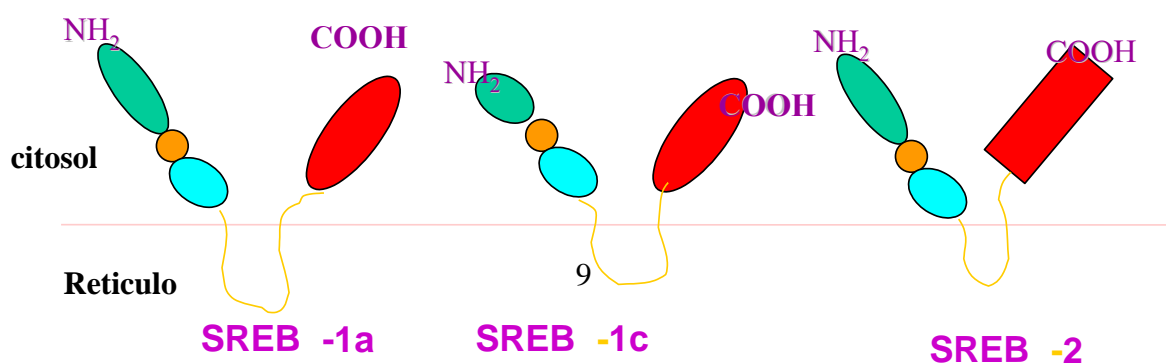
Para aprender el mecanismo de lipotoxicidad, es importante conocer como ocurre la lipogénesis y algunos factores de transcripción involucrados como SREBPs, SPT, PPAR $\alpha$  y TNF $\alpha$ .

### 3.3. PROTEÍNAS DE UNIÓN A ELEMENTOS REGULATORIOS DE ESTEROLES (SREBPs)

Los nutrientes dietarios pueden actuar en muchas ocasiones como reguladores de la expresión génica, actuando sobre la transcripción, procesamiento, estabilidad y traducción del RNAm. Estos nutrientes incluyen a la glucosa, ácidos grasos, colesterol, aminoácidos, algunos minerales y vitaminas. Los efectos de los nutrientes sobre la expresión génica pueden ser directos, es decir, mediados por el nutriente o indirectos donde el consumo de nutrientes genera un estado hormonal específico, el cual puede regular la expresión de ciertos genes. En cualquiera de los dos modos, los nutrientes necesitan activar factores de transcripción, que son proteínas involucradas en estimular la actividad de la enzima RNA polimerasa para que pueda transcribir genes específicos.<sup>34</sup> El factor de transcripción que regula los genes de la síntesis de lípidos son los SREBPs.

#### 3.3. a. FAMILIAS DE SREBPs

Existen 3 familias de SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 que constan de un extremo NH<sub>2</sub> terminal (480 aa) que permite que estas proteínas funcionen como factores transcripcionales; una región hidrofóbica (80 aa) y un dominio regulatorio COOH terminal (590 aa) Fig. 2.<sup>35</sup>



**Figura 2. Isoformas de las SREBP** constan de un extremo terminal NH<sub>2</sub>, una región hidrofóbica y un dominio regulatorio COOH terminal.

Estas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico, y cuando se requiere el incremento de la transcripción de genes de la síntesis de ácidos grasos o colesterol, la región amino terminal de la proteína se escinde, y esta viaja hacia el núcleo de las células para que se pueda unir a los elementos de respuesta localizados en la región promotora de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos o colesterol.<sup>36</sup>

Las formas SREBP-1a y SREBP-1c se involucran en la activación de los genes de las enzimas que regulan la síntesis de ácidos grasos, y la de SREBP-2 está relacionada con los genes de las enzimas de la vía de síntesis de colesterol.<sup>37</sup>

En el caso de la lipotoxicidad, lo que se estimula es la síntesis de ácidos grasos, por lo que la isoforma importante de SREBP en este mecanismo es la SREBP-1. Dentro de los genes blanco que activa este factor de transcripción se encuentran: la sintetasa de ácidos grasos (FAS) y la acetil CoA carboxilasa (ACC).<sup>38</sup>

Por lo tanto, el prevenir la activación del factor de transcripción SREBP-1 puede disminuir la lipogénesis, y de esta manera la lipotoxicidad.

### **3.4 SERINA PALMITOIL TRANSFERASA (SPT)**

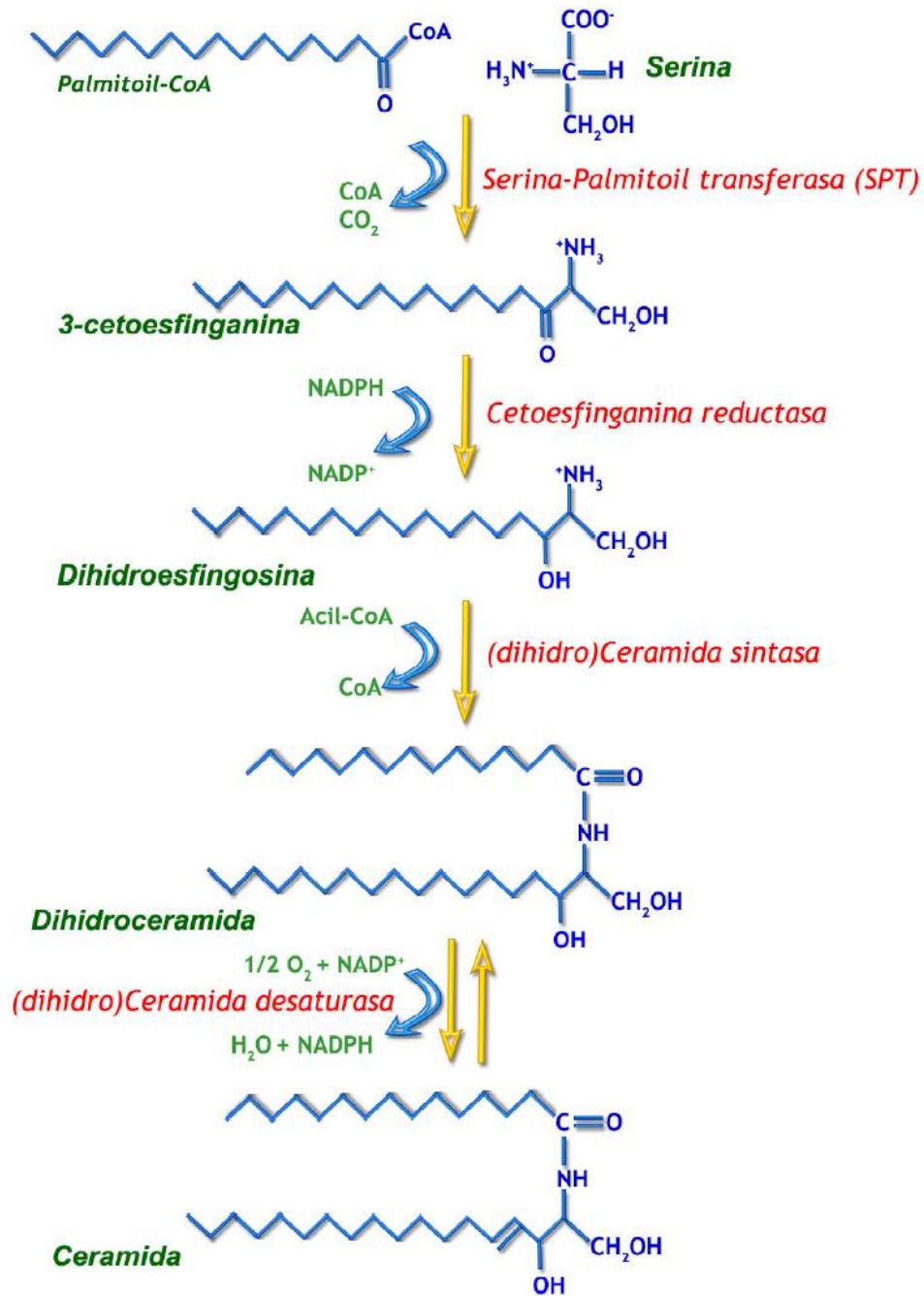
Una de las funciones mas interesantes de los lípidos en contexto de la biología celular es la capacidad de regular diversos procesos, los esfingolipidos son elementos clave en la



regulación de varios procesos celulares como en la apoptosis.<sup>39</sup> Entre los principales esfingolípidos bioactivos se encuentra la ceramida que activa rutas encaminadas a producir muerte celular.<sup>40</sup>

Serina Palmitoil Transferasa (SPT) es una enzima clave para la regulación de síntesis de ceramidas, que se encarga de catalizar la condensación de Serina y Palmitoil-CoA formando 3-ketosfinganina que es un precursor para la formación de ceramidas, como se muestra en la Figura 3.<sup>41</sup> De tal modo, los integrantes clave de esta síntesis serían la cantidad de palmitato extracelular disponible, serina palmitoil transferasa (SPT) y ceramidasa.<sup>42</sup>

El aumento de la disponibilidad de palmitato extracelular conduce a una acumulación de ceramidas en los cardiomiocitos. Estudios han sugerido que dicha acumulación juega un papel importante en la patogénesis de cardiomiopatía lipotóxica.<sup>43</sup>



**Figura 3. Ruta de ceramidas.** Condensación de serina y Palmitoil CoA, acción de serina palmitoil transferasa para la formación de Ceramidas.<sup>44</sup>

### **3.5. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs)**

Los PPARs son factores de transcripción que son activados por la unión de ligandos específicos provenientes del exterior de la célula y que regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.<sup>45</sup>

Existen 3 sub-tipos de PPARs, los PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  y PPAR $\gamma$ ; todos ellos se han encontrado en corazón pero PPAR $\alpha$  es bien conocido como regulador del metabolismo de lípidos en este órgano ya que la principal fuente de energía en el miocardio proviene de la oxidación de ácidos grasos y la subsiguiente producción de ATP mitocondrial.<sup>46</sup>

Por lo tanto, la activación de PPAR $\alpha$  incrementa la oxidación de ácidos grasos en corazón.<sup>47</sup> Como se ha mencionado, PPAR $\alpha$  actúa compensando el exceso de ácidos grasos induciendo la expresión de enzimas oxidativas: carnitina palmitoil transferasa (CPT-1), acil CoA oxidasa (ACO) y UCP-2, disipando la energía no utilizada como calor.

Para que este mecanismo se lleve adecuadamente se necesita tener a la leptina y su receptor funcionando adecuadamente, de lo contrario no se activa la expresión de PPAR $\alpha$  sino PPAR $\lambda$  el cual aumenta la regulación de enzimas lipogénicas ACC y FAS causando acumulación ectópica de triacilgliceroles e incrementando el metabolismo no-oxidativo y finalmente debido a sus productos una lipoapoptosis.<sup>48</sup>

Finck et al en el 2003, encontraron que PPAR $\alpha$  juega un papel importante en la lipotoxicidad y cardiomiopatía diabética ya que estudios realizados han demostrado que altos grados de oxidación de ácidos grasos debido a una sobreexpresión de PPAR $\alpha$  podría inducir disfunción cardíaca.<sup>49</sup>

Estudios en animales transgénicos muestran también, que la sobreexpresión de PPAR $\alpha$  está asociada con una acumulación en miocardio de triacilgliceroles y esta relacionado con la modulación de ceramidas debida a una alimentación alta en grasas, acelera la oxidación de ácidos grasos lo que podría causar hipertrofia y dilatación del ventrículo izquierdo y eventualmente disfunción contráctil .<sup>50, 51</sup>

Por otro lado, se ha revelado que PPAR $\alpha$  actúa directamente sobre los promotores de los genes que codifican para las proteínas inflamatorias al modular la expresión de citocinas pro inflamatorias como TNF- $\alpha$ .<sup>52</sup>

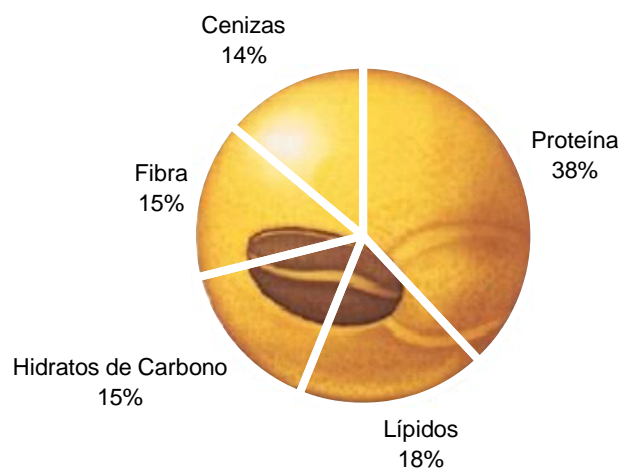
### **3.6. SOYA (*Glycine max*)**

La soya es una leguminosa cultivada originalmente en China donde por más de 4000 años constituyó un alimento fundamental en la dieta.

La proteína de soya ha llegado a ser considerada como una alternativa para el tratamiento de muchas enfermedades crónicas no transmisibles.<sup>53,54,55,56</sup>

#### **3.6. a. CONTENIDO NUTRIMENTAL**

La proteína de soya es una proteína de origen vegetal con un perfil de aminoácidos que cumple con los requerimientos en humanos y en ratas.<sup>57</sup> La soya contiene por cada 100 g Proteína 38 g, Lípidos 18 g, Hidratos de Carbono 15 g, Fibra 15 g, Cenizas 14 gramos, Ácido fólico 1.00-1.47 g, Saponinas 0.22 –0.33 g y Isoflavonas 1200- 4200  $\mu$ g (Fig.4).<sup>58,59</sup>



**Figura 4. Composición de la soya.** El frijol de soya tiene un alto contenido de proteína en comparación con la mayoría de otras legumbres.

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

Para la mayoría de los trabajos donde se han estudiado sus propiedades benéficas se han utilizado aislados de proteína de soya cuya pureza es mayor del 90%.<sup>60</sup> La mayoría del contenido de las proteínas que forman el aislado de la proteína de soya son  $\beta$ -conglucina y gliciteína. Por otro lado, se ha establecido que si se corrige por su digestibilidad la calificación química de esta proteína se ha calculado ser de 1, lo cual la hace comparable a la proteína de la leche.

### **3.6. b. BENEFICIOS DE LA SOYA**

La proteína de soya ha llegado a ser considerada como una alternativa para el tratamiento de muchas enfermedades crónicas no transmisibles.<sup>61,62,63</sup>

Diversos estudios indican que el consumo diario de 25 g de proteína de soya tiene un efecto hipocolesterolémico en humanos y animales de experimentación. Según la Food and Drug Administration (FDA) se deben consumir 25 g por día de soya para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.<sup>64</sup> Estudios reportan una disminución significativa en la concentración de colesterol LDL (aumenta actividad en el receptor LDL causando aumento en la remoción de colesterol en la sangre disminuyendo su concentración sérica.) y un aumento significativo del colesterol HDL.<sup>65,66</sup>

Se ha demostrado por diversos estudios que el consumo de proteína de soya disminuye las concentraciones de colesterol total en un 9.3%, colesterol LDL en un 12.9%, triacilglicéridos (TG) en un 10.5% e incrementa el colesterol HDL en un 2.4% en sujetos con hipercolesterolemia moderada y severa.<sup>67,68</sup>

Se ha estimado que la soya mejora la respuesta de dilatación de las arterias, aún cuando exista placa de ateromas, mejora la función de los vasos sanguíneos, previniendo la formación de coágulos y reduciendo la incidencia de enfermedades del corazón.

Por otro lado, el fríjol de soya y sus derivados contienen cantidades significantes de fitoestrógenos dentro de los cuales los más abundantes son las isoflavonas: genisteína y dadzeína.<sup>69</sup> Algunos estudios han mostrado que las isoflavonas derivadas de la soya pueden tener un efecto en la prevención de aterosclerosis y osteoporosis, sin embargo, mas investigación es necesaria aún.<sup>70,71</sup> También, la proteína de soya reduce la proteinuria en modelos de daño renal como ocurre durante el síndrome nefrótico.<sup>72</sup>

#### 4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

México ocupa el segundo lugar de obesos a nivel mundial, mas del 50% de su población adulta y casi un tercio de niños y niñas tiene sobrepeso y obesidad.<sup>73,74</sup> El patrón de esteatosis característico en la obesidad induce fallo en el corazón causando una cardiomiopatía directa debido a la acumulación de productos del metabolismo de lípidos como ceramidas que interfieren con la señalización de rutas intracelulares y finalmente muerte celular causada por dicha lipotoxicidad.<sup>13</sup>

Las consecuencias de la obesidad más comunes son el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.<sup>75</sup> Estas últimas representan un porcentaje importante de las causas de morbimortalidad en nuestro país, por lo que el desarrollo de terapias nutricias para la prevención y el control de estas alteraciones es fundamental.<sup>73</sup> La proteína de soya puede ser una alternativa específicamente en la prevención de la lipotoxicidad en el corazón asociada con la obesidad.<sup>76</sup>

La mortalidad debida a problemas cardiovasculares aumenta en forma dramática a partir de un IMC mayor de 25, pues es considerado ya un problema de sobrepeso que regularmente progresa a obesidad.<sup>77</sup>

No existe evidencia experimental de que el consumo de la proteína de soya previene la acumulación de lípidos en el corazón, lo que evitaría el desarrollo de lipotoxicidad cardiaca. Por ello, es necesario primeramente conocer si esta proteína es capaz de reducir la acumulación de lípidos en el corazón además de entender cual es el posible mecanismo molecular a través del cual pueda ejercer este efecto protector. Es fundamental determinar si la proteína de soya tiene algún efecto protector sobre la lipotoxicidad del corazón en ratas con obesidad inducida por la dieta.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Entre las enfermedades de mayor prevalencia en México y el mundo, la obesidad es una de las más importantes debido a las complicaciones metabólicas que conlleva esta enfermedad a causa de una acumulación excesiva de grasa en tejidos no adiposos ocasionando síndrome metabólico.<sup>78</sup> Una de estas alteraciones metabólicas y de gran importancia se observa en el corazón, la lipotoxicidad causa daño en los miocitos ya que pierden su función y causan cardiomiopatía.<sup>79</sup> Este entendimiento del posible mecanismo de la lipotoxicidad en el corazón y su posible prevención con el uso de la proteína de soya sería de gran impacto en nuestra población.

Siendo los nutrimentos, en muchas ocasiones, reguladores de la expresión de ciertos genes involucrados con la síntesis u oxidación de lípidos en la fisiopatología de la obesidad, y como se ha visto con recientes investigaciones en otros órganos, es importante conocer, si la proteína de soya tiene algún efecto protector sobre la acumulación de triacilgliceroles en el corazón a pesar de una obesidad inducida por la dieta, y así proponer su consumo para la prevención de disfunciones cardíacas como resultado de las alteraciones metabólicas que ocurren en la obesidad.<sup>80,81</sup>

Se ha estudiado que algunos nutrimentos específicos en la dieta tienen este efecto. Uno de ellos es la proteína de soya, pues se ha determinado al menos en el hígado que su consumo reduce la expresión de SREBP-1 y de esta manera la lipogénesis reduciendo la formación de hígado graso.<sup>82</sup> Es por lo tanto importante el entender cuales son las características nutrimentales de la soya y cuales han sido sus beneficios a la salud que se le han atribuido. Si existe este efecto, esto podría reducir la lipotoxicidad en el corazón (lipoapoptosis), evitando la muerte de los miocitos lo que conllevaría a una disminución de la aparición de enfermedades cardíacas. Por lo que en la presente investigación fue fundamental determinar si la proteína de soya tiene algún efecto protector sobre la lipotoxicidad del corazón en ratas con obesidad inducida por la dieta.



## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la proteína de soya sobre la lipotoxicidad cardiaca empleando un modelo de obesidad inducido por la dieta.

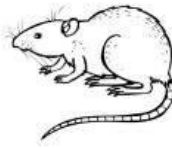
### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- \* Determinar si la proteína de soya dietaria evita la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.
- \* Determinar si la proteína de soya disminuye la acumulación de lípidos en el corazón de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.
- \* Determinar si la proteína de soya reduce el contenido de ceramidas en corazón en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.
- \* Determinar si la proteína de soya reduce el contenido de RNAm de SREBP-1, SPT-1 y TNF- $\alpha$  en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

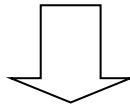
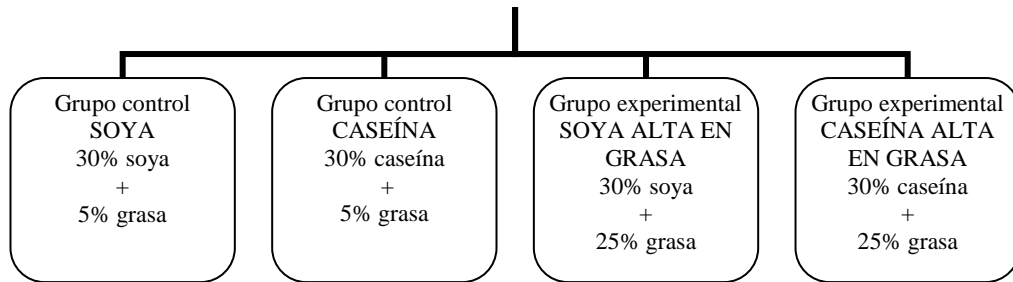
## **7. HIPÓTESIS**

El consumo de la proteína de soya disminuye los efectos lipotóxicos en corazón de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa.

## 8. METODOLOGÍA



Ratas macho, Sprague Dawley de 8 semanas de edad.



Etapa de inducción de la obesidad. A los 180 días de tratamiento con las dietas correspondientes las ratas se decapitaron para la obtención de tejidos.

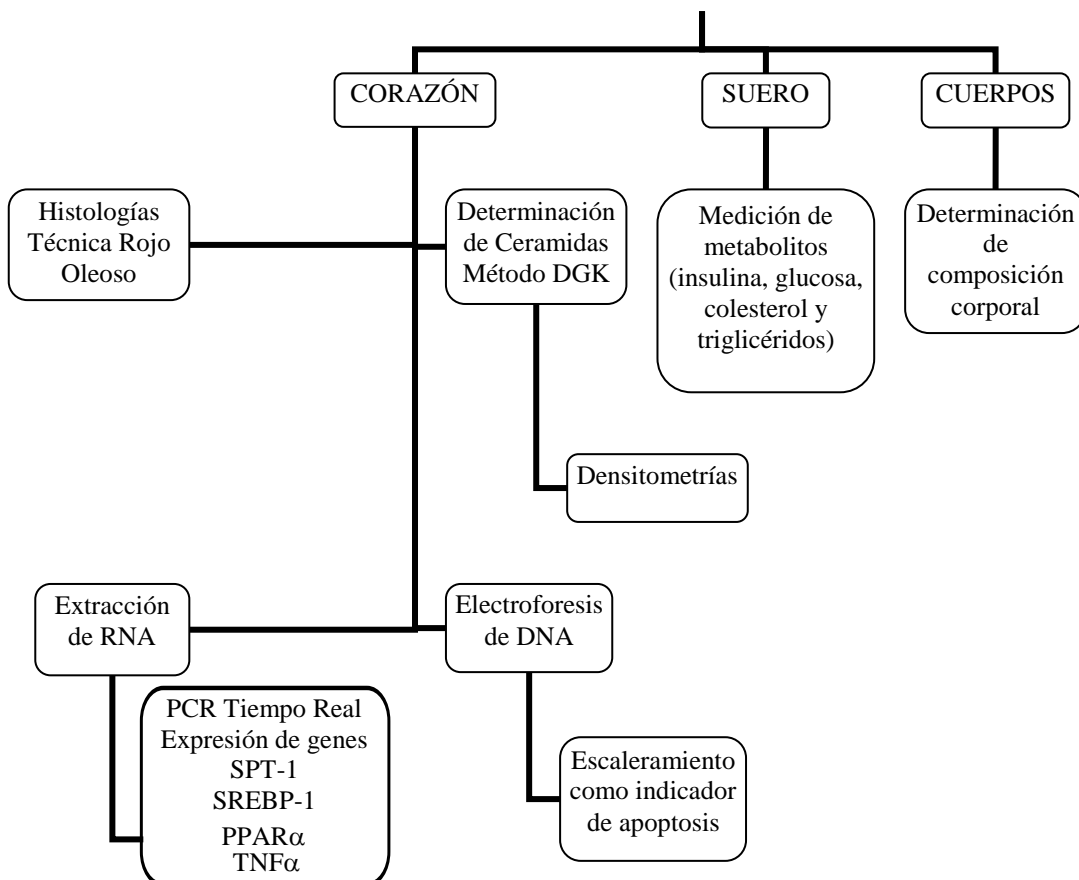


Figura 5. Esquema de la Metodología

## 8.1. a. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

**Criterios de inclusión:** Ratas macho Sprague-Dawley procedentes de Harlan México, de 8 semanas de edad.

**Criterios de exclusión:** Las ratas con características mencionadas no entraron al estudio en caso de estar enfermas en apariencia. Las ratas que bajen de peso sin explicación alguna.

**Diseño experimental:** Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de acero inoxidable, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con temperatura y humedad controladas. A los cuatro grupos se les permitió la ingestión de la dieta y de agua ad libitum por un periodo de 180 días.

Las ratas se dividieron en cuatro grupos. De la siguiente manera.

### • Grupos control

–14 ratas: proteína de soya al 30% +5 % grasa

–14 ratas: caseína al 30% + 5% grasa

### • Grupos experimentales

–14 ratas: proteína de soya al 30% + 25% grasa

–14 ratas: caseína al 30% + 25% grasa

## 8.1. b. PREPARACIÓN DE DIETAS

Las dietas estuvieron compuestas en porcentaje de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 1. Contenido de la dieta control y experimental**

| %  | Caseína | Soya  | Caseína Alta en grasa | Soya Alta en grasa |
|--|---------|-------|-----------------------|--------------------|
| Proteína de soya (86% pureza) <sup>1</sup> | -       | 30    | -                     | 30                 |
| Caseína (90.6% de pureza) <sup>2</sup>     | 30      | -     | 30                    | -                  |
| Aceite de maíz                             | 5       | 5     | 5                     | 5                  |
| Manteca de cerdo                           | -       | -     | 20                    | 20                 |
| Mezcla de minerales <sup>3</sup>           | 5       | 5     | 5                     | 5                  |
| Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>           | 1       | 1     | 1                     | 1                  |
| Citrato de colina                          | 0.165   | 0.165 | 0.165                 | 0.165              |
| Dextrosa anhidra                           | 29.41   | 29.41 | 19.41                 | 19.41              |
| Almidón de maíz                            | 29.41   | 29.41 | 19.41                 | 19.41              |

1 Supro 710, Solae, México. Analisis de isoflavonas (mg/g de proteína): genisteína 1.38, dadzeína 0.71, gliciteína 0.19. Concentración de aminoácidos de la proteína de soya (g/100g de proteína) alanina 4.1, arginina 7.5, aspartato 11.9, cisteína 1.3, ácido glutámico 21.5, glicina 4.2, histidina 2.6, isoleucina 4.9, leucina 8.1, lisina 6.3, metionina 1.3, fenilalanina 5.4, prolina 5.5, serina 5.2, treonina 3.7, triptófano 1.5, tirosina 4.0 y valina 4.5.

2 Caseína , Harlan Tekland research diets. Concentración de aminoácidos de la caseína (g/100g de proteína) alanina 2.8, arginina 3.4, aspartato 6.3, cisteína 0.3, ácido glutámico 20.5, glicina 1.6, histidina 2.5, isoleucina 4.7, leucina 8.2, lisina 7.2, metionina 1.9, fenilalanina 4.4, prolina 9.5, serina 5.0, treonina 3.8, triptófano 1.6, tirosina 4.7 y valina 6.0

3 Rogers-Harper, Harlan Teklad research diets <sup>83</sup>

4 AIN-93-VX, Harlan Teklad research diets

## 8.1. c. OBTENCIÓN DE TEJIDOS

El día 180 las ratas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> para luego ser decapitadas, se obtuvo suero en tubos con gel separador y corazón. Estos se lavaron con solución salina, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el momento que se realizaron las técnicas.

## **8.2. DETERMINACION DE METABOLITOS EN SUERO**

La concentración de insulina, se determinó por radioinmunoensayo (Linco Research immunoassay, St. Charles, MO, EUA). La concentración de colesterol, TG y glucosa se determinó por ensayos enzimático-colorimétricos (DiaSys Diagnostic Systems GMBH, Holzheim, Alemania)

## **8.3. HISTOLOGÍAS.**

Se dividió el corazón con un corte sagital, una parte fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  y la otra embebida con Tissue –Tek sobre un trozo de papel aluminio para ser cortado en frío con el criostato. El corte fue colocado en portaobjetos, y se almacenó en ultracongelador hasta el momento de la tinción.

La tinción se hizo mediante la técnica de Rojo Oleoso siguiendo la siguiente secuencia:

- \* Formalina-10 min
- \* Propilenglicol 100%-10 min
- \* Rojo oleoso-10 min
- \* Propilenglicol 85%-10 min
- \* Agua-10 min
- \* Hematoxilina-10 min

Se montó en gelatina glicerizada y se colocó un cubreobjetos. Se observó por microscopio y se tomaron fotografías para cuantificar la acumulación de grasa.<sup>84</sup>

## **8.4. ANÁLISIS DE CONTENIDO DE RNA mensajero POR PCR- Tiempo Real**

Esta técnica se emplea para el análisis de RNA mensajero (RNAm) con el fin de estudiar la expresión de un gen específico. Se determinó la expresión génica de SREBP-1, SPT1, PPAR $\alpha$  y TNF $\alpha$  en corazón.

### **Extracción de RNA total con Tiocianato de Guanidina y Cloruro de Cesio**

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

La reacción se llevó a cabo usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR Master Mix, AB). Paralelamente a las muestras se corrieron reacciones sin RNA como control. Las muestras se corrieron por triplicado. En la curva de amplificación se determinó el ciclo al corte (Ct) y se determinó el valor de expresión. Los valores obtenidos fueron normalizados dividiéndolos entre el valor de amplificación de un gen estructural en cada reacción. Para el hígado se utilizó 18S y para tejido adiposo blanco y pardo se utilizó  $\beta$ -actina como genes estructurales.<sup>85,86</sup>

#### **8.4. a. CUANTIFICACIÓN DE RNA.**

El RNA se cuantifica midiendo su absorbancia a 260 nm por espectrofotometría. Se incubó la muestra de RNA a 65°C por 5 min. En un tubo Eppendorf nuevo libre de DNAsas y RNAsas se agregaron 4  $\mu$ L de la muestra de RNA. Se agregaron 996  $\mu$ L buffer TE pH 7.5. Se mezclaron ligeramente en vortex y se leyó a 260 nm en celdas de cuarzo.

Finalmente se ajusta el RNA a la cantidad deseada para el corrimiento de la electroforesis.

#### 8.4. b. ELECTROFORESIS DE RNA

##### a) Preparación del gel de agarosa al 1%

Se pesó 1g de agarosa libre de DNAsas y RNAsas y se colocó un matraz de 500 ml. Se añadió 74.5 ml de agua-DEPC. Se calentó hasta disolver la agarosa completamente. Se añadió 10 ml de MOPS (10X) y 16.49 ml de formaldehído al 40%. Se mezcló bien y se vació en la cámara de electroforesis. Se dejó solidificar.

##### b) Preparación de las muestras:

Se calentó el RNA a 65°C por 5 min.

#### Tabla 2. Reactivos para la preparación de muestras para la electroforesis.

Se agrego a un eppendorf nuevo:

| Reactivo                                 | Volumen     |
|--|-------------|
| MOPS (10X)                               | 1.7 $\mu$ L |
| Formaldehído (FDH)                       | 2.3 $\mu$ L |
| Amortiguador de cargado                  | 2 $\mu$ L   |
| Bromuro de etidio                        | 2 $\mu$ L   |
| Formamida                                | Ver nota    |
| RNA (dependiendo de la cantidad deseada) | Ver nota    |

Nota: El volumen de RNA y formamida fue de 11  $\mu$ L para tener un volumen final de muestra de 19  $\mu$ L.

Se mezcló el contenido del tubo en vortex , se dio un spin y se incubó nuevamente a 65°C por 5 minutos.

##### c) Cargado y corrimiento del gel.

Para poder ver la integridad del RNA, se corrió un gel de agarosa. Se añadió suficiente MOPS 1x para cubrir el gel. Se colocó el contenido del Eppendorf en cada pozo. Se corrió el gel a 10 V/cm (100 volts) hasta que el colorante de azul de bromofenol migró a 2/3 del gel (por 2.5 h aproximadamente).

#### **d) Fotografía del gel**

Se colocó el gel en el transluminador de luz UV que se encuentra acoplado a una cámara fotográfica. Se tomó la fotografía en el programa de Kodak en la computadora.

### **8.5. EXTRACCIÓN DNA**

Extracción de DNA geonómico de corazón para evaluar apoptosis por escalamiento de DNA mediante el Kit de extracción sw DNA ROCHE High Pure Template Preparation 11796828001.

Para iniciar se prepararon las soluciones necesarias para trabajar con este kit.

Se tomaron 25 a 50 mg de tejido de corazón, se colocaron 40  $\mu$ L con proteinasa K y 200  $\mu$ L de buffer de lisis, se mezcló ligeramente y se incubó por 1 hora a 55°C. Se añadió 200  $\mu$ L de buffer de unión y se mezcló e incubó a 70°C por 10 min. Se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló.

La solución se filtró en un tubo con filtro y su tubo colector, luego se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm eliminando el líquido y cambiando el tubo colector. Se añadieron 500ml de buffer removedor inhibidor al tubo con filtro y se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm, se eliminó el líquido y tubo colector. Se volvió a colocar otro tubo colector al tubo con filtro ahora con 500  $\mu$ L de buffer de lavado y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm. Se repitió este lavado y finalmente se centrifugó 10 segundos a toda velocidad, se tiro el tubo colector, pero se puso un tubo de micro centrifuga. Se añadieron 200  $\mu$ L de buffer de elusión previamente calentado a 70°C, se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm. Así el DNA fue transferido al buffer y se almacenó a -20°C. para ser corrido en gel.



## 8. 5. a. ELECTROFORESIS DE DNA

### GEL DE DNA 1.5%

#### a) Preparación del gel de agarosa al 1%

Se pesaron 0.525 g de agarosa y se colocó en un matraz de 125 ml. Se añadieron 35 ml de TAE IX, se calentó hasta disolver la agarosa completamente. Se agregaron 5  $\mu$ L de Bromuro de etidio, se mezcló bien y se vació en la cámara de electroforesis. Se dejó solidificar.

#### b) Preparación de las muestras:

**Tabla 3. Reactivos para la preparación de muestras para la electroforesis.**

| Muestras                 | Marcador                 |
|--------------------------|--------------------------|
| 4 $\mu$ L TAE IX         | 4 $\mu$ L TAE IX         |
| 2 $\mu$ L Loading buffer | 2 $\mu$ L Loading buffer |
| 5 $\mu$ L producto PCR   | 2.5 $\mu$ L marcador     |

#### c) Cargado y corrimiento del gel.

Se añadió suficiente TAE IX para cubrir el gel. Se colocó el contenido del Eppendorf en cada pozo. Se corrió el gel a 9 V/cm (90volts) por 45 minutos.

#### d) Fotografía del gel

Se colocó el gel en el transluminador de luz UV que se encuentra acoplado a una cámara fotográfica. Se tomó la fotografía en el programa de Kodak en la computadora.

## **8.6. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS Y DETERMINACIÓN DE TG Y CHOL**

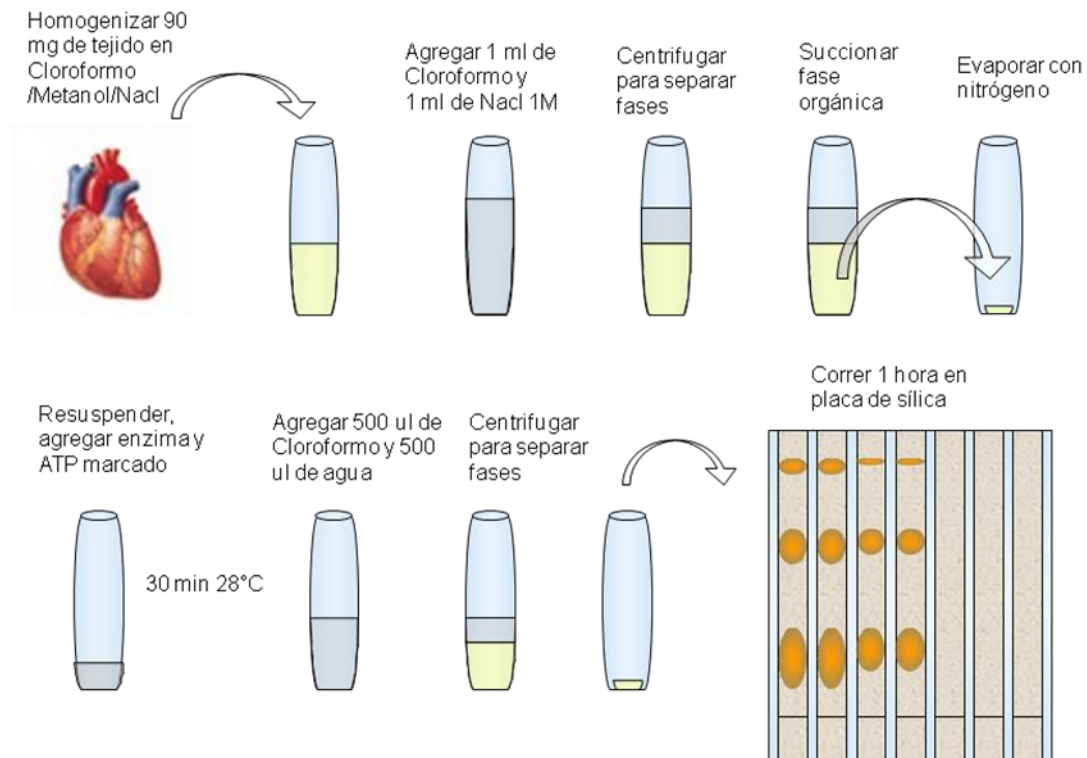
Se realizó la determinación en suero de colesterol y triacilglicéridos por método enzimático el kit SERA-PAK de Bayer.

La extracción de lípidos totales se realizó por el Método de Folch tomando 250 mg de tejido que fue homogeneizado en un tubo esmerilado con 5ml de una solución preparada de cloroformo/metanol (2:1).<sup>87</sup> Se vertió en un tubo corex, se le añadió 1ml de agua y se tapó con aluminio para mezclar ligeramente en el vortex. Se centrifugó a 2400 rpm por 15 minutos a 20 grados C. Terminando este proceso se eliminó la fase superior y se colocó 1ml de solución en tubo Eppendorf y se colocó sobre una gradilla en la campana de extracción para permitir su evaporación lo que permitió obtener una pastilla que fue resuspendida en isopropanol/triton 10%. Esta muestra sirvió para realizar las mediciones de colesterol y triacilglicéridos en un espectrofotómetro.

## **8.7. DETERMINACIÓN DE CERAMIDAS POR EL MÉTODO DIACIL GLICEROL CINASA (DGK)**

El tejido se homogeneizó en solución de cloroformo/metanol /agua, se adicionó agua y se centrifugó para separar las fases. Luego de esto se transfirió la fase inferior a otro tubo para ser evaporados con nitrógeno. Cuando se obtuvo el pellet, se resuspendió en micelas y se le agregó la enzima y el ATP marcado radiactivamente y se dejó incubar por media hora a 28°C ,se le adicionó 500 µL de cloroformo y 300 µL de agua para volver a centrifugar. Una vez separadas las fases se evaporó nuevamente y los lípidos restantes se resuspendieron en 20 µL de cloroformo para poder cargarlos a la placa de silica y se dejaron correr por una hora. Todo esto con el debido cuidado que mereció trabajar con radioactividad. Luego que ha corrido se colocó en una placa para revelarlo y así tomarle las fotos para obtener nuestra imagen y poder identificar los lípidos y por medio de la densitometría observar las diferencias entre cada grupo. (Figura 6).<sup>88</sup>

## Determinación de ceramidas por el método de la DAGK



**Figura 6. Método para determinar ceramidas** utilizando la enzima Diacilglicerol cinasa (DGK) y cromatografía en capa fina

### 8.7.a. DENSITOMETRÍAS

Una vez que se obtuvo la imagen, con ayuda de un programa podremos determinar las diferencias de ceramidas en cada uno de nuestros grupos.

### 8.8. COMPOSICION CORPORAL

A las ratas se les retiró la piel y vísceras conservando el tejido adiposo. Se molieron con 3 volúmenes de agua destilada, se secaron en un horno de convección y se molieron nuevamente para obtener un polvo fino. El contenido de grasa y proteína se determinaron por métodos bromatológicos.<sup>89,90</sup>

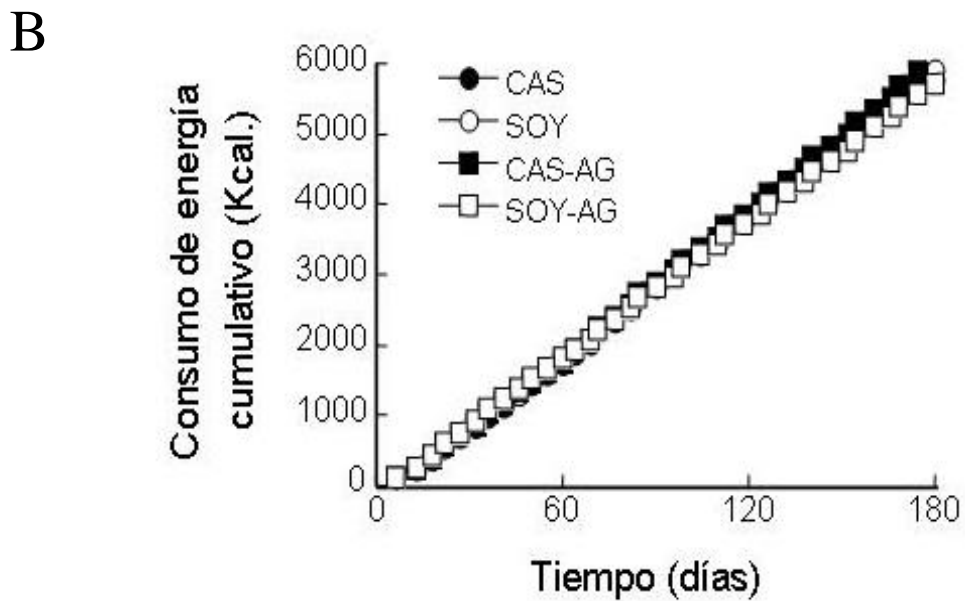
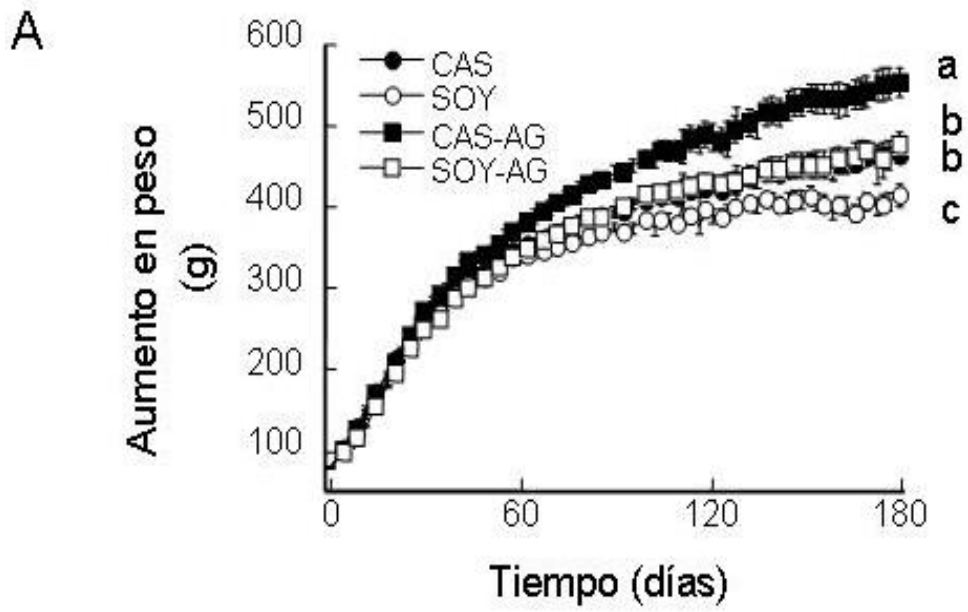
## 8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron evaluados por análisis de varianza de 2 vías (ANOVA), con el tiempo y los grupos como variables independientes. Para evaluar si las diferencias entre los grupos fueron significativas, se realizó prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher, usando el programa StatView para Macintosh. El nivel de significancia se considero con una  $p > 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

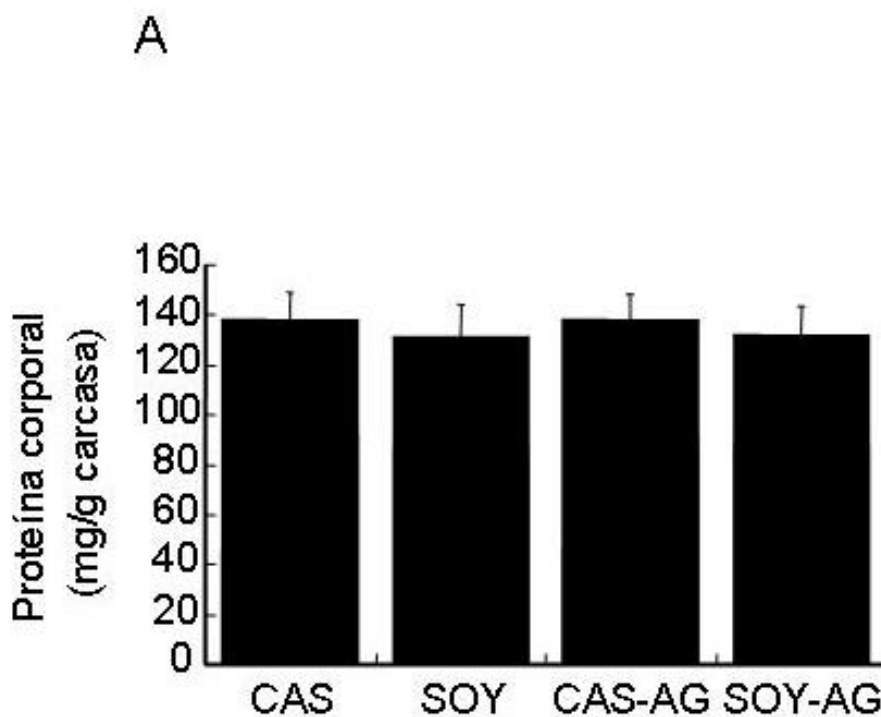
*Ganancia de peso y consumo de alimento.* Como se observa en la Fig. 7 A, la ganancia de peso de los 4 grupos experimentales no tuvo una diferencia significativa en los primeros 40 días de estudio. Los resultados del presente trabajo indican que con un 30% de proteína en la dieta, ya sea de origen animal como la caseína, o de origen vegetal como la soya, cubre los requerimientos de aminoácidos en esta etapa. De manera interesante, en la etapa final del estudio, que fue de 180 días, se muestra que los diferentes grupos experimentales presentaron diferencias significativas en su peso final. El grupo alimentado con proteína de soya con un contenido normal de grasa tuvo una menor ganancia de peso que aquellos alimentados con dieta que contenía caseína con un contenido normal de grasa. Así mismo aquellos grupos alimentados con proteína de soya alta en grasa tuvieron una menor ganancia de peso que aquellos alimentados con dieta de caseína alta en grasa ( $p < 0.05$ ).

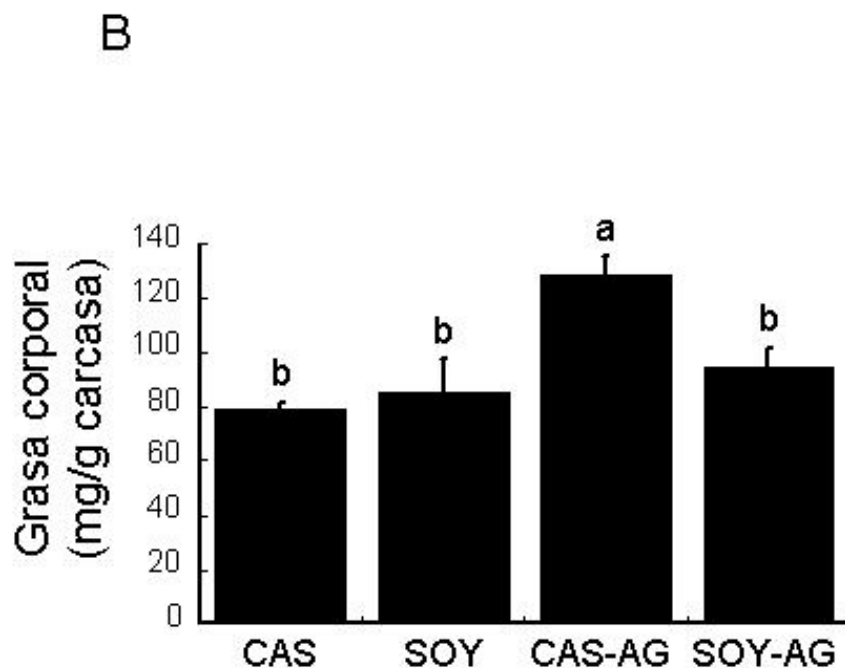
La diferencia que se observó en el peso corporal de los animales no se debió a una diferencia en el consumo de energía. La cantidad de alimento consumido por los grupos controles de caseína y soya fue mayor al de los grupos de caseína alta en grasa y soya alta en grasa sin embargo cuando se graficaron los datos en función de la ingestión de energía no se observó ninguna diferencia estadística entre los cuatro grupos experimentales, lo que indicó que las diferencias en la ganancia de peso entre los cuatro grupos no fueron debidas a una diferencia en el consumo de energía (Fig.7 B). Estos resultados indican que el tipo de proteína ejerció un efecto sobre la ganancia de peso.



**Figura 7. Ganancia de peso y consumo de alimento** de las ratas Sprague Dawley mostrado en gramos de los grupos, caseína (circulo negro), soya (circulo blanco), caseína grasa (cuadro negro) y soya (cuadro blanco), registrado hasta los 180 días de tratamiento. Las letras indican las diferencias significativas entre cada grupo ( $p < 0.05$ )

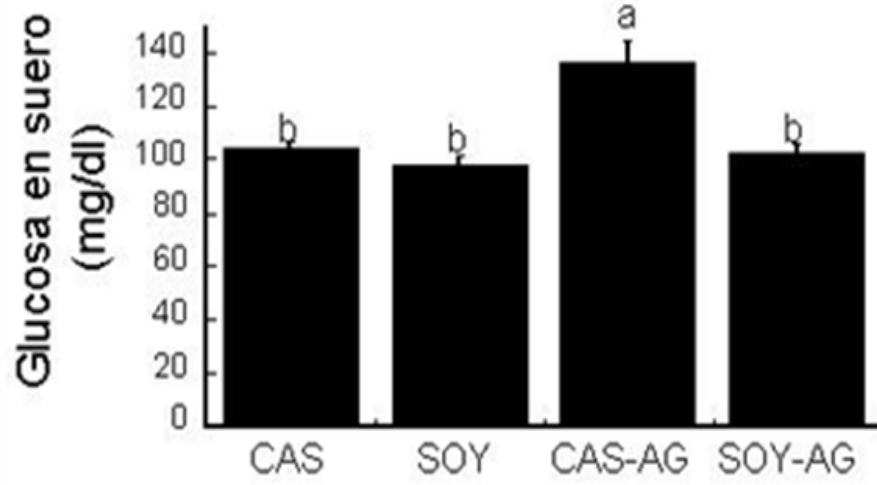
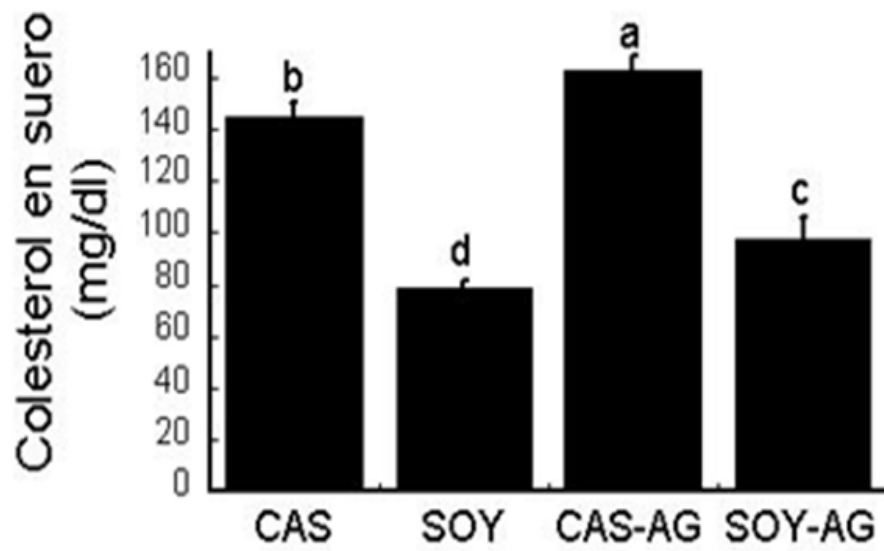
*Contenido de proteína y grasa corporal.* Para evaluar si la diferencia en peso se debió a un cambio en el contenido de grasa o de masa magra, se estudió la composición corporal de los animales de los cuatro grupos. Encontramos que el contenido de proteína corporal (masa magra) fue igual en los cuatro grupos (Fig. 8A), mientras que los animales que consumieron la dieta de caseína alta en grasa tuvieron un mayor contenido de grasa corporal que el resto de los grupos (Fig. 8B).



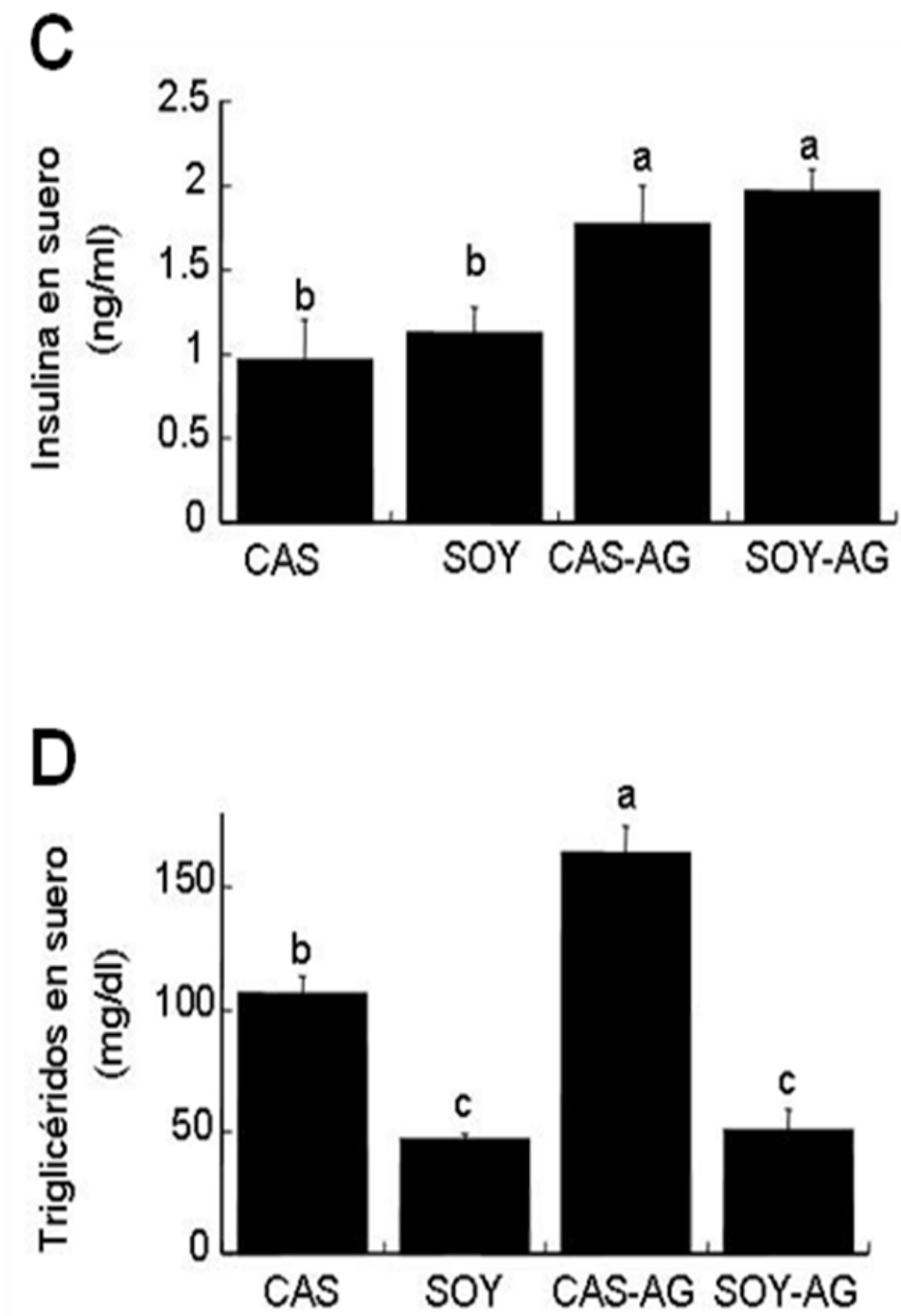


**Figura 8. Contenido de proteína y grasa corporal.** Los valores de cada grupo se muestran en mg/g de carcasa. En el panel B, las letras indican diferencias significativas en cada uno de los grupos.

*Parámetros Bioquímicos.* Para caracterizar las variaciones bioquímicas en los grupos alimentados con dietas control y aquellos alimentados con las dietas que contenían una alta concentración de grasa, se determinó en el suero la concentración de glucosa, insulina, colesterol y triacilglicéridos. Como era de esperarse aquellos animales que consumieron una dieta de caseína alta en grasa, que fueron los que desarrollaron un mayor acumulo de grasa corporal, presentaron glucemias significativamente mayores que las de los demás grupos. En este grupo las glucemias fueron de alrededor de 130 mg/dl (Fig. 9A). De manera interesante, ambos grupos alimentados con dieta alta en grasa presentaron un mayor contenido de insulina en suero, indicando que el tipo de proteína no modifica la concentración de insulina en ratas alimentadas con dieta alta en grasa (Fig. 9B) De manera interesante, los grupos alimentados con caseína tuvieron una mayor concentración de colesterol (Fig. 9C) y de triacilglicéridos séricos (Fig. 9D).

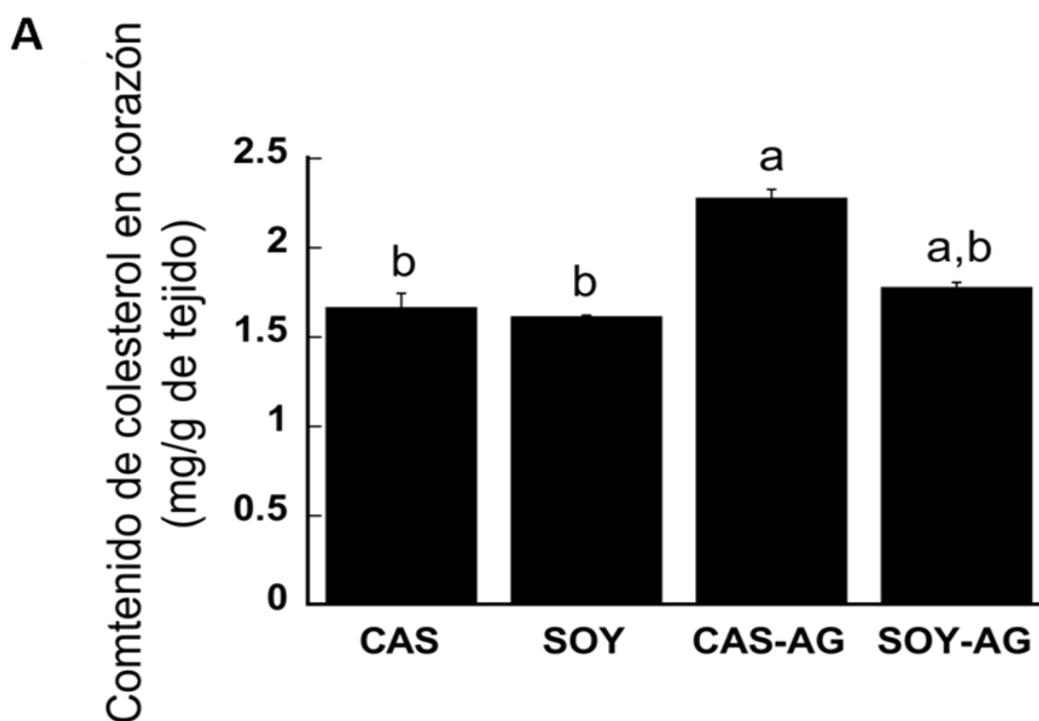
**A****B**

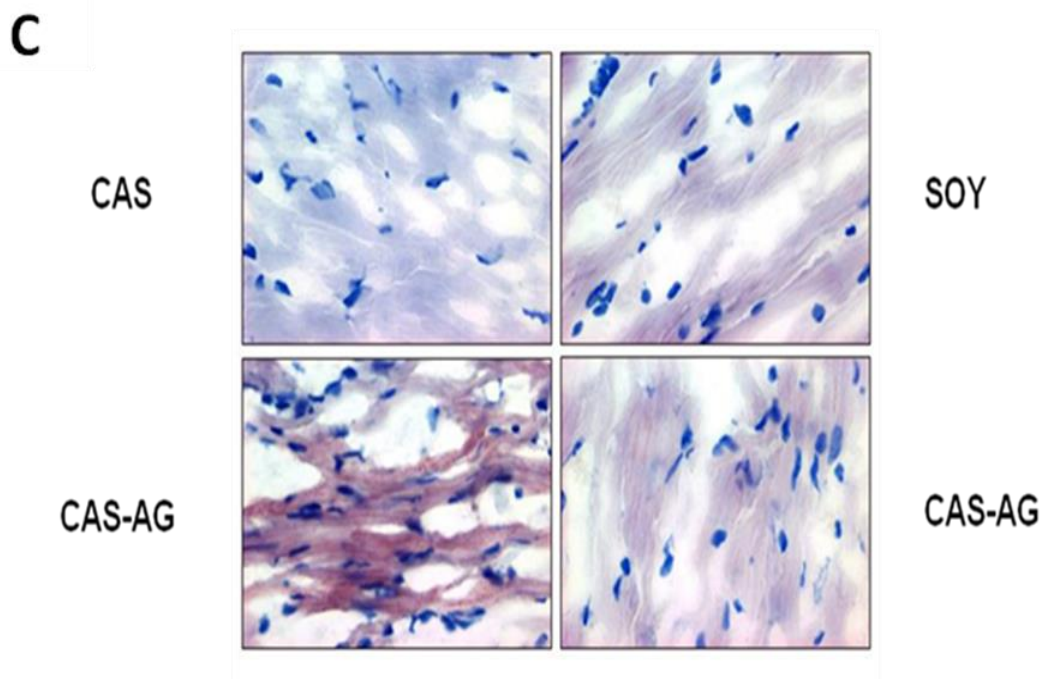
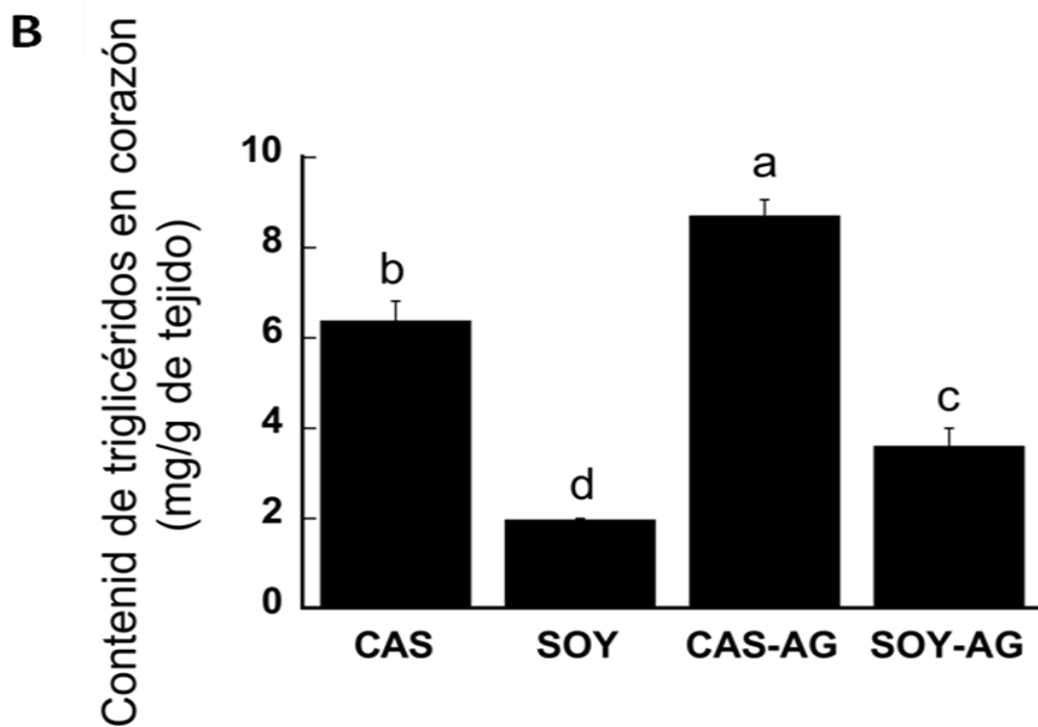




**Figura 9. Glucosa, insulina, colesterol y triacilgliceroles en suero.** Los valores representan la media  $\pm$  del error estándar que se tomaron a los 0, 90 y 180 días del tratamiento. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ )  $a > b > c$ .

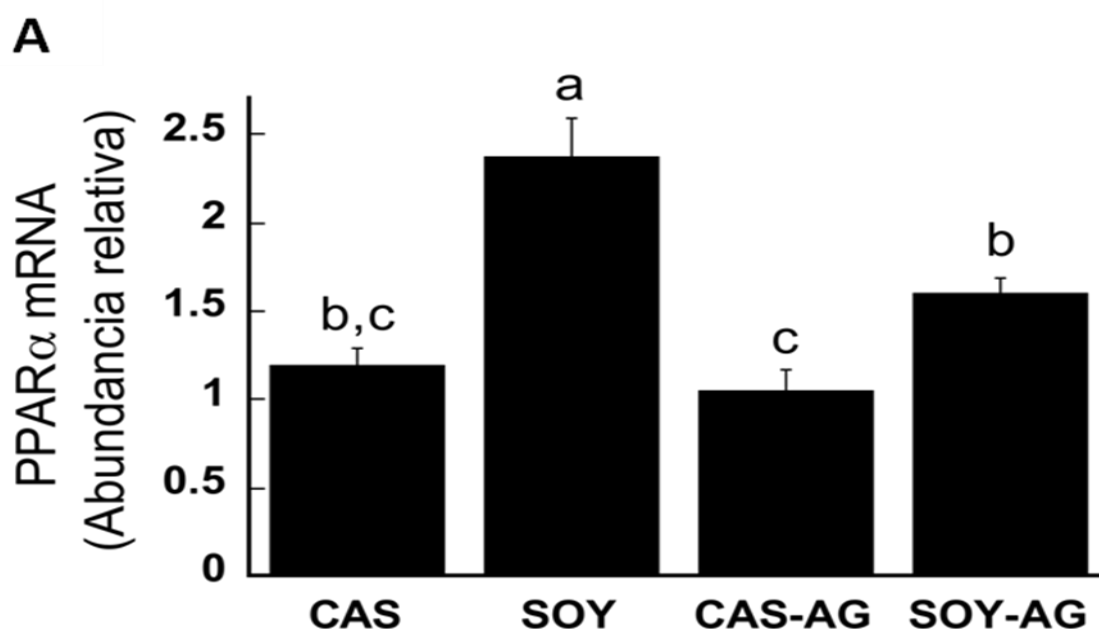
**Contenido de lípidos en el corazón.** El consumo de una dieta alta en grasa incrementa la acumulación de lípidos en el corazón, lo cual puede alterar su función contráctil y generar arritmia cardíaca y enfermedad cardiovascular. La tinción con rojo oleoso nos permite observar la cantidad de grasa acumulada en el tejido. En nuestros cortes de tejido cardíaco comparamos los cuatro grupos y observamos que ambos grupos que fueron alimentados con caseína, presentan una coloración mas intensa en comparación de los grupos alimentados con soya. (Fig. 10C). Para cuantificar el contenido de lípidos en el corazón de los distintos grupos se realizó una extracción de lípidos y cuantificación de colesterol y triacilgliceroles (Fig. 10A y B). Pudimos observar diferencias a simple vista cuando comparamos los grupos del estudio, panel caseína (CAS) con panel de soya (SOY), encontrando mayor color en el grupo de caseína. Si comparamos los grupos que consumieron una dieta alta en grasa podemos observar mayores diferencias en la intensidad de color. Con estos resultados se puede deducir, que los grupos que fueron alimentados con soya, muestran un efecto protector evitando la acumulación de grasa o lipotoxicidad en el corazón.

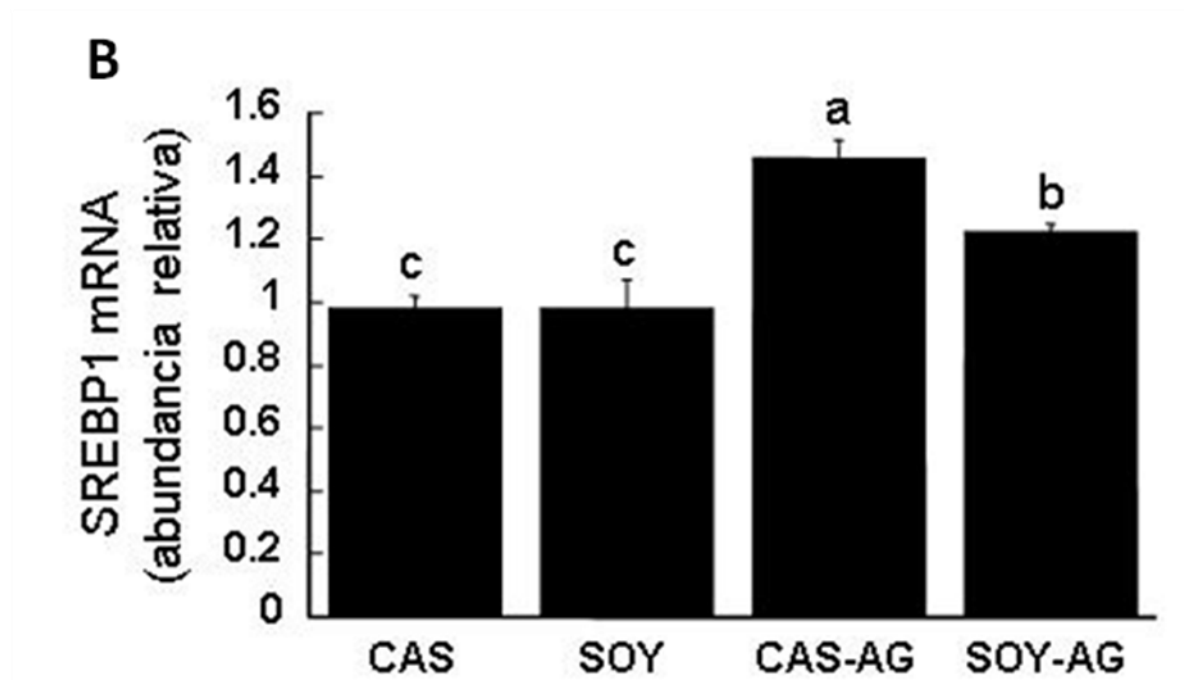




**Figura 10. Tinción de corazón con Rojo Oleoso, contenido de colesterol (A) y triacilgliceroles (B). Grupo de caseína (CAS), Grupo de Soya (SOY), Grupo de caseína con grasa (CAS-HF) y Grupo de soya con grasa (SOY-HF). Se puede observar que en ambos grupos de caseína la intensidad del color rojo es mayor comparado con los de soya (C).**

**Síntesis y oxidación de lípidos en el corazón.** La determinación de la concentración del ARNm es el resultado de la actividad transcripcional de un gen, y la velocidad de degradación del ARNm, lo que se traduce en una concentración de un mensaje en estado estacionario. Para evaluar procesos metabólicos difíciles de medir directamente como la tasa de oxidación y síntesis de lípidos, se puede determinar la expresión de los factores que controlan esos procesos. En el presente estudio, para evaluar la tasa de oxidación de ácidos grasos, se determinó la expresión de PPAR $\alpha$ , que es un factor de transcripción importante para la expresión de enzimas de la oxidación de lípidos en el corazón. Como se puede observar en la figura 11A, la expresión de PPAR $\alpha$  fue mayor en el corazón de los animales alimentados con proteína de soya, indicando una mayor oxidación de lípidos en el corazón. Por otro lado, para evaluar la síntesis y acumulación de lípidos dentro del corazón, se determinó la expresión génica de SREBP1. Este factor de transcripción regula la expresión de las enzimas de captura y esterificación de lípidos en triacilgliceroles. Como se muestra en la Fig. 11B, el gen de SREBP-1 se expresó mas en el corazón de los animales alimentados con la dieta de caseína alta en grasa. Esto indica, que el consumo de esta dieta estimula la lipogénesis y por tanto promueve la lipotoxicidad en las células cardiacas.

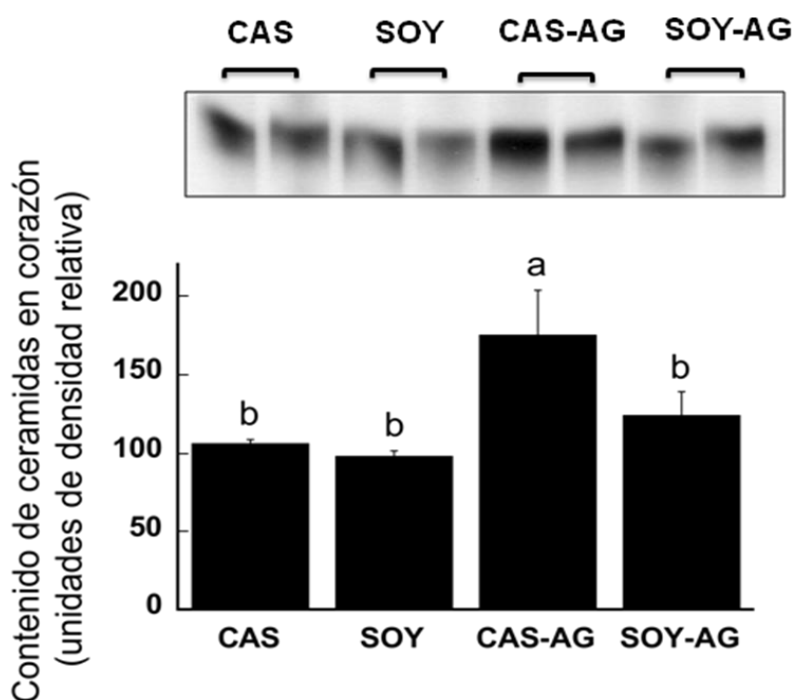




**Figura 11. Expresión génica de PPAR $\alpha$  y de SREBP-1 en corazón** de ratas Sprague Dawley, un modelo de obesidad inducida por la dieta. A) La expresión de PPAR $\alpha$  fue significativamente mayor en el grupos de soya (SOY) y soya alta en grasa (SOY-AG) indicando que hay mayor oxidación de ácidos grasos. B) Observamos una sobreexpresión de SREBP1 en el grupo caseína alta en grasa (CAS-AGG) indicando que hay mayor lipogénesis lo que nos hace suponer que la proteína de soya protege la síntesis de lípidos aun con el contenido de grasa.

**Contenido de ceramidas en el corazón.** La acumulación de lípidos en el corazón puede provocar alteraciones funcionales como arritmias, cardiomiopatía dilatada y otras cardiopatías asociadas a la obesidad. Un mediador importante en el daño celular inducido por lípidos son las ceramidas. Para evaluar el contenido de ceramidas en el corazón de los animales de los diferentes grupos, se determinó su contenido por medio de una reacción enzimática que marca las ceramidas con radioactividad y una separación por cromatografía en capa fina. Este método utiliza la enzima Diacilglicerol cinasa (DGK) Fig. 6. En esta tecnología las ceramidas que se marcan in vitro radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  y posteriormente se identifican al compararlas con un estándar que se usa en la cromatografía.

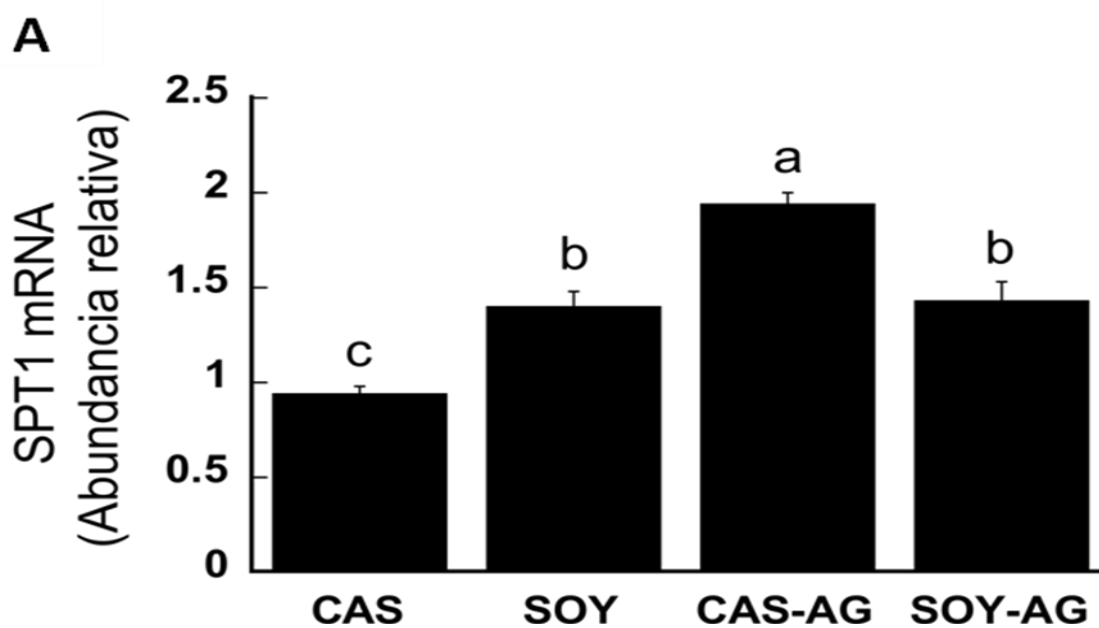
Como se esperaba, los animales alimentados con caseína mostraron una mayor concentración de ceramidas en comparación con aquellos animales alimentados con soya, y esto se asocio con el contenido de lípidos cardiacos. (Fig. 12) Al realizar el análisis densitométrico de las placas autoradiográficas de las cromatografías de las ceramidas se mostró que el grupo de animales alimentados con caseína presentaba un 40% de aumento de la concentración de ceramidas con respecto a las alimentadas con soya.

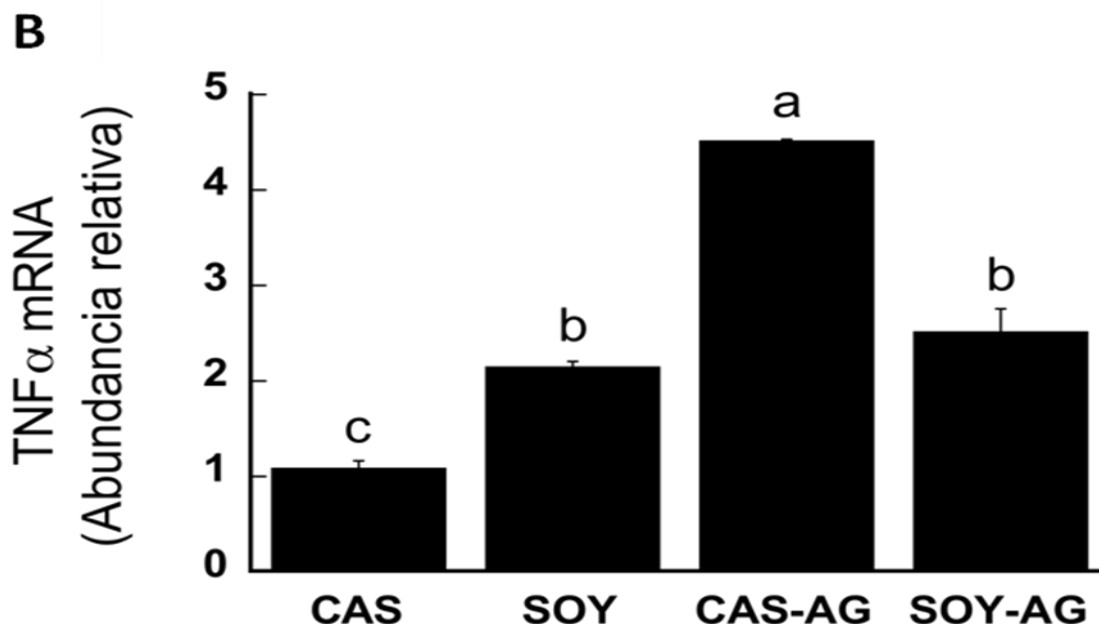


**Figura 12.** Contenido de ceramidas en corazón de ratas Sprague Dawley alimentadas con dieta control con caseína y soya y dietas altas en grasa con caseína y soya.

*Síntesis de ceramidas y estatus inflamatorio del corazón.* Para evaluar la síntesis endógena de ceramidas en el corazón se determinó la expresión de la enzima SPT-1, que es la primera enzima en la ruta de síntesis de ceramidas a partir de ácidos grasos. Como se puede ver en la fig. 13A, el contenido de SPT-1 fue menor en el corazón de los animales alimentados con la dieta alta en grasa con soya respecto a aquellos alimentados con la dieta de caseína alta en grasa. Estos resultados concuerdan con el contenido de ceramidas hallado en el corazón.

Las ceramidas generan un estado de inflamación agudo ya que pueden aumentar la producción de la citosina inflamatoria  $TNF\alpha$ . Para evaluar la producción de  $TNF\alpha$  en el corazón se determinó la concentración de RNAm por PCR en tiempo real. Como se puede ver en la figura 13B, el contenido de  $TNF\alpha$  en corazón se asoció con el contenido de ceramidas.



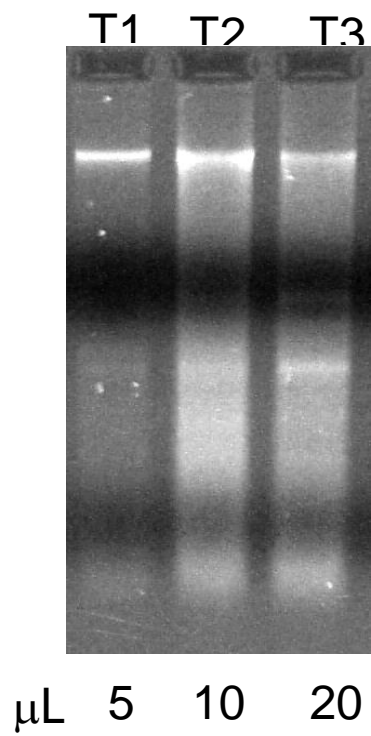


**Figura 13. Expresión génica de SPT1 y TNF $\alpha$  en corazón** de ratas Sprague Dawley alimentadas con dieta control con caseína y soya y dietas altas en grasa con caseína y soya.

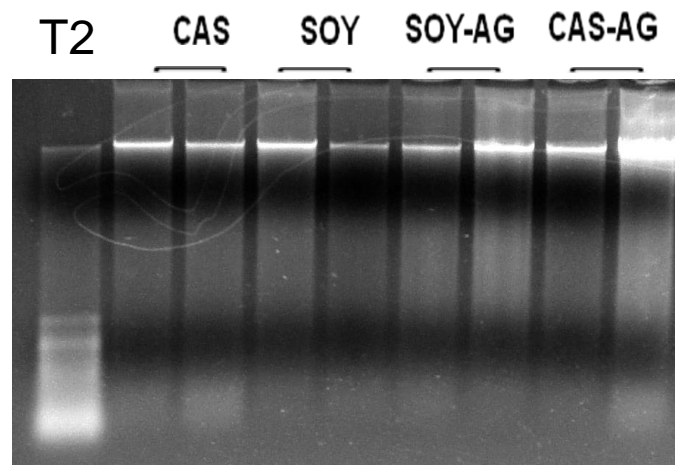
*Escalaramiento de DNA.* Siendo este un indicador de apoptosis, se evaluó la integridad del corazón en los cuatro distintos grupos. Primero se determinó en una muestra control donde se indujo muerte celular a células HepG2 con thapsigargina que es un inductor de apoptosis en distintas concentraciones (Fig. 14).

Se observa en este control el clásico escalaramiento en las células HepG2, por lo que se analizaron las muestras de ADN obtenidos de los corazones de los diferentes grupos tratados. Sin embargo, los resultados mostraron integridad del ADN de las muestras de corazón lo que indica que no se presenta en estos animales un proceso activo de muerte celular (Fig. 15). Estos resultados indican que en este modelo de obesidad inducida por dieta, el acumulo de lípidos en el corazón no promueve la apoptosis, pero si anomalías en la concentración de lípidos en este órgano.





**Figura14. Inducción de Apoptosis a células HepG2 con Thapsigargina** con diferentes concentraciones. T1, T2 y T3 tuvieron diferentes concentraciones 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$  respectivamente. Al verse el escalaramiento mas claro, se tomo T2 para ser corrido junto con el DNA de los corazones.



**Figura 15. Se muestra la integridad del ADN** de los corazones en comparación con las células HepG2 con inducción a apoptosis. Se puede pensar que el daño de los corazones no es tan intenso como para mostrar escalamiento en su DNA como el que observamos con T2.

## 10. DISCUSIÓN

Estudios recientes realizados en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición han demostrado que la soya tiene un efecto sobre el metabolismo de lípidos, reduciendo la acumulación de lípidos en el hígado y tejido adiposo de ratas obesas.<sup>91</sup> Esto sugirió que una dieta alta en proteína de soya prevendría la aparición de alteraciones en la función cardiaca en la obesidad.

Estudios en ratas muestran que la alimentación con proteína de soya permite un crecimiento similar al de las ratas alimentadas con caseína, que es la proteína patrón o estándar. Esto demuestra que el consumo de soya a concentraciones adecuadas cubre los requerimientos nutricionales de los animales además de los efectos benéficos que se han sugerido por su consumo.<sup>22</sup> Pudimos observar que el consumo de soya en comparación con la caseína ejerce efectos en distintos parámetros. Al observar el consumo de los 4 grupos, no encontramos diferencias significativas en cuanto al consumo de energía, pero a pesar de esto, ya sobre la etapa final del estudio que fue de 180 días, se observó que el grupo de soya tuvo menor ganancia de peso en comparación con el grupo caseína, del mismo modo el grupo de soya alta en grasa presentó menor ganancia de peso que el grupo de caseína alta en grasa.

La mayor ganancia de peso del grupo de caseína alto en grasa como se observa en la figura 7, se debió exclusivamente a el contenido de grasa corporal, mostrando que el tipo de proteína podría determinar la acumulación de grasa ya que el grupo alimentado con soya alta en grasa se mantuvo similar a los grupos control de soya y caseína sin mostrar un aumento significativo en ganancia de peso como lo obtuvo el grupo caseína alta en grasa.

En cuanto a los parámetros bioquímicos las ratas alimentadas con caseína alta en grasa presentaron una concentración de glucosa en suero de 130 mg/dl indicando una disminución en la sensibilidad a la insulina en comparación con el grupo soya alta en grasa y los grupos control. Los dos grupos alimentados con soya presentaron menor concentración de glucosa en sangre al final del estudio. La resistencia a la insulina es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular así que los

resultados del presente trabajo sugieren un posible efecto protector de la proteína de soya dietaria sobre la resistencia a la insulina en la obesidad.

Estudios en humanos y animales experimentales han demostrado que la ingestión de proteína de soya reduce el colesterol y triacilgliceroles en suero solo cuando se encuentran elevados.<sup>22,92</sup> Debido a la obesidad inducida en los grupos experimentales, los animales alimentados con la dieta de caseína alta en grasa presentan una elevación en la concentración de colesterol y triacilgliceroles característicos de la enfermedad, mientras que el grupo alimentado con soya presentó una menor concentración de lípidos circulantes, aun en aquellos alimentados con dieta alta en grasa. Esto nos permite relacionar el efecto de la soya sobre la acumulación de triacilgliceroles y colesterol confirmando estudios previos donde el consumo de proteína de soya es capaz de evitar la hiperlipidemia.

Para observar la cantidad de grasa en el tejido cardiaco, se hizo un análisis histológico por medio de la tinción de rojo oleoso que nos permite ver a simple vista de color rojo intenso los acúmulos de grasa. El corazón como ya se mencionó no es un órgano que acumule grasa normalmente por lo que no pudimos ver una tinción tan intensa como la que se puede observar en el hígado, sin embargo, a simple vista podemos observar la diferencia en la coloración de los grupos alimentados con soya contra los grupos alimentados con caseína siendo la tinción de este último grupo mas intensa. Estos resultados en conjunto con los demás, demuestran que la soya ejerce un efecto protector contra la acumulación de grasa o lipotoxicidad en corazón en comparación con la caseína, esto se observó incluso en el grupo que consumió la dieta alta en grasa.

Para conocer si la reducción en el contenido de lípidos en el corazón de las ratas alimentadas con soya fue debido a un aumento en su oxidación o una disminución en su síntesis, se determinó la expresión génica de los factores de transcripción que controlan ambas rutas. PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción cuya función principal en el metabolismo de lípidos es la de regular la expresión de genes relacionados con su ingreso a la mitocondria y su oxidación.<sup>93</sup> Un aumento en la expresión de este factor de transcripción indica un aumento en la oxidación de ácidos grasos en la célula.<sup>94</sup> La proteína de soya fue capaz de aumentar la expresión de PPAR $\alpha$  en el corazón en ambos grupos, esto indica que

la reducción en el contenido de lípidos en estos grupos puede deberse a un aumento en su oxidación.

Por otro lado, SREBP-1 es el factor de transcripción que controla la síntesis de lípidos. En el presente estudio se observó que la expresión de SREBP-1 fue significativamente mayor en el grupo caseína alta en grasa que en cualquiera de los demás grupos experimentales. SREBP-1c al estar involucrado con la activación de los genes de las enzimas que regulan la síntesis de ácidos grasos, indica que el grupo caseína alta en grasa presenta mayor lipogénesis ocasionando mayor acumulación de triacilgliceroles en corazón. La soya posiblemente como se ha observado en otros órganos, actúa como factor hipolipidémico en corazón al reducir la expresión del factor transcripcional SREBP-1 y por lo tanto limitar la expresión de enzimas lipogénicas.

El primer paso en la síntesis de este esfingolípido está regulado por la serina-palmitoil transferasa (SPT-1) que determina la velocidad de la síntesis de ceramidas y nos indica que tanto se está utilizando el palmitato como un precursor de estas.<sup>95</sup> Los resultados sobre la expresión de este gen en corazón mostraron que el grupo alimentado con caseína alta en grasa muestra mayor expresión de SPT-1 indicando que existe más sustrato para la formación de ceramidas. Este patrón, aunque en menor grado lo presentó el grupo control caseína en comparación con los dos grupos de soya y mostró mayor expresión de SPT-1. Se puede decir que el grupo alimentado con soya y soya alta en grasa no refleja posiblemente cantidades elevadas de palmitato lo que podría representar que la formación de ceramidas es baja y esto previene la muerte celular por apoptosis. En los últimos años, se han reportado casos de apoptosis en corazón de personas que presentaron enfermedad cardíaca sugiriendo que la muerte celular puede contribuir a la pérdida del buen funcionamiento de los cardiomiocitos generando diversas patologías.<sup>96</sup>

Para realizar una correlación entre la expresión de SPT-1 y su actividad en corazón, se realizó la determinación de ceramidas por el método de la diacilglicerol cinasa (DGK) Fig. 6, para analizar cuantitativamente ceramidas a través de cromatografía de capa fina (Fig. 12), luego del corrimiento de la placa se le tomó una autoradiografía.<sup>97</sup> La finalidad de esta cromatografía fue la separación de los componentes lipídicos donde según su peso

podemos observar a simple vista por medio de la intensidad de las manchas la cantidad de ceramidas en corazón. Por medio del análisis densitométrico realizado a las placas autoradiografica se observó que el grupo de animales alimentados con caseína alta en grasa presentaba un 40% de aumento de la concentración de ceramidas con respecto a las alimentadas con soya alta en grasa, confirmando los resultados de la expresión génica.

TNF $\alpha$  también presentó una menor expresión en el corazón de las ratas alimentadas con la dieta de soya alta en grasa. Estos resultados sugieren que el consumo de proteína de soya en la obesidad puede reducir la síntesis de ceramidas y la inflamación en cardiomiocitos, evitando el desarrollo de resistencia a la insulina en el corazón.<sup>98,99</sup>

Hemos observado que varios parámetros en este estudio indican acumulación de triacilgliceroles, colesterol e incremento de factores que sugieren que en los grupos con caseína, especialmente caseína alta en grasa, en comparación a los alimentados con soya, muestran alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos. Para medir el alcance de estas alteraciones, se buscó determinar el escalamiento de DNA miocardial que es un marcador de apoptosis que describe el proceso por el cual las células dañadas, en este caso por la lipotoxicidad en corazón, son eliminadas de forma programada.<sup>45,100</sup> Como ya se mencionó, se obtuvo muestra control donde se indujo muerte celular a células HepG2 con thapsigargina obteniendo una muestra visible de escalamiento. Al correr las muestras de los corazones se puede observar la integridad del ADN en comparación con las células HepG2 con inducción a apoptosis. Se puede pensar que el daño de los corazones no es tan intenso como para mostrar escalamiento en su DNA como el que observamos con T2.

## 11. CONCLUSIONES

En la presente investigación pudimos comprobar que la alimentación con proteína de soya a concentraciones adecuadas cubre los requerimientos nutricionales lo que permitió un crecimiento similar al de las ratas alimentadas con caseína, que es la proteína patrón o estándar. Los grupos alimentados con soya tuvieron menor ganancia de peso debido a que presentaron una menor acumulación de grasa que la de los grupos de caseína.

El tipo de proteína no modificó la concentración de insulina, sin embargo el grupo alimentado con la proteína de caseína alta en grasa mostró glucemias significativamente mayores, indicando mayor resistencia a la insulina en comparación con dieta de proteína de soya alta en grasa.

En cuanto a la expresión de genes en corazón, la proteína de soya aumenta la oxidación de ácidos grasos a través del incremento de la expresión de PPAR $\alpha$ , y disminuye la síntesis de lípidos reduciendo la expresión de SREBP-1. Además disminuye la síntesis de ceramidas y la respuesta inflamatoria mediadas por SPT-1 y TNF $\alpha$  respectivamente.

El presente estudio revela que la proteína de soya dietaria en un modelo de obesidad inducida por la dieta reduce la acumulación de lípidos en el corazón y evita la formación de ceramidas. Esto puede reducir el riesgo a presentar lipotoxicidad lo que protege también la función del miocito al prevenir la apoptosis, evitando complicaciones del síndrome metabólico.

La dieta con proteína de soya en comparación con la caseína, mostró una disminución en las concentraciones de triacilgliceroles y colesterol, disminución en factores relacionados con la lipogénesis y ausencia de indicadores de lipotoxicidad, lo que nos permite deducir según nuestra hipótesis, que la proteína de soya tiene un efecto protector sobre la acumulación de grasa en el corazón de un modelo de obesidad inducida por la dieta.

Se propone que las personas con alteraciones en el metabolismo de lípidos, debido a una inadecuada alimentación que se manifiesta con problemas de peso, integren el consumo de

soya, como apoyo en su tratamiento o simplemente para prevenir la aparición de enfermedades cardiacas, como en este caso se ha descrito, u otras asociadas a la obesidad.

## **12. PERSPECTIVAS**

Se propone el realizar estudios de la funcionalidad cardiaca en los animales que desarrollaron obesidad inducida por dieta, para conocer como los cambios en lípidos del corazón pueden impactar al corazón.

Se debe realizar estudios en modelos de animales que desarrollan obesidad espontanea por alteraciones genéticas donde se magnifiquen las alteraciones en el metabolismo de lípidos en el corazón.

Se sugiere realizar los estudios de esta investigación en animales hembra, para comparar los efectos y el impacto de la proteína de soya debido al diferente metabolismo y carga hormonal característicos de este sexo.

---



---

## 12. BIBLIOGRAFIA

- 1 World Health Organization. 2003. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Geneva. [http://www.who.int/hpr/NPH/docs/un\\_consultation.pdf](http://www.who.int/hpr/NPH/docs/un_consultation.pdf)
- 2 Timmers R. 2004. Estudios clínicos en prevención cardiovascular: epidemiología cardiovascular y obesidad. *Forum Lat Prev Car.* 3: 4-11.
- 3 Sanchez, R.L., Berber A. y Fanghanel G. 2001. Incidencia de obesidad en una población mexicana. *Rev Endocrinol Nutr.* 9 (2): 60-66.
- 4 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. *INSP.* México.
- 5 Lowell B. and Spiegelman B. 2000. Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. *Nature.* 404: 652-660.
- 6 García G.E. 2004. ¿Que es la obesidad?. *Rev Endocrinol Nutr.* 12 (4) Supl. 3: S88-S90.
- 7 Metropolitan Life Insurance Company. 1983. New weight standard for men and women. *Stat Bull Metro Life Insur Co.* 64:2.
- 8 World Health Organization. 1995. Physical Status: The use and Interpretation of Anthropometry: Report of a WHO Expert committee. *World Health Organization Technical Report Series* N° 854. WHO.
- 9 Bastos A. A., González B. R., Molinero G. O. y Salguero del Valle A. 2005. Obesidad, nutrición y Actividad Física. *Rev Int Med Cienc Ac Fís Deporte.* 5 (18):140-153.
- 10 Zárate A., Basurto A.L. y Saucedo G.R. 2001. La obesidad: conceptos actuales sobre fisiopatología y tratamiento. *Rev Fac Med UNAM.* 44 (2):66-70.
- 11 Borrajo E. 2002. Aspectos actuales de la obesidad. *An Esp Pediatr.* 56(4): 1-11.
- 12 Hernandez J.S. 2004. Fisiopatología de la obesidad. *Gac Méd Méx.* 140(2): S27-S32.
- 13 Barreto L., Munar F., Acosta E. y Terront A. 2001. Obesidad: fisiología de la ingesta. *RCCP.* 7 (2):46-51.
- 14 Botella C.J., Lledin B.M., Valero G.M. y Varela D.C. 2001. Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *An Med Interna.* 18(3): 152-160.
- 15 Unger H.R., 2004. The hiperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell.* 117:146-146.

- 
- 16 Lee Y., Haris N.R., Duplomb L., Park B.H., Garry J.P., Richardson A.J., Schaffer E.J. and Unger H.R. 2004. Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *PNAS*. 101 (37): 13624-13629.
  - 17 McGavock M.J., Victor G.R., Unger H.R. and Szczpaniak S.L. 2006. Adiposity of the Heart, Revisited. *Ann Intern Med*. 144(7): 517-524.
  - 18 Alegria E.E., Castellano V.J. y Alegria B.A. 2008. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev Esp Cardiol*. 61(7): 752-764.
  - 19 Carvajal K., Hernandez E. M.L. y Moreno S., R. 2007. PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardiaca. *Arch Cardiol Mex*. 77 (4):66-76.
  - 20 Aguilera G.C., Gil C.M., Cañete E.R. y Gil H.A. 2006. Alteraciones del metabolismo lipídico en la obesidad. *Rev Esp Obes*. 4(5):261-274.
  - 21 Lee Y., Wang M.Y., Kakuma T., Wang Z.W. Babcock E., McCorkle., Higa M., Zhou Y.T. and Unger R.H. 2000. Liporegulation in Diet-Induced Obesity. *J Biol Chem*. 276(8): 5629-5635.
  - 22 Unger R.H., 2003. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol*. 65: 333-347.
  - 23 Vikramadithyan K.R., Hirata K., Yagyu H., Hu Y., August A., Homma S. and Golderbg J.I. 2005. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Agonists Modulate Heart Function in Transgenic Mice with Lipotoxic Cardiomyopathy. *JPET*. 313:586-593.
  - 24 Unger H.R, 2004. The hiperleptinemia of obesity-regulator of caloric Surpluses. *Cell*. 117: 145-146.
  - 25 Unger H.R.2003. Mirireview: Weapons of lean body mass destruction: The role of ectopic in the metabolism syndrome. *Endocrinol*. 144 (12): 5159-5465.
  - 26 Bevacqua R.J., 2007. Sobrepeso, obesidad y riesgo cardiovascular. *Rev Insuf Cardiaca*. 2(2): 73-75.
  - 27 López A.J.C. y González G.L.T. 2001. Enfermedades Asociadas a la Obesidad. *Rev Endocrinol Nutr*. 9 (2): 77-85.
  - 28 Messerli F. 1982. Cardiovascular Effects Obesity and Hypertension.. *Lancet*.1: 1165-1168.
  - 29 Eckel H.R. and Krauss M.R. 1998. American Heart Association call to action: Obesity as, a mayoy risk factor for coronary heart disease. *Circulation*. 97:2099-2100.

- 
- 30 Torre V.I., Tovar A.R., Ramos B.VE., Cerbon C., MA. 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.
- 31 Unger H.R and Orci L. 2001. Diseases of liporegulation: new perspectives on obesity and related disorders. *The FASEB J*. 15: 312-321.
- 32 Lelliott C. and Vidal P.AJ. 2004. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes*. 28:522-528.
- 33 Ortega C.C., Diaz F.M., Avalos R.A., Vergara O.M. y Rosales T. AM. 2001. La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Med Méx*. 137(6): 563-577.
- 34 Torres N., Bourges H. y Tovar A.R.1996. Regulación de la expresión génica por nutrimentos. *Arch Latinoam Nutr*. 46:89-96.
- 35 Gutierrez R. J.G, Meléndez M.G., Zúñiga R.A. y Serralde Z.A. 2006. Genómica nutricional y obesidad. *Rev End Nut*. 14(4):247-256.
- 36 Tovar A., Manzano N. y Torres N. 2005. Regulación del metabolismo del colesterol y ácidos grasos en el síndrome nefrótico experimental por las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBP's): efecto de la soya. *Gac Méd Méx*. 141(5): 407-415.
- 37 Rodríguez C.M., Tovar R.A., Del Prado M. y Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin*. 57 (3): 457-472.
- 38 Stoekman A.K. and Towle C.H. 2002. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem*. 277(30): 27029-27035.
- 39 Batheja D.A., Uhlinger D.J., Carton M.J., Ho G. and D'Andrea R.M. 2003. Characterization of serine palmitoyltransferase in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 51:687-696.
- 40 Sánchez M.A. y Laviada D.I. 2006. Papel de los esfingolípidos en la señalización celular. *Dianas*. 1(1):1-5.
- 41 Hanada K. 2003- Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1632:16-30.
- 42 Beresewicz A., Dobrzyn A. and Gorski J. 2002. Accumulation of specific ceramides in ischemic/reperfused rat heart; effect of ischemic preconditioning. *Physiol Pharmacol*. 53(3): 371-382.

- 
- 43 Park T.S., Hu Y., Noh L.H., Drosatos K., Okajima K., Buchanan J., Tuinei J., Homma S., Jiang C.X., Dale E.A. and Goldberg J.I. 2008. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J Lipid Res.* 49:2101-21112.
- 44 Siskind L.J., 2005. Mitochondrial ceramide and induction of apoptosis. *J. Bioenerg Biomembr.* 37(3): 143-153.
- 45 Stanley W.C., Recchia F.A. and Lopaschuk G.D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 85: 1093-1129.
- 46 Schiffrin L.E., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodelling. *Am J Physiol.* 288:1037-1043.
- 47 Finck N.B., Han X., Courtois M., Aimond F., Nerbbone M.J., Kovacs A., Gross W.R. and Kelly P.D. 2002. A critical role for PPAR<sub>α</sub>-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. *PNAS* 100(3): 1226-1231.
- 48 Unger H.R., 2003. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol.* 65:333-347.
- 49 Sharma S., Adroge V.J, Golfman L., Uray I., Lemm J., Youker K., Noon P.G., Frazier H.O. and Taegtmeier H. 2004. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *The FASEB J.* 18:1692-1700
- 50 Okere I.C, Chandler M.P, McElfresh T.A, Rennison J.H, Sharov V, Sabbah H.N, Tserng K, Hoit B.D, Ernsberger P, Young M.E. and Stanley W.C. 2006. Differential Effects of Saturated e unsaturated Fatty Acids Diets on Cardiomyocytes Apoptosis, Adpose Distribution, and Serum Leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H38–H44.
- 51 Baranowski M., Blachnio A., Zabielski P. and Gorski J. 2007. PPAR<sub>α</sub> agonist induces the accumulation of ceramide in the heart of rats fed high-fat diet. *J Physiol Pharmacol.* 58 (1): 57-72.
- 52 Yamashita K., Takahashi A., Kobayashi S., Hirata H., Mesner W.P., Kaufmann H.S., Yonehara S., Yamamoto K., Uchiyama T. and Sasada M. 1999. Caspases mediate tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood.* 93: 674-685.
- 53 Carroll K.K. and Kurowska E.M. 1995. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *J Nutr.* 125: 594S-97S.
- 54 Teixeira S., Potter S., Weigel R., Hannum S., Erdman J. and Haster C. 2000. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on lood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.*; 71:1077-84.

- 
- 55 Tonstad S., Smerud K. and Hoie L. 2002. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr.* 76:78-84.
- 56 Clarkson T. 2002. Soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr.* 32:566S-69S.
- 57 Tovar AR, Murguía F, Cruz C. and Torres N. 2002. A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephritic syndrome. *J Nutr.* 25: 62-72.
- 58 Torres N., Torre V.I. and Tovar A.R. 2006. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem.* 17: 365-373.
- 59 Anderson R. and Wolf W. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125:581S-8S.
- 60 Merrit J.C., 2004. Metabolic Syndrome: Soybean foods and serum lipids. *JAMA.* 98(8): 1032-1041.
- 61 Crouse III J, Morgan T, Terry J, Ellis J, Vitolins M. and Burke G. 1999. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on the plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 159:2070-76.
- 62 Clarkson T. 2002. Soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr.* 132:566S-69S.
- 63 Sirtori R.C., Lovarti R.M., Manzoni C., Monetti M., Pacuzzuconi F. and Gatti E. 1995. Soy and cholesterol reduction: Clinical experience. *J Nutr.* 125(3):598S-605S.
- 64 Food and drug administration. 1999. Food labelling: health claims; soy protein and coronary heart disease. *Fed Regist.* 64: 57699-57733.
- 65 Wang MF., Yamamoto S., Chung H.M., Chung S.Y., Miyatani S., Mori M., Okita T. and Sugano M. 1995. Antihypercholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol.* 41: 187 - 95.
- 66 Sirtori R.C., Lovati R.M., Manzoni C. Monetti M. PAzzuconi F. and Gatti E. 1995. Soy and cholesterol reduction: Clinical experience. *J Nutr.* 125(3): 598S-604S.
- 67 Anderson J. and Johnstone B. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 333:276-282.
- 68 Rosell S.M., Appleby N.P., Spencer E.E. and Key J.T., 2004. Soy intake and blood cholesterol concentrations across-sectional study of 1033 pre- and menopausal women in the oxford arm of the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J clin Nutr.* 80:1391-1396.

- 
- 69 Anderson W.J., Smith M.B and Washnock. 1999. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr.* 70: 464S-474S.
- 70 Maddox A.D., Alavi K.F, Silbernack M.E. and Zawada T.E. 2002. Protective Effects of a soy diet in preventing obesity-linked renal disease. *Kidney Int.* 61: 96-104.
- 71 Messina J.M 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr.*70: 439S-50S.
- 72 Pedraza C.J, Barrera D., Hernández P.R., Medina C., Cruz C., Murguía F., Juárez N.C., Correa R.R, Torres N. and Tovar AR. 2003. Soy protein diet ameliorates renal nitrotyrosine formation and chronic nephropathy induced by puromycin aminonucleoside. *Life Sci.* 74:987-999.
- 73 Lew, Gorfinkel 1979. Obesidad y riesgo de mortalidad. *J Chron Dis.* 32: 563-576.
- 74 Sánchez C.C.P., Pichardo O.E y López R.P. 2004. Epidemiología de la Obesidad. *Gac Méd Méx.* 140 (2):S3-S20.
- 75 Rodilla E., González C., Costa A. J. y Pascual M.J. 2007. Nueva definición del síndrome metabólico:¿mismo riesgo cardiovascular?. *Rev Clin Esp.* 207(2): 69-74.
- 76 Velasquez T.M. and Bhatena J.S. 2007. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.* 4(2): 72-82.
- 77 Wajchenberg L.B. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endoc Rev.* 21(6): 697-738.
- 78 Rubio M.A., Sálas S.J., Barbany M., Moreno B., Aranceta J., Bellido D., Bly V., Carraro R., Formiguera X., Foz M., Pablos P.I., García L.P., Griera J.L., Torre L.M., Martínez J.A., Remesar X., Tebar J. and Vidal J. 2007. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes.* 5(3): 135-175.
- 79 Zhou Y.T., Grayburn P., Karim A., Shimabukuro M., Higa M., Baetens D., Orci L and Hunger R.H. 1999. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *PNAS.* 97(4): 1784-1789.
- 80 Gutiérrez R.J.G., Meléndez M.G., Zúñiga R.A. y Serralde Z.A. 2006. Genómica nutricional y obesidad. *Rev Endocrinol Nutr.* 14 (4): 247-256.
- 81 Pègorier J.P., May L.C. and Girard J. 2004. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr.* 134: 2444S-2449S.
- 82 Ascencio C., Torres N., Isoard A.F., Gomez P FJ., Hernández P.R. and Tovar R.A., 2004. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduced fatty liver in rats. *J Nutr.* 134: 522-529.

- 
- 83 Rogers Q.R. and Harper A.E. 1965. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J Nutr.* 87: 267-263.
- 84 Chiu C.H., Kobacs A., Ford A.D., Hsu F.F., García R., Herrero P., Saffitz E.J., and Schaffer E.J. 2001. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 107: 813-822.
- 85 Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29: 23-29.
- 86 Barrero P.R. 2005. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva.* 3: 1-11.
- 87 Folch J., Lees M., and Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226 (1): 497-509
- 88 Kondo T., Matsuda T., Tashima M., Umehara H., Domae N., Yokoyama K., Uchiyama T. and Okazaki T. 2000. Suppression of heart shock protein-70 by ceramide in heat shock-induced HL-60 cell apoptosis. *J Biol Chem.* 275 (12): 8872-8879.
- 89 Hartmann K., Voss C. And Hartmann N. 1977. Total body analysis of rats with special regard to fat determination. Possibility of determining fat and proteins by calculation. *Nahrung.* 21(10): 919-924.
- 90 Popp B.M., Morrison D.S. and Brennan F.M. 1982. Growth and body composition during long-term total parenteral nutrition in the rat. *Am J Clin Nutr.* 36: 1119-1128.
- 91 Tovar A.R., Torre V.I., Ochoa M., Elias A.L., Ortiz V., Aguilar S., Torres N. 2005. Soy protein reduced hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res.* 46: 1823-1832.
- 92 Merritt J.C. 2004. Metabolic Syndrome: Soybean Foods and serum lipids. *J Natl Med Assoc.* 96 (8): 1032-1041.
- 93 Lee C.H., Olson P. and Evans R.M. 2003. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinol.* 144(6): 2201-2207.
- 94 Hwan H.S., Quon J.M. and Kon K.K. 2005. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activators. *Hypertension.* 46: 1086-1092.
- 95 Shimabukuro M., Higa M., Zhou Y., Wang M., Newgata B.C. and Unger H.R. 1998. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. *J Biol Chem.* 273(49): 32487-32490.
- 96 Feuerstein Z.G. and Young R.P., 2000 Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signalling pathways. *Card Res.* 45: 560-569.

- 
- 97 Hannun A.Y. and Obeid M.L. 2002. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation; stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.* 277(29): 25847-25850.
- 98 Recasens M., Ricart W. y Fernández R.JM. 2004. Obesidad e Inflamación. *Rev Med Univ Navarra.* 48 (2): 49-54.
- 99 Nguyen C., Zechner D., Gutierrez V., Comstock L.K., Glembotski C.C., Quintana J.E. and Sabbadini A.R. 1996. Tumor Necrosis Factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 98(12): 2854-2865.
- 100 Feuerstein Z.G. and Young R.P. 2000. Apoptosis in cardiac disease: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Card Res.* 45 (3): 560-569.