

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE ESTUDIO DE ENFERMEDADES METABÓLICAS
RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN.

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS.

**"INTERVENCIONES NUTRICIONALES EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DISLIPEMIA Y
RESISTENCIA INSULÍNICA. APLICACIÓN DE LA
PROTEÍNA DE SOJA COMO ESTRATEGIA
TERAPÉUTICA".**

Tesista:

Bioq. María Eugenia Oliva

Director de tesis:

Dra. Yolanda B. de Lombardo

Co-director de tesis:

Dra. Adriana Chicco

AÑO 2010

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis ha sido realizada en la cátedra de Química Biológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral de la ciudad de Santa Fe.

La misma fue llevada a cabo bajo la dirección de la Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo, Profesora Titular de la cátedra de Química Biológica, Directora del Departamento de Ciencias Biológicas e Investigadora Principal de CONICET, y la codirección de la Dra. Adriana Chicco, Profesora Asociada de la Cátedra de Química Biológica e Investigadora Independiente de CONICET.

Quiero agradecer a quienes han colaborado en la realización de este trabajo de Tesis:

- A las Doctoras Yolanda Bolzón de Lombardo y Adriana Chicco, quienes ejercieron la dirección y codirección, respectivamente, con absoluta responsabilidad, compromiso y dedicación, orientándome día a día en el trabajo de laboratorio e interpretación de los resultados obtenidos.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las Becas Internas de Postgrado Tipo I y Tipo II, que me permitieran iniciarme y finalizar los estudios de Postgrado en la carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCPyT) (PICTO Proy. 2005 FONCYT – UNL #05 35670 BID 1728 OC/AR) y CONICET (PIP N° 5619/2005) que a través de sus subsidios colaboraron para la realización de esta tesis.
- A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por otorgarme la posibilidad de realizar mi formación de Postgrado en este establecimiento.
- A todos mis compañeros de trabajo: tesistas, técnicos, docentes y no docentes del Departamento de Ciencias Biológicas, quienes me han brindado su apoyo en estos años de trabajo.
- **A mi familia, a Cesar y a mis amigas por brindarme su apoyo incondicional.**

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACC: acetil-CoA carboxilasa

AGL: ácidos grasos libres

AGNE: ácidos grasos no esterificados

Apo: apolipoproteína

ChoRE: elemento de respuesta a carbohidratos

ChREBP: proteína de unión de respuesta a carbohidratos

CoA: coenzima A

CPT-1: carnitina palmitoil transferasa I

C_T: colesterol total

DAG: diacilglicerol

DC: dieta control

DRS: dieta rica en sacarosa

DRS-S: dieta rica en sacarosa – proteína de soja

EM: enzima málica

FAO: oxidasa de ácidos grasos

FAS: sintasa de ácidos grasos

GQ: glucoquinasa

G-6-P: glucosa-6-fosfato

G-6-PDH: glucosa-6-fosfato dehidrogenasa

Glut: transportador de glucosa

HQ: hexoquinasa

IR: receptor de insulina

IRS-1 e IRS-2: sustrato receptor de insulina 1 y 2

LPL: lipoproteína lipasa

LXR- α : receptor X hepático alfa

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PDHc: complejo piruvato dehidrogenasa

PFK I: fosfofructoquinasa I

PK: piruvatoquinasa

PKC: proteína quinasa C

PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal

PPRE: elemento de respuesta proliferador peroxisomal

PP2A: proteína fosfatasa 2A

RI: resistencia insulínica

RXR: receptor del ácido retinoico

SCD-1: estearoil-CoA desaturasa 1

SRE: elemento de respuesta a esteroides

SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides

Tg: triglicéridos

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

VSTG: velocidad de secreción plasmática de triglicéridos

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa

Xu-5-P: xilulosa-5-fosfato

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DIETAS.....	37
2- OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS.....	39
3- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES – MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
3.1 Determinaciones séricas.....	40
3.2 Análisis de la composición de la carcasa.....	41
3.3 Determinaciones “in vivo”.....	42
3.4 Determinaciones en tejido hepático.....	45
3.4.1 Determinación de metabolitos.....	45
3.4.2 Determinaciones de actividades enzimáticas.....	46
1- Enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos.....	46
2- Enzimas involucradas en la lipogénesis.....	47
3.4.3 Expresión de las masas proteicas por la técnica Western blot.....	49
a) Receptor activador de la proliferación peroxisomal-α (PPAR-α).....	49
b) Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP-1).....	50
3.5 Determinaciones en músculo esquelético.....	51
3.5.1 Determinación de metabolitos y enzimas.....	51
3.5.2 Expresión de la masa proteica del transportador de glucosa Glut-4.....	54
4- REACTIVOS UTILIZADOS.....	55
5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.....	55

RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	56
PARTE 1. ANALISIS SECUENCIAL DEL TIEMPO REQUERIDO POR LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA PARA MEJORAR O REVERTIR LA DISLIPEMIA Y LA MODERADA HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA.....	56
a) Ganancia de peso corporal e ingesta calórica.....	57
b) Contenido de triglicéridos hepáticos y niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total, AGNE, glucosa e insulina.....	59
PARTE 2. EFECTOS DE LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA SOBRE METABOLITOS, ENZIMAS Y RECEPTORES NUCLEARES EN TEJIDO HEPÁTICO.....	63
a) Ganancia de peso corporal e ingesta calórica, peso del tejido adiposo y composición de la carcasa.....	63
b) Metabolitos plasmáticos y niveles de insulina.....	66
c) Velocidad de secreción de VLDL-Tg y remoción de Tg plasmáticos.....	67
d) Actividades de enzimas involucradas en la lipogénesis.....	69
e) Expresión de la masa proteica del factor de transcripción SREBP-1.....	71
f) Actividades de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos.....	73
g) Expresión de la masa proteica del factor de transcripción PPAR- α	74
DISCUSIÓN PARTE 2.....	76
PARTE 3. EFECTOS DE LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA SOBRE LA SENSIBILIDAD INSULÍNICA PERIFÉRICA GLOBAL. UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA EN EL MÚSCULO GASTRONEMIO.....	83
a) Estudio de la sensibilidad insulínica periférica global: velocidad de infusión de glucosa (VIG).....	84
b) Vía oxidativa de la glucosa y contenido de triglicéridos (Tg) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica.....	86

c) Vía no oxidativa de la glucosa: contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato (G-6-P) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglicémica-hiperinsulinémica.....	88
d) Expresión de la masa proteica del transportador Glut-4 y actividad de la enzima hexoquinasa.....	90
DISCUSIÓN PARTE 3.....	93
CONCLUSIONES.....	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
PUBLICACIONES, CAPITULO DE LIBRO Y PRESENTACIÓN A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS.....	117

TABLAS Y FIGURAS

Tablas

	Página
Tabla 1. Aplicaciones de la soja en la alimentación humana.....	13
Tabla 2. Aplicaciones de la soja en la industria.....	13
Tabla 3. Componentes de la proteína de soja.....	14
Tabla 4. Contenido estimado de isoflavonas en algunos productos de proteína de soja.....	15
Tabla 5. Composición aminoacídica de caseína y proteína de soja.....	17
Tabla 6. Composición de las dietas experimentales.....	38
Tabla 7. Niveles plasmáticos de AGNE, glucosa e insulina en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S al final del período experimental.....	61
Tabla 8. Peso corporal e ingesta calórica de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.....	65
Tabla 9. Niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE, C _T , glucosa e insulina en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	66
Tabla 10. Actividad hexoquinasa en músculo gastronemio de animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	92

Figuras

	Página
Figura 1. Comparación de la estructura del metabolito de isoflavona con la del estradiol donde se observa una gran similitud en el arreglo planar espacial de las dos moléculas.....	16
Figura 2. Metabolismo hepático de la fructosa y glucosa.....	22
Figura 3: Mecanismos de transcripción del SREBP.....	24
Figura 4. Mecanismos de transcripción del PPAR.....	25
Figura 5. Mecanismo donde el PPAR suprime la actividad del SREBP-1c por interacción con LXR-RXR.....	27
Figura 6. Mecanismo de acción del ChREBP.....	28
Figura 7. Modificación del metabolismo lipídico hepático inducido por la ingesta crónica de DRS.....	29
Figura 8. Efectos de la ingesta crónica de DRS sobre el músculo gastronemio.....	34
Figura 9. Diseño experimental.....	39
Figura 10. Diseño experimental secuencial.....	57

Figura 11. Peso corporal en los animales alimentados con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS-proteína de soja (DRS-S).....	58
Figura 12. Contenido de triglicéridos hepáticos y niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.....	60
Figura 13. Velocidades de secreción hepática de VLDL-Tg y de remoción plasmática de Tg ($K_2\% \text{ min}^{-1}$) y concentración de triglicéridos (Tg) y colesterol total (C_T) hepáticos en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	68
Figura 14. Actividades de enzimas lipogénicas: ACC, FAS, EM y G-6-P DH en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	70
Figura 15. Expresión de la masa proteica del SREBP-1 en hígado de animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	72
Figura 16. Actividades de las enzimas CPT-1 y FAO en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	73
Figura 17. Expresión de la masa proteica del PPAR- α en hígado de animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.....	75
Figura 18. Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.....	85
Figura 19. Contenido de triglicéridos (Tg) y actividad PDHa al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en el músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.....	87

Figura 20. Contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato (G-6-P) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S..... **89**

Figura 21. Expresión de la masa proteica del Glut-4 al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en el músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S..... **91**

RESUMEN



RESUMEN

El Síndrome metabólico, integrado por una constelación de anormalidades tales como diabetes tipo 2, hipertensión, dislipemia, insulino resistencia y obesidad, tiene gran incidencia en la comunidad. Experimentalmente es posible lograr un modelo similar, en aspectos bioquímicos-metabólicos, a este síndrome por manipulación dietaria, por ejemplo entre otros, a través de la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) o en grasas saturadas. Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que cambios en la composición de los macronutrientes de las dietas (hidratos de carbono y grasa) son un factor importante en la prevención o mejoramiento de numerosos desordenes metabólicos incluidos en este síndrome. Al respecto, existen pocos trabajos focalizados en el cambio de la fuente proteica de la dieta (de origen animal caseína, por proteínas de origen vegetal, por ejemplo soja), sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas inducidas por la ingesta crónica de DRS. Estas alteraciones incluyen dislipemia, resistencia insulínica, anormal homeostasis de la glucosa, adiposidad visceral, lipotoxicidad y moderado sobrepeso, las cuales son estables a partir de los 3 meses de ingesta hasta alcanzar al menos 9 meses.

A partir de estudios a nivel humano y en animales de experimentación que señalan los efectos beneficiosos de la proteína de soja sobre la dislipemia e insensibilidad insulínica, los objetivos del presente trabajo de tesis fueron: **I)** Determinar en forma secuencial si una vez alcanzada la dislipemia y resistencia insulínica estable (4 meses de ingesta con una DRS) el cambio del tipo de proteína de la dieta puede mejorar o revertir la dislipemia y la moderada hiperglucemia. Una vez determinado el tiempo más adecuado capaz de lograr importantes modificaciones, se analizaron los siguientes aspectos bioquímicos-metabólicos: **I)** En tejido hepático se evaluó el contenido de triglicéridos y colesterol; in vivo la velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos y remoción plásmatica de triglicéridos; enzimas involucradas en la lipogénesis y la expresión de la masa proteica del SREBP-1; enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos y la expresión de la masa proteica del PPAR- α . **II)** En músculo esquelético se analizó en condiciones basales y al finalizar la clamp euglucémica-hiperinsulinémica, la utilización de la glucemia (vías oxidativas y no oxidativas), la actividad de la enzima hexoquinasa y la expresión de la masa proteica del transportador de glucosa Glut-4.

Los resultados del análisis secuencial demuestran que luego de 4 meses de sustitución de caseína por proteína de soja como fuente proteica en la DRS, se logró la normalización de los niveles de triglicéridos, colesterol y glucosa plasmáticos. Además, en tejido hepático se normalizó



el contenido de triglicéridos. A partir de estos resultados consideramos que 4 meses, era el tiempo adecuado para analizar algunos mecanismos que subyacen en el mejoramiento o reversión de la dislipemia y homeostasis de la glucosa inducidos por la administración de la proteína de soja aislada dietaria.

La velocidad de secreción de VLDL-Tg y el contenido hepático de Tg y colesterol fueron completamente normalizados. Además, la adición de proteína de soja aislada disminuyó la excesiva disponibilidad de AGNE plasmáticos presentes en la DRS. Esto contribuyó a decrecer la síntesis y secreción de VLDL, limitando la formación de partículas LDL reduciendo los niveles plasmáticos de Tg y colesterol. La reversión de la dislipemia sugiere que la principal acción de la proteína de soja en el metabolismo lipídico hepático está relacionado con un cambio en el destino metabólico: síntesis y almacenamiento de lípidos a oxidación, y que ambos mecanismos junto con la normalización de la remoción de Tg plasmáticos, contribuyen al efecto hipolipemiante de la proteína de soja. Los resultados obtenidos avalan esta sugerencia, ya que la administración de proteína de soja a la DRS fue capaz de disminuir no solo las incrementadas actividades de las enzimas lipogénicas: ACC, FAS, EM y G-6-P DH sino también la expresión de la masa proteica del SREBP-1. Esto se acompañó de un incremento en la expresión de la masa proteica del PPAR- α y las actividades de las enzimas CPT-1 y FAO favoreciendo, a nivel hepático, la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos.

Dentro de este contexto, la proteína de soja dietaria fue capaz de normalizar la glucemia basal sin cambios en la insulinemia. Esto nos condujo a analizar el posible efecto beneficioso de la proteína de soja sobre la sensibilidad insulínica periférica global así como algunos aspectos relacionados con la vía oxidativa y no oxidativa de la glucosa en el músculo esquelético en condiciones basales y bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulinémica). Los resultados obtenidos muestran un sustancial mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica global. La proteína de soja dietaria revirtió la alterada oxidación de glucosa (la actividad PDHa, forma activa de PDHc, alcanzó valores normales) y normalizó el contenido intramuscular de triglicéridos en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina. El contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato mostraron un comportamiento similar al de los animales controles a nivel basal o frente al estímulo de la hormona. Mejoró significativamente la disminuida actividad de la enzima hexoquinasa observada en los animales alimentados con DRS. Los niveles basales de la expresión de la masa proteica del Glut-4 fueron similares en todos los grupos experimentales. La insulina estimuló la translocación del Glut-4 hacia la membrana plasmática solamente en el grupo control y cuando la fuente proteica en la DRS fue la proteína de soja. Sin embargo, en este último grupo los



niveles de la masa proteica del Glut-4 de membrana no alcanzaron aún los valores observados en el grupo DC.

Por último, la administración de proteína de soja aislada dietaria previno el incremento de peso corporal asociado a una menor ingesta calórica, mejorando la adiposidad visceral.

En conclusión, la proteína de soja aislada dietaria fue capaz de revertir la dislipemia y la esteatosis hepática y mejorar la sensibilidad insulínica periférica global, mejorando el metabolismo de glucosa en el músculo esquelético. Esto podría ser consecuencia de algunos de los mecanismos analizados en este trabajo. Sin embargo, no podemos descartar que la reducción de la ingesta calórica en los animales alimentados con proteína de soja aislada, podría contribuir en si misma sobre algunos de los efectos beneficiosos del consumo de esta proteína mencionados anteriormente.

Si bien la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales hacia el humano debe ser muy cuidadosa, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos que podrían estar involucrados en el mejoramiento y/o reversión de alteraciones metabólicas susceptibles de modificar por la dieta. Atento a ello, consideramos que el consumo de soja como fuente proteica de la dieta podría contribuir, entre otros nutrientes, en la prevención y mejoramiento de patologías asociadas al Síndrome plurimetabólico.

SUMMARY



SUMMARY

Metabolic syndrome, consisting of a constellation of abnormalities such as type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia, insulin resistance and obesity, has a large impact in the community. Experimentally it is possible to achieve a similar model, in biochemical-metabolic aspects, to this syndrome by dietary manipulation, for example among others, through the administration of a sucrose-rich diet (SRD) or saturated fat. Numerous epidemiological and experimental studies suggest that changes in the composition of macronutrient diets (carbohydrate and fat) are an important factor in the prevention or improvement of many metabolic disorders included in this syndrome. In this regard there are few studies focused on changing the dietary protein source (animal casein replaced by vegetable proteins, for example soy) on biochemical-metabolic alterations induced by chronic ingestion of SRD. These disorders include dyslipidemia, insulin resistance, impaired glucose homeostasis, visceral adiposity, lipotoxicity and moderate overweight, which are stable after 3 months of intake to at least 9 months.

From studies on human and experimental animals that show the beneficial effects of soy protein on dyslipidemia and insulin insensitivity, the objectives of this thesis were: **I)** Determine sequentially if after reaching the dyslipidemia and stable insulin resistance (4 months of intake a SRD) change the type of protein in the diet can improve or reverse the dyslipidemia and moderate hyperglycemia. Once the most suitable time can make significant changes, was analyzed for biochemical-metabolic aspects: **I)** In liver was evaluated the triglycerides and cholesterol content; in vivo the hepatic triglyceride secretion rate and plasma removal of triglycerides; enzymes involved in lipogenesis and the protein mass expression of SREBP-1; enzymes involved in fatty acid oxidation and the protein mass expression of PPAR- α . **II)** In skeletal muscle was analyzed at the basal state and at the end of euglycemic-hyperinsulinemic clamp the glucose utilization (oxidative and nonoxidative pathways); the hexokinase enzyme activity and the protein mass expression of glucose transporter Glut-4.

The results of sequence analysis showed that after 4 months of substitution of casein with soy protein as protein source in SRD, was achieved normalization of plasma triglyceride, cholesterol and glucose levels. In addition, in liver tissue was normalized triglyceride content. From these results we believe that 4 months was adequate time to analyze some mechanisms underlying the improvement or reversal of dyslipidemia and glucose homeostasis induced by administration of dietary soy protein isolate.



The hepatic VLDL-Tg secretion rate and liver triglycerides and cholesterol content were fully normalized. Besides, the addition of soy protein isolate reduced the excess availability of plasma NEFA present in the SRD. This contributed to decrease the synthesis and secretion of VLDL-Tg, limiting the formation of LDL particles reducing plasma triglycerides and cholesterol levels. The reversal of dyslipemia suggests that the principal action of soy protein on hepatic lipid metabolism involves a shift in the metabolic fate: synthesis and storage to lipids oxidation, and both mechanisms, together with the normalization of the removal plasma Tg, contribute to the lipid-lowering effects of soy protein. The results support this suggestion, since the administration of soy protein in the SRD was able to reduce not only the increased activities of lipogenic enzymes: ACC, FAS, ME and G-6-P DH but also the protein mass expression of SREBP-1. This was accompanied by a increase of protein mass expression of the transcription factor PPAR- α and the activities of the enzymes CPT-1 and FAO favoring, at liver, the mitochondrial and peroxisomal oxidation of fatty acids.

In this context, dietary soy protein was capable of normalizing the basal glucose with no change in insulinemia. This led us to analyze the possible beneficial effect of soy protein on whole-body peripheral insulin sensitivity as well as some global aspects related with glucose oxidative and nonoxidative pathways in skeletal muscle in basal conditions and under the stimulus of insulin (clamp euglycemic-hyperinsulinemic). The results show a substantial improvement of the whole-body peripheral insulin sensitivity. Dietary soy protein reversed the impaired glucose oxidation (PDHa activity, active form of PDHc, reached normal values) and normalized intramuscular triglyceride content in basal conditions and compared to the stimulation of insulin. The glycogen and glucose-6-phosphate content showed similar behavior to that of the control animals at basal conditions or compared to the stimulus of the hormone. Decreased significantly improved the enzyme hexokinase activity observed in animals fed SRD. Basal levels the protein mass expression of Glut-4 were similar in all experimental groups. Insulin stimulated the translocation of Glut-4 to the plasma membrane only in the control group as the protein source in the SRD was soy protein. However, in the latter group the protein mass of membrane Glut-4 levels still did not reach the values observed in the DC group.

Finally, administration of dietary soy protein isolate prevented the increase in body weight associated with a lower energy intake, improving the visceral adiposity.

In conclusion, dietary soy protein isolate was able to reverse the dyslipemia and steatosis hepatic and improve whole-body peripheral insulin sensitivity, improving glucose metabolism in



skeletal muscle. This could be due to some of the mechanisms discussed in this work. However, we can not exclude that the reduction in energy intake in animals fed soy protein isolate, could help itself in some of the beneficial effects of this protein consumption above.

While the extrapolation of results obtained in animal models to humans should be very careful, this paper aims to contribute to the knowledge of the mechanisms that might be involved in improving and/or reversal of metabolic abnormalities potentially modifiable by diet. Attentive to it, we believe that consumption of soy as a protein source in the diet could contribute, among other nutrients, in the prevention and improvement of pathologies associated with Syndrome plurimetabolic.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

El Síndrome plurimetabólico, también llamado Síndrome X, es descrito como una asociación de desórdenes metabólicos que incluyen, entre otros, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, resistencia insulínica (RI), dislipemia, obesidad e hipertensión arterial, las que en su conjunto constituyen factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Basciano y col., 2005; Freedman y col., 2001).

Los factores genéticos y medioambientales (sedentarismo, una inadecuada alimentación: dietas ricas en grasas saturadas y/o carbohidratos simples) juegan un importante rol en el desarrollo del Síndrome plurimetabólico. En los últimos años, el aumento en el consumo de fructosa proveniente de la ingesta elevada de sacarosa y de jarabe de alto contenido en fructosa podría estar contribuyendo en el incremento de la prevalencia de obesidad, entre otras anomalías incluidas en este síndrome. La incidencia de diabetes tipo 2 en la población también ha aumentado considerablemente en los últimos años. Por eso se ha descrito el término “Diabeobesidad” como la incidencia incrementada de diabetes en combinación con obesidad como resultado de posibles cambios en hábitos de la población, tales como la nutrición y la adopción de vidas más sedentarias.

La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 está en aumento a nivel mundial, debido al predominio de sobrepeso, obesidad, inactividad física y alimentación no saludable. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el mundo hay más de 220 millones de personas con diabetes. Estudios de Gagliardino, (2000) demostraron que la prevalencia de diabetes mellitus alcanza en nuestro país cifras del 6-7%. Este porcentaje se va incrementado notablemente en los últimos años. Más aún, este hecho se observa en individuos muy jóvenes (30 años). Según estudios del Ministerio de Salud de la Nación, la prevalencia actual de diabetes en la Argentina es del 9,6% y el 95% de los diagnosticados presentan diabetes tipo 2 (Segunda Encuesta Nacional de Factores de riesgo, 2009).

La prevalencia de obesidad también se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, considerándose una epidemia global, e incluso la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en el mundo, afectando tanto a países desarrollados como a aquellos, incluyendo el nuestro, en vías de desarrollo (Segunda Encuesta Nacional de Factores de riesgo, 2009).



A nivel experimental existen numerosos modelos animales que desarrollan anormal homeostasis de la glucosa, diabetes tipo 2, dislipemia, RI, obesidad y adiposidad visceral de origen genético o inducida por manipulación nutricional que son utilizados con el propósito de dilucidar diferentes aspectos bioquímicos-metabólicos y moleculares que subyacen en el desarrollo del Síndrome metabólico.

Entre los modelos de origen genético se encuentran: la rata obesa Zucker (ZDF) (Peterson y col., 1990), la rata OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) (Kawano y col., 1992), la rata JCR LA cp (corpulenta) (Russell y Amy, 1986), el ratón ob/ob (Martin y col., 1973), etc. En relación a los modelos inducidos nutricionalmente numerosos trabajos han demostrado que la composición de los macronutrientes de la dieta constituye un factor importante en el desarrollo de la dislipemia, anormal homeostasis de la glucosa, RI, adiposidad visceral, etc. Entre estos los más utilizados son:

- Modelo de dieta rica en grasas saturadas (HFD del inglés “high fat diet”): Este modelo se basa en la administración crónica a roedores normales de una dieta rica en grasas saturadas (más del 60% de la energía total). Esto induce resistencia insulínica en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo que se asocia a una dislipemia, anormal homeostasis de la glucosa y obesidad (Storlien y col., 1987; Kraegen y col., 1986). En este modelo, se observó en ratas Sprague Dawley alimentadas durante 2 a 6 meses con dieta rica en grasas una disminución en la masa proteica del sustrato receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2) en tejido adiposo acompañado de una menor expresión génica a nivel del ARNm del transportador de glucosa Glut-4 (Pedersen y col., 1991; Sevilla y col., 1997). Estudios de Bell y col. (2000) demostraron en ratas machos Wistar alimentadas durante 3 semanas con una dieta rica en grasa (59% calorías) un aumento en las concentraciones de diacilglicerol y acil-CoA de cadena larga en músculo esquelético, lo cual se vio acompañado por un incremento en la expresión de la masa proteica de la proteína quinasa C θ (PKC θ) de membrana. Además, Taouis y col. (2002) demostraron en músculo esquelético de ratas machos Wistar alimentadas con dieta rica en grasa (60% calorías) durante 5 semanas una alteración en las primeras secuencias de la señal insulínica a nivel de la fosforilación de las tirosinas del IRS-1 y en la actividad de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K).

- Modelo de dietas ricas en hidratos de carbono: Numerosos investigadores (Lombardo y Chicco, 2006; Reaven y col., 1979; Lombardo y col., 1983; Pagliassotti y col., 1996) han demostrado que la administración de una dieta rica en hidratos de carbono simples (sacarosa, fructosa) en forma crónica a ratas normales induce hipertrigliceridemia, alterada homeostasis de la glucosa e insensibilidad insulínica periférica global, dependiendo de la cantidad de



sacarosa/fructosa administrada y del tiempo de administración de la dieta. Estas alteraciones evolucionan en presencia de dislipemia desde normoglucemia e hiperinsulinemia, luego de un corto período (3 semanas) de administración de una dieta rica en sacarosa (DRS), a hiperglucemia y normoinsulinemia basal acompañada de una pronunciada resistencia insulínica periférica global a partir de las 15 semanas. Estas anomalías metabólicas se agravan cuando la dieta se extiende por períodos mayores de tiempo (40 semanas). Con la cronicidad de la ingesta se observa además un sustancial incremento de la adiposidad visceral y una mayor deposición de lípidos (lipotoxicidad) en tejidos no adiposos (hígado, músculo esquelético, corazón, páncreas) (Lombardo y col., 1996b; Gutman y col., 1987; Pighin y col., 2003; Chicco y col., 2000).

La mayor parte de los estudios experimentales que examinan la posibilidad que la modificación de la composición de los macronutrientes dietarios pueda revertir y/o mejorar la dislipemia y resistencia insulínica se han focalizado en general en cambios en la composición del tipo de grasa dietaria. Así por ejemplo, numerosos estudios en humanos han demostrado los efectos beneficiosos de la incorporación de ácidos grasos polinosaturados [n-3 de origen marino eicosapentaenoico 20:5 (EPA) y docosahexaenoico 22:6 (DHA)] en las dietas, entre ellos la reducción del riesgo cardiovascular debido a acciones antiarrítmicas, antiinflamatorias, antitrombóticas e hipolipemiantes. Además la ingesta de dichos nutrientes, mejora la sensibilidad a la insulina y el sobrepeso, pudiendo ejercer un importante rol protector contra los síntomas adversos del Síndrome plurimetabólico (Mori y col., 2000; Kris-Etherton y col., 2002; Hwang, 2000; Martín de Santa Olalla y col., 2009).

Por otra parte, numerosos trabajos a nivel experimental demuestran que el aceite de pescado dietario (rico en DHA y EPA) disminuye el contenido de triglicéridos plasmático y tisular (Harris y col., 1997; Storlien y col., 1987). En músculo esquelético, sitio clave en la metabolización de la glucosa bajo la acción de la insulina, mejora la acción de la hormona sobre el metabolismo de la glucosa pudiendo prevenir el desarrollo de resistencia insulínica cuando se lo administra conjuntamente con dietas ricas en grasas o sacarosa por períodos cortos de tiempo (3-6 semanas) (Klimes y col., 1993; Podolín y col., 1998). Además, en este contexto Lombardo y col. (1996a) demostraron en animales alimentados con DRS por un período prolongado de tiempo (6 meses), que la sustitución parcial isocalórica del tipo de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao) durante los últimos 2 meses de experimentación, normaliza la dislipemia y la homeostasis de la glucosa sin modificaciones en la insulinemia, mejorando la sensibilidad insulínica



periférica global. Además, reduce la adiposidad visceral y disminuye el contenido graso de la carcasa (Lombardo y Chicco, 2006; Rossi y col., 2005).

Otro aspecto interesante relacionado a modificaciones en la composición de nutrientes se refiere al cambio en el tipo de carbohidrato dietario. En esta línea, Cohen y Teitelbaum, (1964) observaron que la intolerancia a la glucosa inducida en ratas alimentadas durante 3 meses con DRS (67% p/p) se pudo revertir cuando la fuente de hidrato de carbono de la dieta (sacarosa) fue reemplazada completamente por almidón durante un lapso de 1 mes. Sin embargo, cuando estos animales volvieron a alimentarse con la DRS, se restableció la intolerancia a la glucosa en solo 1 semana. Además, un estudio reciente de Fortino y col. (2007) demostró en ratas alimentadas crónicamente con DRS (63% p/p), que la reducción en la cantidad de sacarosa en la dieta al 20% durante un período prolongado de tiempo (12 semanas), normalizó la dislipemia, asociada a un decrecimiento de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad – triglicéridos (VLDL-Tg) e incrementó la remoción plasmática de triglicéridos. Esto se acompañó de un descenso significativo del pool de triglicéridos hepáticos y un mejoramiento en la homeostasis de la glucosa, sugiriendo que al reducir el porcentaje de sacarosa dietaria es posible mejorar o revertir las alteraciones presentes en este modelo de dislipemia y resistencia insulínica experimental.

A diferencia de los distintos estudios que analizan el efecto beneficioso del cambio en la fuente de hidratos de carbono (simples/complejos) o el tipo de grasa dietaria (saturada, polinosaturada), existen pocos trabajos focalizados en el cambio de la fuente proteica de la dieta (de origen animal caseína, reemplazada por proteínas de origen vegetal, por ejemplo soja), sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas antes mencionadas inducidas por la ingesta crónica de DRS. Además los mismos analizaron algunos aspectos muy puntuales y con dietas administradas por períodos cortos de tiempo (Lavigne y col., 2000; Pfeuffer y Barth, 1992).

Aspectos generales de la proteína de soja

La **soja o soya** (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas cultivada en sus principios en el este de Asia. El nombre de genero de la soja es *Glycine*, y la especie *Glycine max* (Singh y col., 2006).



Clasificación científica

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Familia: Fabaceae

Género: *Glycine*

Especie: *Glycine max*

Nombre binomial: *Glycine max* (L.)



Origen y difusión

La soja es nativa del este asiático, probablemente originaria del norte y centro de China. Hacia el año 3000 AC los chinos ya consideraban a la soja como una de las cinco semillas sagradas. Su producción estuvo localizada en esa zona hasta después de la guerra chino-japonesa. Es el alimento fuerte de los pueblos del oriente.

En la India se la promocionó a partir de 1935. Las primeras semillas plantadas en Europa provenían de China y su siembra se realizó en el Jardín des Plantes de París en 1740. Años más tarde (1765) se introdujo en América (Georgia, EE.UU.) desde China, vía Londres. Sin embargo, no fue hasta la década del 40 donde se produce la gran expansión del cultivo en ese país, liderando la producción mundial de soja a partir de 1954 hasta la actualidad.

En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó también en la década del 40, constituyéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soja. Al presente Estados Unidos, Brasil, Argentina y China son los países que lideran dicha producción (FAOSTAT, 2009).

Principales productores de soja - 2009

(millones de toneladas)

 <u>Estados Unidos</u>	96,1
 <u>Brasil</u>	61,6
 <u>Argentina</u>	52,5
 <u>China</u>	15,4
 <u>India</u>	10,1
 <u>Paraguay</u>	6,9
 <u>Canadá</u>	3,6
 <u>Bolivia</u>	2,7

Total mundial 246,7



Sembrado de soja en Argentina

Fuente: food and agriculture organization of the united nations:
for a world without hunger (FAOSTAT, 2009).

La soja es utilizada para una infinidad de productos que pueden reemplazar a otros de origen animal debido a su aporte proteico, por ejemplo en forma de harina de soja, área en la que compete internacionalmente con la harina de pescado.

El gran valor proteico de la legumbre lo hace sustituto de la carne. De la soja se producen subproductos como la leche de soja o carne de soja.

Es uno de los alimentos principales en países orientales como China y Japón donde se obtienen distintos derivados como el aceite, la salsa de soja, los brotes de soja, el tōfu, nattō o miso. Del grano de soja se obtiene el *poroto tausí* que es el frijol de soja salado y fermentado, muy usado en platos chinos (Ridner, 2006).



Los principales usos de la soja en la alimentación humana y en la industria se detallan en las **Tablas 1 y 2:**

Tabla 1. Aplicaciones de la soja en la alimentación humana.

Porotos verdes	Ensaladas – Platos calientes – Conservas – Sopas – Salsas – Guisos – Locro – Puchero – Rellenos – Dulces – Mermeladas – Tortas – Licuados	
Porotos secos	Leche de Soja	Bebidas – Cuajada o Queso – Dulces – Flanes – Budines – Papillas – Tortas – Postres – Salsas
	Residuo de leche de soja	Masitas – Panqueques – Croquetas – Budines – Tortillas
	Soja tostada Soja frita	
Harina de Soja	Pan – Pastelería – Alimentos infantiles y para diabéticos – Salsas – Pizzas – Rellenos – Polvos para helados – Bollos – Pastas alimenticias – Embutidos, sustituyendo la carne	

Tabla 2. Aplicaciones de la soja en la industria.

PLANTAS	Forrajes Aceite Abono verde Apicultura Pastizales Sustitutos del tabaco Jabones Lana artificial	Harinas Elaboración de cerveza Materiales adhesivos Laminación de tablas Emulsificadores Colas Pinturas al agua Materiales impermeables
FRUTOS	Velas Aceites impermeables Desinfectantes Aislantes eléctricos Esmaltes Combustibles Insecticidas Curtiembre de pieles Lecitina Barnices	Cosmética Dulces Chocolate y cacao Emulsificadores Estabilizadores de gasolina Alumbrado Encerados Pinturas Tintas Jabones



Composición de la proteína de soja

En la **Tabla 3** observamos los principales componentes de la proteína de soja:

Tabla 3. Componentes de la proteína de soja.

Componentes	
✓ Isoflavonas	<ul style="list-style-type: none"> • Genisteina • Daidzeina • Gliciteina
✓ Proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • 2S - α-Conglycinina • 7S - β-Conglycinina • 11S - Glycinina • 15S - Polímero de Glycinina
✓ Saponinas	
✓ Inhibidores de Tripsina	
✓ Ácido Fítico	

La **composición química** de la proteína de soja concentrada o aislada se encuentra afectada por la técnica de procesamiento, incluyendo el método de solubilización y la temperatura. Tanto el lavado con agua como el lavado con alcohol (etanol) que se utilizan para concentrar las proteínas remueve los azúcares y oligosacáridos presentes en la soja (Erdman y col., 2004). El lavado con agua, y en menor medida el lavado con alcohol, también remueve algunos de los péptidos de bajo peso molecular presentes en esta proteína. Además, como se observa en la **Tabla 4**, la mayoría de las isoflavonas son removidas en el procedimiento que utiliza alcohol (Erdman y col., 2004). También son removidos otros fitoquímicos liposolubles como las saponinas. Investigaciones recientes indican que el lavado con alcohol puede alterar sustancialmente la estructura y la matriz proteica. Por ejemplo, Gianazza y col. (2003) mediante electroforesis bidimensional demostraron la degradación de la globulina 7S de la proteína de soja en proteínas y péptidos de menor peso molecular, que presentan actividad a nivel de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

**Tabla 4. Contenido estimado de isoflavonas en algunos productos de proteína de soja.***

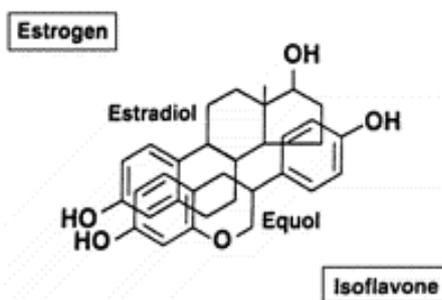
	Procedimiento		
	Proteína de Soja aislada	Proteína de Soja concentrada (agua)	Proteína de Soja concentrada (alcohol)
Isoflavonas	mg/100 gr porción comestible		
Daidzeina	33,59	43,04	6,83
Genisteina	59,62	55,59	5,33
Gliciteina	9,47	5,16	1,57
Isoflavona Total	97,43	102,7	12,47

* Modificada de Erdman y col. (2004).

La soja es la fuente más importante de *isoflavonas* o *fitoestrógenos isoflavónicos*. Su abundancia relativa en la proteína de soja depende del producto de soja específico y como mencionamos anteriormente de la técnica de procesamiento utilizada para obtenerlo (Erdman y col., 2004). Las isoflavonas se caracterizan por tener efectos hipocolesterolémicos, antioxidantes y antiateroscleróticos.

Las isoflavonas son similares en estructura química a los estrógenos. El anillo fenólico es un elemento estructural clave de la mayoría de los compuestos que se unen a receptores de estrógeno (Setchell y Cassidy, 1999). Como se observa en la **Figura 1**, cuando las estructuras del metabolito de isoflavona equol y estradiol se superponen presentan una estructura química similar, observándose que la distancia entre los grupos hidroxilos en los extremos de ambas moléculas es prácticamente idéntica. Sobre la base de esta similitud estructural no es de extrañar que las isoflavonas se unan a receptores estrógenicos y ejerzan una débil acción proestrogénica (agonistas) como antiestrogénica (antagonistas) (Setchell y Cassidy, 1999). El efecto estrogénico de las isoflavonas puede potenciar la reducción del riesgo de osteoporosis y de enfermedad cardiovascular, mientras que el efecto antiestrogénico ha sido ligado a la protección de ciertos tipos de cáncer. Varios autores (Lichtenstein, 1998; Anderson y col., 1999; Dewell y col., 2002) han sugerido que las isoflavonas pueden contribuir a reducir el colesterol sanguíneo debido a su similitud con los estrógenos endógenos. Además, las isoflavonas de la soja parecen tener efectos favorables sobre la función vascular pudiendo mejorar la respuesta vascular de los vasos sanguíneos en enfermos ateroscleróticos. También, al competir con los estrógenos, regulan el balance hormonal pudiendo prevenir algunas enfermedades como la osteoporosis o el desarrollo de diversos cánceres de origen estrogénico como el de mama, el de útero y, en el caso de los hombres, el de próstata.

Figura 1. Comparación de la estructura del metabolito de isoflavona con la del estradiol donde se observa una gran similitud en el arreglo planar espacial de las dos moléculas.*



* Setchell y Cassidy, 1999.

La soja es una importante fuente proteica, ya que contiene aproximadamente un 40% de proteínas conformadas por una mezcla compleja de diferentes tipos de proteínas. Los principales componentes de las proteínas de soja son las proteínas de almacenamiento conocidas como β -conglycinina (7S) y glycinina (11S), que representan del 65% al 80% de las proteínas totales. Nishi y col. (2001) y Wang y González, (2005) demostraron que estas proteínas tienen efectos sobre la saciedad, debido a que producen una disminución en la ingesta calórica y el vaciamiento gástrico. Se cree que estos péptidos actúan directamente sobre las células de mucosa intestinal, estimulando la liberación de colecistoquinina (CCK) endógena, un importante mediador fisiológico que regula la saciedad y el vaciamiento gástrico.

Además, estudios realizados por Lovati y col. (2000) en cultivo de hepatocitos han demostrado que ciertos péptidos de la soja (como las globulinas 7S) estimulan la expresión de receptores de LDL, sugiriendo que esta fracción proteica es capaz de reducir el colesterol plasmático. Esta ruta representa un mecanismo por el cual la soja puede ejercer sus efectos hipocolesterolémicos y antiateroscleróticos (Erdman, 2000; Adams y col., 2004).

La proteína soja contiene todos los *aminoácidos* esenciales en cantidad suficiente para abastecer los requerimientos humanos y es, por lo tanto, una proteína completa capaz de cubrir las necesidades proteicas de niños y adultos cuando se consume en las proporciones indicadas como la única fuente de proteína (Erdman, 2000; Torres y col., 2006).

Se ha visto que modificando las proporciones de aminoácidos de la dieta es posible alterar los niveles de colesterol plasmático. Existen ciertos aminoácidos dietarios que tienen acción sobre el metabolismo lipídico. Estudios realizados en animales mostraron que cuando se encuentran en la dieta en cantidades suficientes, los aminoácidos como lisina y metionina tienen un efecto



hipercolesterolémico, mientras que los aminoácidos como arginina y glicina ejercen una acción hipocolesterolémica (Morita y col., 1997; Kurowska y Carroll, 1994; Hirche y col., 2006).

Una relación elevada lisina/arginina o metionina/glicina en la proteína dietaria también está asociada a niveles de colesterol plasmático altos. Como se muestra en la **Tabla 5**, la proteína de soja presenta mayores concentraciones de arginina y glicina, con lo cual estas relaciones son aproximadamente 2,5 y 5 veces menores respecto de la caseína, lo que podría constituir un factor modulador importante en el metabolismo lipídico.

Tabla 5. Composición aminoacídica de caseína y proteína de soja.*

AMINOÁCIDO	CASEÍNA	PROTEÍNA DE SOJA
Leu	82,7	64,7
Val	57,0	38,2
Met	25,9	10,9
Cys	3,3	10,5
Phe	44,7	43,0
Tyr	47,9	30,9
Lys	69,9	51,1
Thr	37,2	31,6
His	26,5	21,5
Arg	32,2	62,2
Ser	50,3	43,2
Pro	93,2	44,0
Gly	16,5	33,7
Glu	90,0	157,0
Asp	61,8	93,9
Lis/Arg	2,2	0,8
Met/Gly	1,6	0,3

Los valores se expresan en gr/kg. En color **rojo** se resaltan los aminoácidos con acción **hipercolesterolémica**, y en **verde** aquellos con acción **hipocolesterolémica**.

* Modificada de Morita y col. (1997).

Las *saponinas* están presentes en la mayoría de los productos a base de proteína de soja, excepto en aquellos que hayan sido extraídos con alcohol. Estos compuestos pueden contribuir a reducir el colesterol por aumento de la excreción biliar (Erdman, 2000).



Los *inhibidores de proteasas* están ampliamente distribuidos en los alimentos y se encuentran presentes con baja actividad en aquellos productos de soja tratados con calor. Estos compuestos podrían ejercer un efecto hipocolesterolémico al estimular la síntesis y la secreción de ácidos biliares, ayudando así a eliminar el colesterol a través del tracto gastrointestinal (Erdman, 2000).

El *ácido fítico* esta presente en los productos de soja no fermentados, es estable al tratamiento térmico y podría contribuir a reducir los niveles de colesterol plasmático al disminuir la absorción de colesterol en el tracto gastrointestinal (Erdman, 2000). Además, se considera un antioxidante natural y se sugiere que tienen funciones de reducción de la peroxidación lipídica (Zhou y Erdman, 1995).

Los aspectos beneficiosos de los componentes de la soja mencionados anteriormente contribuyen a acrecentar el interés de las investigaciones sobre la administración de proteína de soja dietaria o la sustitución parcial de la proteína animal (caseína) por proteína de soja a nivel experimental y humano. Así por ejemplo, Anderson y col. (1995) en un metanálisis de 38 estudios clínicos concluyeron que la sustitución de proteína animal por proteína de soja disminuye significativamente las concentraciones de colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos plasmáticos tanto en sujetos hipercolesterolémicos como en sujetos normales.

En individuos obesos, tanto normolipemicos como dislipemicos, la administración de proteína de soja dietaria es capaz de reducir el peso corporal y la acumulación de grasa, disminuyendo los lípidos plasmáticos (Velasquez y Bhatena, 2007). Bosello y col. (1988) demostraron también en individuos obesos la reducción del peso corporal y los niveles plasmáticos de colesterol total, VLDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos, sugiriendo que la proteína de soja puede tener un efecto beneficioso en pacientes obesos.

En animales de experimentación, Tovar y col. (2005) demostraron en ratas Zucker obesas *fa/fa* que el consumo de proteína de soja redujo el incremento de colesterol y triglicéridos hepáticos, impidiendo el desarrollo de esteatosis hepática. Davis y col. (2005) demostraron que la proteína de soja mejora la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratas Zucker obesas diabéticas ZDFxSHHF (*fa/fa*). Además diferentes estudios nutricionales en animales obesos indican que el consumo de proteína de soja reduce el peso corporal, mejorando la resistencia insulínica (Velasquez y Bhatena, 2007; Iritani y col., 1996; Aoyama y col., 2000).



En este contexto, Pfeuffer y Barth (1992) demostraron un decrecimiento de las concentraciones plasmáticas de colesterol y de la velocidad de secreción de VLDL colesterol y triglicéridos cuando la proteína de soja sustituyó a la caseína como fuente proteica en ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa durante 7 semanas. Lavigne y col. (2000) observaron en ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con una dieta rica en sacarosa (55% de calorías) donde la proteína de soja sustituyó a la caseína como fuente proteica, un descenso de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina en ayuno junto con un mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica, comparada con ratas en las cuales la caseína fue la fuente proteica dietaria. Hurley y col. (1998) observaron una disminución en las concentraciones plasmáticas de glucosa, junto con una disminución en el peso corporal y la ingesta calórica en ratas Sprague Dawley alimentadas durante 4 semanas con una dieta rica en sacarosa donde la proteína de soja fue la fuente proteica dietaria. Estos estudios indicarían que el tipo de proteína (soja) podría mejorar las consecuencias metabólicas inducidas por el consumo de dietas ricas en sacarosa o fructosa.

Al presente no conocemos trabajos que analicen los posibles efectos beneficiosos de la proteína de soja dietaria en mejorar o revertir la dislipemia e insensibilidad insulínica estable inducida en ratas por la administración crónica (4-8 meses) de una dieta rica en sacarosa, por lo que consideramos interesante analizar particularmente los efectos de este macronutriente sobre aspectos del metabolismo lipídico e hidrocarbonado y su relación con la resistencia insulínica a nivel de tejido hepático y músculo esquelético.

A continuación se detallan:

- ✓ generalidades del metabolismo de la fructosa.
- ✓ alteraciones bioquímicas y metabólicas a nivel hepático y muscular inducido por la ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa.



A) GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE LA FRUCTOSA

La D-fructosa está presente en los alimentos ya sea como azúcar simple (monosacárido) o formando parte del disacárido sacarosa, compuesto que posee una molécula de glucosa y una de fructosa. Los procesos digestivos y absorbivos de los dos monosacáridos son diferentes.

En la mucosa intestinal se produce la hidrólisis de los disacáridos mediante la acción de disacaridasas. La sacarosa es clivada por la enzima sacarasa, produciendo glucosa y fructosa. La absorción de la glucosa a través de la membrana de las vellosidades de la mucosa intestinal se produce principalmente por cotransporte asociado al Na^+ , utilizando como transportador al SGLT1 (proteína co-transportadora de D-glucosa dependiente de sodio), mientras que la absorción de la fructosa se produce por difusión facilitada sin gasto energético utilizando como transportador el transportador de glucosa Glut-5.

Después de su absorción, los monosacáridos son transportados hacia el hígado por la circulación portal. La metabolización hepática de la glucosa y de la fructosa difiere sustancialmente como puede observarse en la **Figura 2**.

El metabolismo hepático de la glucosa comienza con la fosforilación de la **glucosa** para formar **glucosa-6-fosfato**, mediante una reacción catalizada por la enzima **hexoquinasa**, la cual puede fosforilar a otras hexosas, está presente en todas las células y es inhibida por la glucosa-6-fosfato que es el producto de la reacción que cataliza. En el **hígado** se encuentra una isoenzima especializada de la hexoquinasa: la **glucoquinasa**, la cual no se inhibe por la glucosa-6-fosfato, esta isoenzima de la hexoquinasa sólo es activa a altas concentraciones de glucosa (tiene una afinidad 50 veces menor que la hexoquinasa). Luego, la **glucosa-6-fosfato** es transformada a **fructosa-6-fosfato** por la enzima **fosfoglucoisomerasa**. En la siguiente etapa la **fructosa-6-fosfato** sufre una fosforilación y se transforma en **fructosa-1,6-bifosfato**, la enzima que cataliza esta reacción irreversible es la **fosfofructoquinasa I**. La cuarta reacción es reversible, y consiste en la ruptura de la molécula de fructosa-1,6-bifosfato para dar lugar a **dihidroxiacetona fosfato** y a **gliceraldehido-3-fosfato** catalizada por la **aldolasa A**.

El metabolismo hepático de la fructosa comienza con la fosforilación de la **fructosa** para formar **fructosa-1-fosfato**, reacción catalizada por la enzima **fructoquinasa**, enzima específica para la fructosa. Luego, la **fructosa-1-fosfato** es escindida por la **aldolasa B** en **dihidroxiacetona fosfato** y **gliceraldehido**. Además, aunque en menor proporción, la **fructosa** puede ser fosforilada por la **hexoquinasa** para convertirse en **fructosa-6-fosfato** y seguir la vía de la glicólisis.



Las dos triosas formadas pueden seguir las siguientes vías:

a) Dihidroxiacetona fosfato puede:

1) Ser isomerizada a gliceraldehido-3-fosfato y continuar hacia la vía glucolítica dando piruvato, el cual se convierte en lactato (en condiciones anaeróbicas) o entra en el ciclo del ácido cítrico como acetil-CoA (bajo condiciones aeróbicas). El acetil-CoA puede a su vez producir energía vía cadena respiratoria o ser utilizado como sustrato en la síntesis “de novo” de ácidos grasos.

2) Reducirse a glicerol-3-fosfato y proveer el esqueleto glicerol para la síntesis de triglicéridos, fosfolípidos y otros lípidos. Un elevado flujo de fructosa promueve la síntesis de triglicéridos y la producción de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad). Además, se ha demostrado que aumenta la expresión de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP), lo cual favorece el ensamblaje y posterior secreción de VLDL (Basciano y col., 2005).

b) Gliceraldehido puede:

1) fosforilarse por acción de la triosaquinasa, formando gliceraldehido-3-fosfato y puede continuar hacia la glucólisis, ser utilizado para la gluconeogénesis o almacenarse como glucógeno.

2) reducirse a glicerol por acción de una alcohol dehidrogenasa. El glicerol a su vez puede fosforilarse a glicerol-3-fosfato.

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo hepático de la fructosa difiere del metabolismo de la glucosa, ya que este último es plenamente regulado por la fosfofructoquinasa I (PFK I), un paso clave en la regulación de la glucólisis. Por el contrario, la fructosa entra en la vía glucolítica a nivel de las triosas, por debajo de la PFK I. Así, mientras que el metabolismo de la glucosa es regulado por la fosfofructoquinasa, la fructosa puede entrar continuamente en la vía glucolítica sin esta regulación (Koo y col., 2008; Basciano y col., 2005).



B) HÍGADO: ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS INDUCIDO POR LA INGESTA CRÓNICA DE UNA DIETA RICA EN SACAROSA

Una dieta rica en sacarosa (DRS) induce en ratas, debido al contenido de fructosa, una secuencia de eventos que conducen a resistencia insulínica, anormal homeostasis de la glucosa y dislipemia (incremento de triglicéridos y AGNE plasmáticos). Los mecanismos involucrados en estos eventos dependen en gran medida de la fructosa, ya que un alto flujo de fructosa en el hígado, principal órgano capaz de metabolizar este carbohidrato simple, perturba el metabolismo hepático normal de la glucosa e incrementa la lipogénesis de novo.

Al respecto, Hein y col. (2010) observaron que la ingesta prolongada de una dieta rica en sacarosa induce una mayor actividad de las enzimas lipogénicas involucradas en la biosíntesis “de novo” de ácidos grasos: acetil-CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PDH). Esto se acompañó de un decrecimiento de la actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), clave en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, sin modificaciones en la actividad de la oxidasa de ácidos grasos (FAO) peroxisomal, favoreciendo de esta manera el estado lipogénico presente en este órgano.

Se han identificado diferentes factores de transcripción que juegan un rol importante en la regulación del metabolismo de los lípidos y la glucosa, entre ellos: la **proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP)** (Xu y col., 1999), el **receptor activador de la proliferación peroxisomal (PPAR)** (Schoonjans y col., 1996), el **receptor X hepático (LXR)** (Zelcer y Tontonoz, 2006), el **receptor del ácido retinoico (RXR)** (Dubuquoy y col., 2002) y la **proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP)** (Kabashima y col., 2003).

Los SREBPs son sintetizados en el retículo endoplasmático en forma de una proteína precursora de 125 kDa (**Figura 3**). Ellos son escoltados por la proteína de activación del clivaje de SREBP (SCAP) desde el retículo endoplasmático al aparato de golgi, donde su región NH₂-terminal es clivada por dos proteasas de membranas denominadas “proteasas del sitio 1 y sitio 2” (S1P y S2P - respectivamente), las cuales se encargan de la proteólisis originando una proteína madura de 68 kDa que puede dirigirse hacia el núcleo para dimerizarse e interactuar con las regiones SREs del ADN, para luego comenzar a ser transcripcionalmente activo (Horton y col., 2002).

Existen diferentes isoformas de SREBP: el SREBP-1 (1a y 1c) regulan principalmente enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, mientras que el SREBP-2 se une a promotores de genes involucrados en la captación y biosíntesis del colesterol.

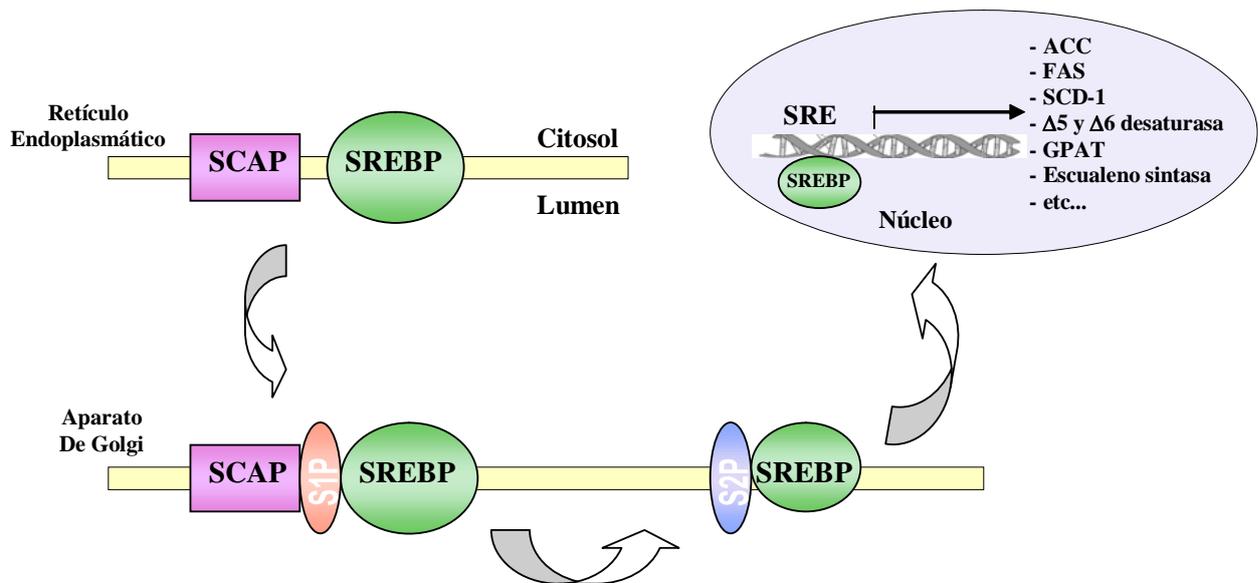


Figura 3. Mecanismo de transcripción del SREBP.*

SCAP: proteína de activación de clivaje del SREBP, SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides, S1P: insig 1, S2P: insig 2, SRE: elemento de respuesta a esteroides, ACC: acetil CoA carboxilasa, FAS: sintasa de ácidos grasos, SCD-1: esteroil-CoA desaturasa 1, GPAT: glicerolfosfato acil-transferasa.

* Modificada de Horton y col. (2002).

Nagai y col. (2002) demostraron en ratas Sprague Dawley que la administración de una dieta rica en fructosa durante 8 semanas, induce la expresión del SREBP-1 en hígado, incrementando la expresión génica de las enzimas claves de la lipogénesis hepática (ACC, FAS, etc). En el mismo sentido, Shimizu y col. (2003) utilizando el mismo modelo experimental demostraron un incremento en el contenido de ARNm del SREBP-1 en hígado. Además, estos autores observaron que una proteína denominada proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) se encuentra incrementada en estos animales, sugiriendo que el mecanismo molecular de la activación de la expresión génica del SREBP-1 en animales alimentados con dietas ricas en fructosa se produce por la activación de PTP1B, la cual incrementa la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). PP2A es capaz de incrementar la capacidad transcripcional de S1P, principal sitio localizado en la región promotora del SREBP-1 y de esta manera activar la expresión génica del SREBP-1 favoreciendo un incremento de la expresión génica de las enzimas lipogénicas.

Los PPARs son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares (**Figura 4**). Luego de su unión a ligandos, se unen específicamente a un elemento de respuesta del ADN denominado elemento de respuesta proliferador peroxisomal (PPRE), en forma de heterodímeros con el receptor del ácido retinoico (RXR), activándose y favoreciendo la transcripción de genes de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos. Han sido descritas tres isoformas de PPAR: PPAR- α , PPAR- β y PPAR- γ (Ferre, 2004).

El isotipo PPAR- α se expresa en gran medida en el hígado y regula genes implicados en la oxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal de ácidos grasos (Desvergne y Wahli, 1999; Desvergne y col., 2006). El PPAR- β se expresa principalmente en epitelios, intestino, músculo y preadipocito y regula la oxidación de ácidos grasos en músculo (Brenner, 2006). El PPAR- γ se expresa principalmente en el tejido adiposo y regula la adipogénesis y las reservas de grasas y glucosa (Berger y col., 1999).

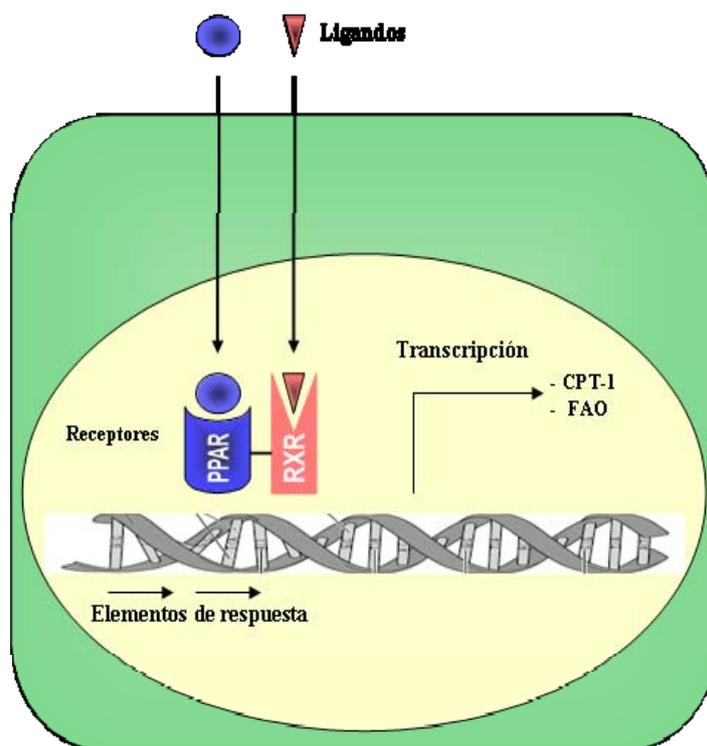


Figura 4. Mecanismo de transcripción del PPAR.*

PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal, RXR: receptor del ácido retinoico, CPT-1: carnitina palmitoil transferasa 1, FAO: oxidasa de ácidos grasos.

* Modificada de Venkatachalam y col. (2009).



Hein y col. (2010) demostraron recientemente una disminución significativa de la masa proteica del PPAR- α en hígado de animales alimentados crónicamente (6 – 8 meses) con DRS, con una menor actividad enzimática CPT-1 sin cambios en la actividad FAO. Las enzimas CPT-1 y FAO son enzimas blanco del PPAR- α y poseen elementos identificados de regulación de este receptor (Desvergne y Wahli, 1999). En el mismo sentido, Nagai y col. (2002) demostraron en hepatocitos de ratas cultivados en condiciones de altas concentraciones de fructosa (20 mM), que la expresión génica del PPAR- α fue downregulada, indicando un efecto directo de la fructosa o sus metabolitos sobre la expresión del PPAR- α , lo que contribuiría a una disminución de la oxidación lipídica. Por otro lado, en los animales alimentados con DRS se constató un aumento de la lipólisis basal (Selenscig y col., 2010). La mayor disponibilidad de AGNE provenientes del tejido adiposo y los sintetizados “de novo” a nivel hepático (incremento de las enzimas claves de la lipogénesis de novo) en presencia de una menor oxidación, favorecerían su esterificación a triglicéridos incrementando el pool de triglicéridos hepáticos y la secreción de VLDL-Tg.

Los receptores nucleares, LXRs, constituyen una superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligandos que ejercen importantes acciones en la homeostasis lipídica. Los dos isotipos que más han sido caracterizados son el LXR- α , que se expresa mayoritariamente en el hígado pero también en menor medida en otros tejidos tales como riñón, intestino y tejido adiposo, y el LXR- β que se expresa en forma ubicua (Repa y col., 2000).

El mecanismo de acción de estos receptores nucleares heterodiméricos se basa en que después de ser activados por sus ligandos naturales específicos forman heterodímeros con el receptor del ácido retinoico (RXR) para poder unirse a los elementos de respuesta ubicados en la zona promotora del ADN (LXRE) (Peet y col., 1998). Los LXRs, al unirse a sus ligandos naturales (oxiesteroles), afectan a una variedad de genes de enzimas claves involucradas en el metabolismo de lípidos y ácidos biliares, incluyendo la lipoproteína lipasa (LPL), ACC, FAS, esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1) así como también los factores de transcripción SREBP-1 y PPAR- α (Repa y col., 2000; Lu y col., 2001).

Hein y col. (2010) demostraron recientemente un incremento en la expresión de la masa proteica del LXR- α en animales alimentados crónicamente con DRS. El incremento en la expresión del LXR- α y la disminución de la expresión del PPAR- α inducidas por una ingesta crónica con DRS podría ser atribuido a la competición entre ambos receptores nucleares por su

heterodimerización con RXR. Además, ellos pueden formar heterodímeros LXR- α -PPAR- α , los cuales pueden unirse a secuencias específicas de genes de enzimas y regularlos (Miyada y col., 1996; Yoshikawa y col., 2003; Brenner y col., 2003). Joseph y col. (2002) demostraron que la activación *in vivo* del LXR- α indujo la expresión del gen de la FAS, directa o indirectamente, a través de la vía SREBP-1c.

La **Figura 5** muestra los posibles mecanismos por los cual el PPAR- α suprime la actividad del SREBP-1c a través de la interacción con el LXR-RXR.

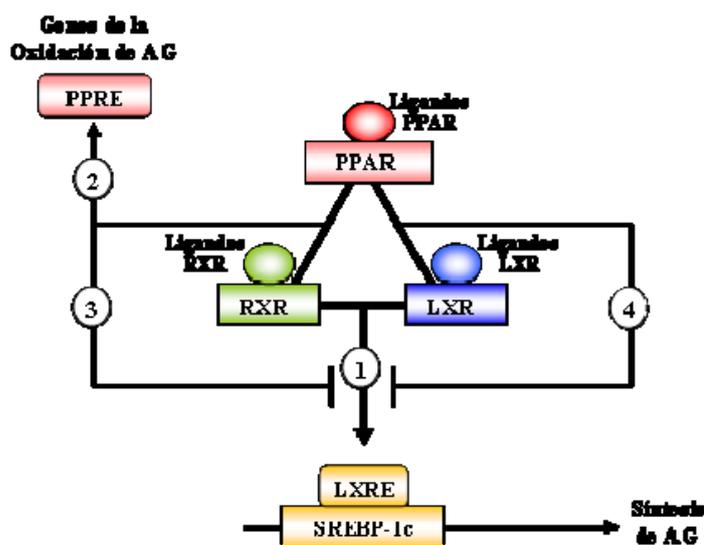


Figura 5. Mecanismo donde el PPAR suprime la actividad del SREBP-1c por interacción con LXR-RXR.*

PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal, RXR: receptor del ácido retinoico, LXR: receptor X hepático, SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides, LXRE: elementos de respuesta ubicados en la zona promotora del ADN, PPPE: elemento de respuesta de la proliferación peroxisomal, AG: ácidos grasos.

* Yoshikawa y col. (2003).

Yoshikawa y col. (2003), han propuestos diferentes mecanismos de interacción entre PPAR, LXR, RXR y SREBP-1c; entre ellos se encuentran: **1:** LXR/RXR se une y activa al LXRE en la región promotora SREBP-1c. **2:** PPAR/RXR activa la expresión de genes para la oxidación de lípidos a través del PPPEs. **3 y 4:** Establecen la presencia de interferencias en la señalización de LXR/RXR por PPAR/RXR y PPAR/LXR. El PPAR forma heterodímeros tanto con el LXR así como también con RXR. Ellos han demostrado que el PPAR- α reduce la unión del heterodímero LXR/RXR a los elementos de respuesta ubicados en la zona promotora del ADN (LXRE). Esto sugiere que la activación del PPAR- α , podría inhibir la vía LXR- α /SREBP-1c a través de la reducción en la formación del complejo LXR- α /RXR, poniendo en evidencia una interacción clave entre el LXR- α y PPAR- α en la homeostasis lipídica.

El ChREBP es un factor de transcripción que se expresa en hígado, riñón, cerebelo e intestino. Está presente en el citosol y cuando es estimulado por carbohidratos, penetra en el núcleo donde se une al elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE) presente en las regiones promotoras de sus genes diana: piruvatoquinasa (PK) enzima clave de la glucólisis, acetil-CoA carboxilasa (ACC) y sintasa de ácidos grasos (FAS) (**Figura 6**). Koo y col. (2008) observaron en ratas alimentadas durante 2 semanas con dieta rica en fructosa un incremento de la expresión ARNm de las enzimas PK, FAS y ACC. Además, el ARNm de ChREBP fue significativamente inducido por la fructosa. Investigaciones de Nishimura y col. (1994) y Nishimura y Uyeda, (1995) han demostrado que la actividad de ChREBP está regulada por xilulosa-5-fosfato, un metabolito de la vía de las pentosas fosfato. Cuando la vía de las pentosas fosfato es activa, la xilulosa-5-fosfato aumenta y activa una proteína fosfatasa 2A (PP2A) que a su vez desfosforila y activa el ChREBP (Kabashima y col., 2003).

En la siguiente figura (**Figura 6**) observamos los mecanismos propuestos de acción del ChREBP:

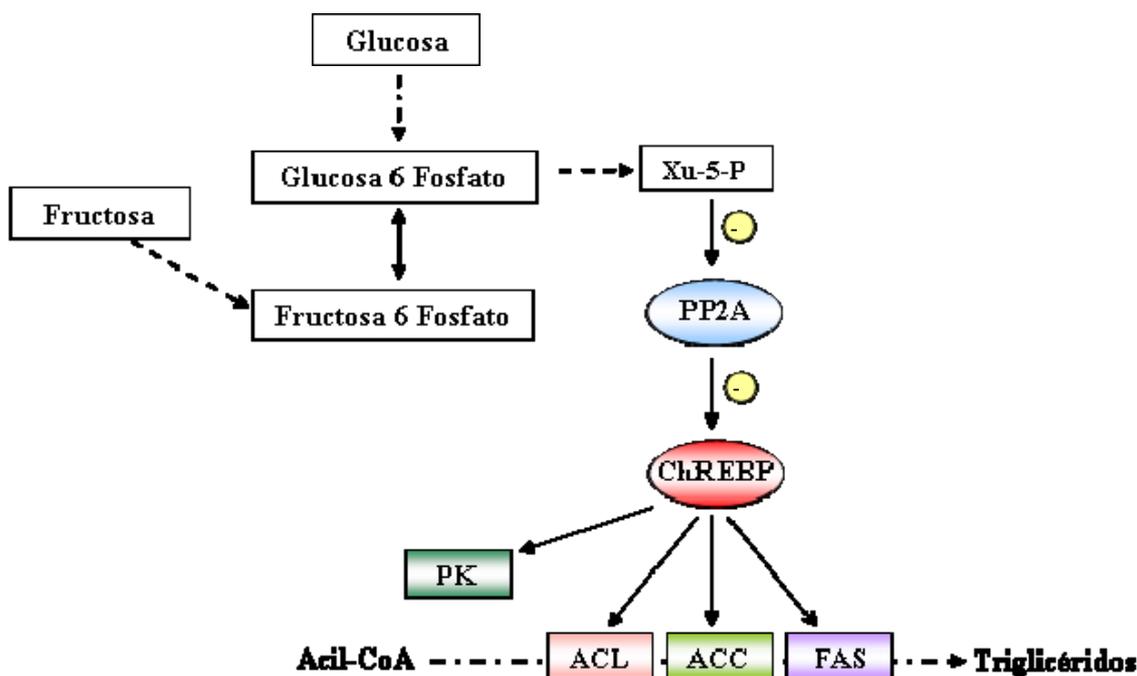


Figura 6. Mecanismo de acción del ChREBP.*

El esquema ilustra la formación de Xu-5-P (xilulosa-5-fosfato) que activa a la PP2A (proteína fosfatasa 2A). La PP2A activa a ChREBP, el cual favorece la transcripción de genes de enzimas lipogénicas, incluyendo ATP-citrato liasa (ACL), acetil-CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS) y piruvatoquinasa (PK).

* Modificada de Kabashima y col. (2003).

En la **Figura 7**, se esquematizan los principales efectos de la administración crónica de DRS sobre aspectos del metabolismo lipídico en el tejido hepático:

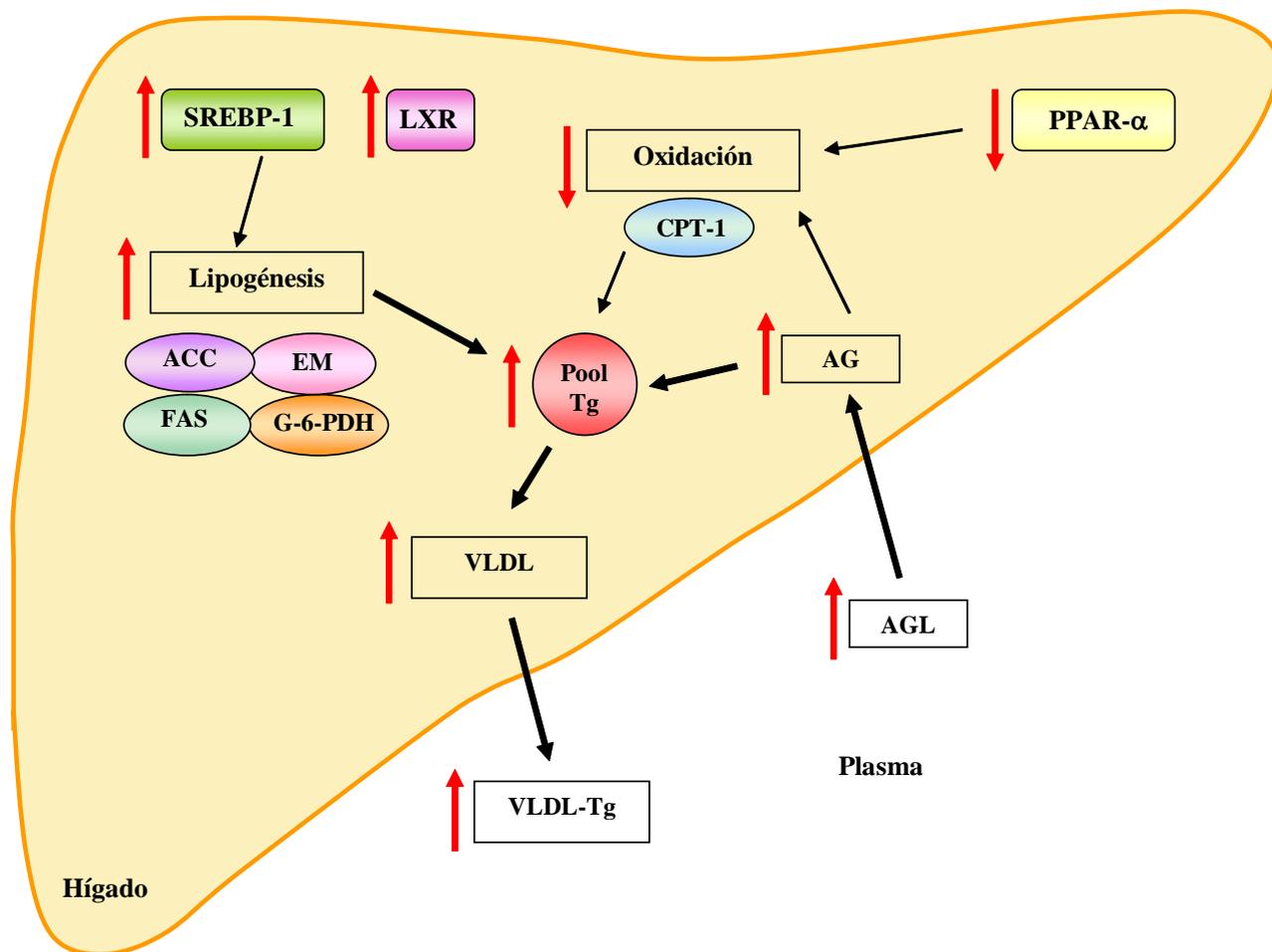


Figura 7. Modificación del metabolismo lipídico hepático inducido por la ingesta crónica de DRS.*

A nivel hepático la mayor disponibilidad de ácidos grasos libres plasmáticos producto de una alterada lipólisis y su menor oxidación hepática (menor actividad CPT-1 y masa proteica del PPAR- α) favorecen su reesterificación a triglicéridos. El incremento de la actividad de las enzimas de la síntesis de novo de ácidos grasos inducidas por un incremento de la expresión génica del SREBP-1 y LXR- α , conduce a una mayor lipogénesis. Ambas vías metabólicas conllevan a un incremento del pool de triglicéridos hepáticos y una mayor síntesis y secreción de VLDL-Tg.

CPT-1: carnitina palmitoil transferasa-1, PPAR- α : receptor activador de la proliferación peroxisomal- α , SREBP-1: proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1, LXR- α : receptor X hepático- α , VLDL-Tg: lipoproteínas de muy baja densidad - triglicéridos.

* Modificada de Lombardo y Chicco, (2006).



C) MÚSCULO ESQUELÉTICO: CAMBIOS METABÓLICOS INDUCIDOS POR INGESTA CRÓNICA DE UNA DIETA RICA EN SACAROSA A NIVEL DEL METABOLISMO LIPÍDICO E HIDROCARBONADO

El músculo esquelético es uno de los principales tejidos blancos en la acción insulínica y dada su abundante masa relativa en el organismo, su metabolismo juega un rol clave en la homeostasis de la glucosa. La regulación del metabolismo de la glucosa en este tejido envuelve una relación estrecha y compleja con otros combustibles energéticos, especialmente ácidos grasos. Una gran disponibilidad de lípidos tisulares deteriora la acción insulínica en los tejidos periféricos (tejido adiposo, corazón) incluyendo el músculo esquelético (Lewis y col., 2002).

Diferentes estudios en animales de experimentación y en humanos correlacionan el grado de resistencia insulínica con el incremento de triglicéridos intramusculares (Kraegen y col., 1991; Stannard y Jhonson, 2003; D'Alessandro y col., 2006; Storlien y col., 1993; Pan y col., 1997). Se ha sugerido que una excesiva disponibilidad local o sistémica de lípidos (AGNE, Tg) podría constituir un factor clave en el desarrollo de resistencia insulínica en este tejido (Thorburn y col., 1989; Matsui y col., 1997). Más aún, estudios recientes han demostrado una fuerte correlación entre la acción insulínica y los niveles de acil-CoA de cadena larga en músculo esquelético (Ellis y col., 2000).

La administración crónica de una DRS induce en el músculo esquelético cambios bioquímicos-metabólicos muy importantes. En este contexto, D'Alessandro y col. (2006) demostraron un incremento significativo del contenido de triglicéridos y acil-CoA de cadena larga en músculo gastronemio de ratas alimentadas durante 6 meses con una DRS. Esto se acompañó de una disminución de la acción insulínica para metabolizar la glucosa (vías no oxidativa y oxidativa). El incremento del contenido de Tg y acil-CoA ocurre en presencia de una significativa reducción de la actividad del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc) y un incremento de la actividad PDH-quinasa. La disminuida actividad del complejo PDH limita la conversión del piruvato proveniente de la glucólisis a acetil-CoA alterando el metabolismo oxidativo de la glucosa (Randle, 1988). Esto fue observado en estado basal y bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulinémica) sugiriendo que una mayor disponibilidad y oxidación de ácidos grasos por competición de sustratos como fuente energética podría ser uno de los mecanismos que alteran la oxidación de la glucosa. Similarmente, Vrāna y col. (1978) observaron una disminuida utilización de la glucosa con incremento de la oxidación de palmitato en hemidiafragma aislado de ratas dislipémicas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Estos mismos autores también constataron un incremento de triglicéridos y un menor transporte y oxidación de la glucosa en



músculo de ratas dislipémicas con resistencia insulínica alimentadas con una dieta rica en fructosa por periodos de tiempo similares (Vrāna y col., 1993). Storlien y col. (1993) demostraron en músculo esquelético de ratas un deterioro de la acción de la insulina en situaciones de incrementada disponibilidad de triglicéridos. Esto fue observado tanto en ratas alimentadas durante 3 semanas con dietas ricas en grasa donde el contenido de triglicéridos del músculo incrementó o en animales hipertriglicéridémicos alimentados con dietas ricas en fructosa o sacarosa por periodos similares de tiempo.

Hemos mencionado anteriormente (descripción del modelo de dieta rica en sacarosa) que los animales alimentados crónicamente con DRS presentan una marcada resistencia insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica). En estos animales el contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato del músculo esquelético en condiciones basales fue similar al observado en animales controles de igual sexo y edad. Sin embargo, una alterada vía no oxidativa de la glucosa se constató bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulinémica). Bajo estas condiciones experimentales la insulina fue incapaz de estimular la actividad de la enzima glucógeno sintasa y de incrementar los niveles de glucógeno y glucosa-6-fosfato (D'Alessandro y col., 2006). Pagliassotti y col. (1996) observaron en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa durante 1, 2, 5 y 8 semanas una disminución de la síntesis de glucógeno muscular y del contenido de glucógeno bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulinémica) luego de 2, 5 y 8 semanas de ingesta. Thorburn y col. (1989) observaron en ratas alimentadas durante 4 semanas con dieta rica en fructosa una severa reducción de la sensibilidad insulínica en hígado y numerosos músculos esqueléticos (soleus, gastronemio rojo y blanco, cuádriceps, etc.) bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulinémica).

Otros mecanismos podrían también contribuir a la resistencia insulínica muscular en situaciones de una mayor disponibilidad de lípidos tisulares o plasmáticos. Se postula que el incremento citosólico de acil-CoA de cadena larga interfiere con las señales de la insulina posiblemente vía su conversión en diacilglicerol (DAG) (Yu y col., 2002). Se ha demostrado que el DAG, un intermediario del metabolismo de fosfolípidos y triglicéridos, se encuentra aumentado en modelos experimentales de resistencia insulínica y en humanos (Corcoran y col., 2007). El DAG actúa como un importante segundo mensajero implicado en la señalización intracelular y, debido a su papel en la activación de las proteínas quinasa C (PKC), puede jugar un rol muy preponderante en la resistencia insulínica inducida por lípidos (Itani y col., 2002).



Varios estudios han mostrado una correlación positiva entre el contenido de triglicéridos intramusculares y la actividad de nPKC, particularmente PKC θ y PKC ϵ . La familia PKC esta compuesta por más de 10 isoformas y agrupadas en 3 grupos: PKC atípicas (aPKC), PKC clásicas (cPKC) y PKC nuevas (nPKC). Dentro de las *PKC atípicas* se encuentran las PKC ζ , ι y λ . Dentro de las *PKC clásicas* se encuentran las PKC α , β y γ . Por último, dentro de las *PKC nuevas* se encuentran las PKC θ , ϵ , δ , μ y η . PKC θ es muy abundante en músculo esquelético (Corcoran y col., 2007).

Los ácidos grasos de cadena larga esterificándose a DAG estimulan la actividad PKC θ y ϵ en músculo esquelético. Las actividades PKC θ y ϵ podrían alterar las señales de insulina vía fosforilación de los residuos de serina o treonina del receptor de insulina (IR), del sustrato receptor de insulina 1 (IRS-1) y potencialmente de otras proteínas tales como la glucógeno sintasa (Corcoran y col., 2007).

Al respecto, D'Alessandro y col. (2006) demostraron un incremento del contenido de DAG y de la expresión de la masa proteica de la isoenzima nPKC θ en la fracción de membrana sin cambios en la fracción citosólica en el músculo esquelético de animales alimentados crónicamente (6 meses) con DRS. Esto sugiere que el incremento de la concentración de DAG estimularía la translocación de la isoenzima nPKC θ a la fracción de membrana y esto podría estar relacionado con el decrecimiento de la sensibilidad insulínica. Donnelly y col. (1994) también observaron en el músculo esquelético de ratas Sprague Dawley dislipemias insulino resistentes alimentadas con dieta rica en fructosa por un período corto de tiempo (2 semanas), un aumento significativo de la masa proteica de la nPKC θ en la fracción de la membrana y del DAG. Además, Schmitz-Peiffer y col. (1997) demostraron un incremento del contenido de DAG y de la expresión y localización de nPKC θ y ϵ de membrana asociado con la resistencia insulínica del músculo esquelético en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa.

Más aún, Yu y col. (2002) observaron que los ácidos grasos alteran específicamente las señales de insulina IRS-1/PI3K. Estas alteraciones podrían ocurrir a través de los acil-CoA de cadena larga y/o esterificación de los ácidos grasos a triglicéridos, los cuales son una fuente de acil-CoA de cadena larga. Estos últimos esterificándose a DAG, estimularían la actividad de las PKCs.

El *receptor de insulina* (IR) es un receptor tirosina-quinasa transmembrana, cuya configuración es tetramérica- $\alpha 2/\beta 2$. Luego de la unión de la insulina con su receptor se origina una autofosforilación inmediata que conduce a una cascada de fosforilaciones de varios sustratos intracelulares, incluyendo la familia de las proteínas *sustratos receptor de insulina* (IRS). Hay más



de 13 diferentes tipos de IRS. En músculo esquelético, el IRS-1 es el más abundante y mediante la fosforilación de sus residuos de tirosina, media su asociación con la subunidad reguladora de 85 kDa (p85) del fosfoinositol-3-quinasa (PI3K). PI3K está compuesta por una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa. La activación de PI3K por fosforilación de IRS-1 conduce a la activación de varias quinasas como Akt (o también conocida como proteína quinasa B) y proteína quinasa C (PKC), las cuales median muchas de las acciones metabólicas de la insulina (Abdul-Ghani y DeFronzo, 2010).

Bezerra y col. (2000) analizaron el nivel y la fosforilación del IR, IRS-1 y la asociación del IRS-1 con el PI3K y fosfotirosina fosfatasa (SHP2) en el hígado y músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta rica en fructosa durante 4 semanas. Estos autores demostraron una significativa reducción de la fosforilación del IRS-1 en hígado y músculo que conducía a una reducción en la asociación IRS-1/PI3K. Estos cambios podrían explicar algunos aspectos de la RI en este modelo experimental.

En la **Figura 8**, se esquematizan los principales efectos de la administración crónica de DRS (6-8 meses) en músculo gastronemio:

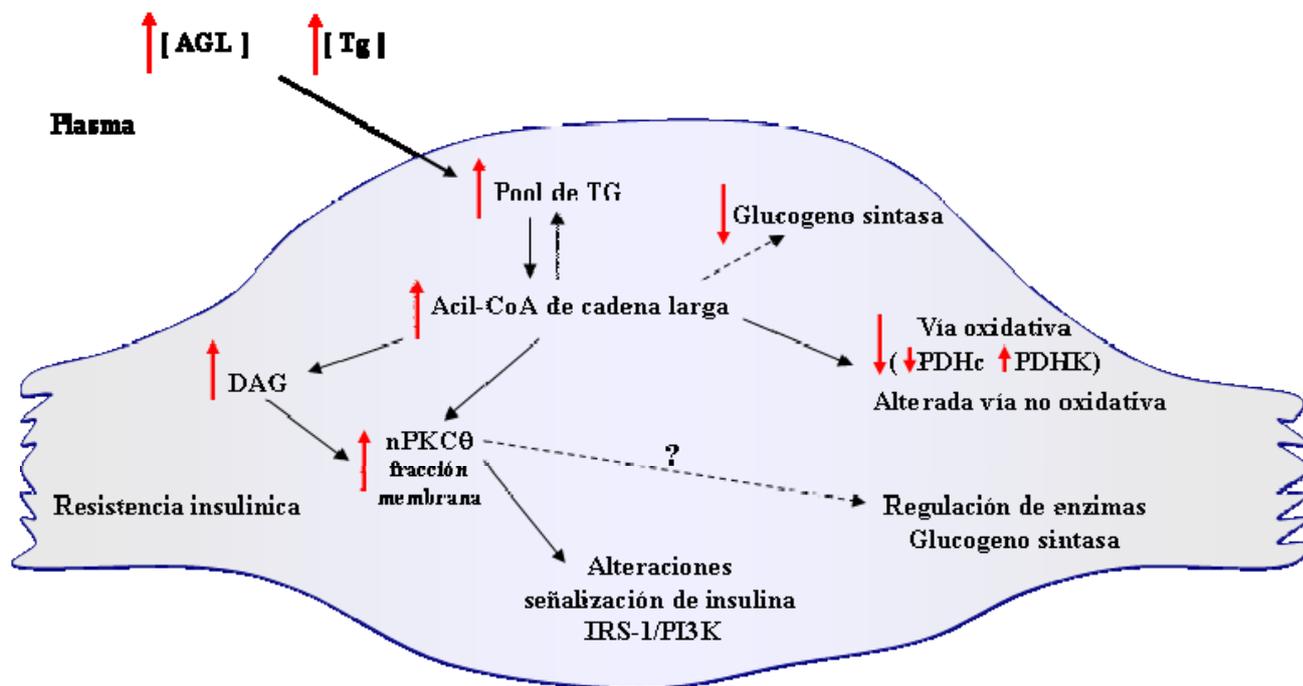


Figura 8. Efectos de la ingesta crónica de DRS sobre el músculo gastronemio.*

En músculo gastronemio, la mayor disponibilidad de AGL y Tg en plasma aumenta el contenido de triglicéridos y acil-CoA de cadena larga, lo cual va acompañado de una disminución en la actividad PDHc e incremento de la PDHK, disminuyendo la vía oxidativa y alterando la vía no oxidativa de la glucosa bajo la acción insulínica. Los acil-CoA de cadena larga por su esterificación a DAG estimulan el incremento en la expresión de la masa proteica de la isoenzima nPKCθ y la translocación a nivel de membrana plasmática, lo que podría interferir con la vía de señalización de la insulina por fosforilación de los residuos serina o treonina de los receptores de insulina y del IRS-1. La asociación IRS-1/PI3K también disminuye. El incremento de acil-CoA regula también la actividad de enzimas tales como hexoquinasa y glucógeno sintasa. Todos estos cambios podrían explicar algunos aspectos de la resistencia insulínica del músculo esquelético en este modelo experimental.

AGL: ácidos grasos libres, Tg: triglicéridos, PDHc: complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, DAG: diacilglicerol, nPKCθ: proteína quinasa θ nueva, IRS-1: sustrato receptor de insulina 1, PI3K: fosfoinositol 3 quinasa.

* Modificado de Lombardo y Chicco, (2006).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

De lo expuesto, el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue:

Utilizar el modelo “no genético” de dislipemia, resistencia insulínica y adiposidad visceral previamente descrito a fines de evaluar la posibilidad de mejorar y/o revertir estas alteraciones por manipulación dietaria: cambio de la fuente proteica de la dieta (origen animal: caseína por origen vegetal: soja).

Para poder concretar este objetivo general de tesis, se fijaron los siguientes **objetivos específicos**:

1) Determinar en forma secuencial si una vez alcanzada la dislipemia y resistencia insulínica estable (4 meses de ingesta crónica con una DRS) el cambio del tipo de proteína de la dieta puede mejorar o revertir la dislipemia y la moderada hiperglucemia. En particular se analizaron:

- Niveles de triglicéridos, colesterol, AGNE, glucosa e insulina plasmáticos. Contenido de triglicéridos hepáticos.

- Se determinó también el peso corporal y la ingesta calórica durante todo el período de experimentación.

2) Una vez determinado el tiempo más adecuado capaz de lograr las mayores modificaciones de los parámetros plasmáticos y hepáticos mencionados en el ítem 1, se analizaron al final dicho período los siguientes aspectos bioquímicos-metabólicos:

I) Mecanismos involucrados en el metabolismo lipídico: En tejido hepático se evaluó: **1)** contenido de triglicéridos y colesterol; **2)** in vivo, velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos y remoción plasmática de triglicéridos; **3)** enzimas claves involucradas en la lipogénesis: acetil CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-P DH). Expresión de la masa proteica del factor de transcripción proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1); **4)** enzimas claves involucradas en la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y peroxisomal oxidasa de ácidos grasos (FAO). Expresión de la masa proteica del receptor activador de la proliferación peroxisomal-alfa (PPAR- α).



II) En el músculo gastronemio se analizó en condiciones basales y al finalizar la clamp euglucémica-hiperinsulinémica: **1)** oxidación de la glucosa (estimada por la actividad del complejo enzimático piruvato dehidrogenasa (PDHc), contenido de triglicéridos; **2)** vía no oxidativa de la glucosa: contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato; **3)** actividad de la enzima hexoquinasa; **4)** expresión de la masa proteica del transportador de glucosa Glut-4.

Además se determinó el peso del tejido adiposo visceral (epidídimo y retroperitoneal) y composición de la carcasa.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DIETAS

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CONEA - Buenos Aires, Argentina), con un peso inicial de aproximadamente 180-200 g (adultos jóvenes). Durante todo el período experimental los animales se mantuvieron en bioterio estandarizado y bajo condiciones controladas de ciclo luz/oscuridad (7:00 – 19:00 horas), temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad. Desde su llegada al bioterio, los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston, Purina, St. Louis, MO, USA). Luego de una semana de aclimatación los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: **Control y Experimental**

El **grupo Experimental** recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (**DRS**): sacarosa 62,5% p/p, caseína libre de vitaminas 18% p/p, aceite de maíz 7% p/p. El **grupo Control (DC)** recibió la misma dieta semisintética cuya única diferencia fue la fuente de hidratos de carbono: almidón (62,5% p/p). Ambos grupos recibieron cada una de las dietas durante 4 meses, al cabo de este tiempo de alimentación los animales del grupo DRS se dividieron en dos subgrupos: **1) Subgrupo DRS**: continuó con la misma dieta rica en sacarosa y **2) Subgrupo DRS-S**: la caseína (18% p/p) fue reemplazada por proteína de soja aislada (18% p/p) hasta el final del período experimental. La proteína de soja aislada utilizada contiene aproximadamente 97 mg de isoflavonas totales cada 100 g de proteína comestible (según proveedor). Los animales del **grupo Control** continuaron con la misma alimentación hasta el final de la experiencia (8 meses) (**Figura 9**).

La **Tabla 6** muestra la composición de las dietas, las cuales fueron preparadas siguiendo las recomendaciones de la dieta AIN-93M del Instituto Americano de Nutrición (Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet) (Reeves y col., 1993) y se conservaron a 4°C . Las dietas son isocalóricas y proveen aproximadamente 16,3 kJ/g de comida y se administraron “ad limitum” durante todo el período experimental.

**Tabla 6. Composición de las dietas experimentales.** ¹

Componentes	Dietas					
	DC		DRS		DRS-S *	
	% en Peso	% en kJ	% en Peso	% en kJ	% en Peso	% en kJ
Almidón	62,5	65,8	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	62,5	65,8	62,5	65,8
Caseína	18	17,4	18	17,4	-	-
Proteína de soja aislada	-	-	-	-	18	17,4
Aceita de maíz	7	16,8	7	16,8	7	16,8
Vitaminas ²	1		1		1	
Fibras	7,5		7,5		7,5	
Sales ³	3,5		3,5		3,5	
Colina ⁴	0,2		0,2		0,2	
Metionina	0,3		0,3		0,3	

1. La composición de las dietas esta basada en las recomendaciones del Comité ad hoc del “American institute of Nutrition”. DC: Dieta control – caseína; DRS: Dieta rica en sacarosa – caseína; DRS-S: Dieta rica en sacarosa – proteína de soja.

2. Mezcla de vitaminas AIN-93M-VX (g/kg de mezcla): Vitamina A (500.000 UI/g) 0.8; Vitamina D₃ (400.000 UI/g) 0.275; Vitamina E (500 UI/g) 15.0; vitamina K 0.075; Biotina 0.020; Vitamina B₁₂ 2,5; Ácido Fólico 0.200; Niacina 3.0; Pantotenato de calcio 1.6; Piridoxina HCl 0.7; Riboflavina 0.6; Tiamina HCl 0.6.

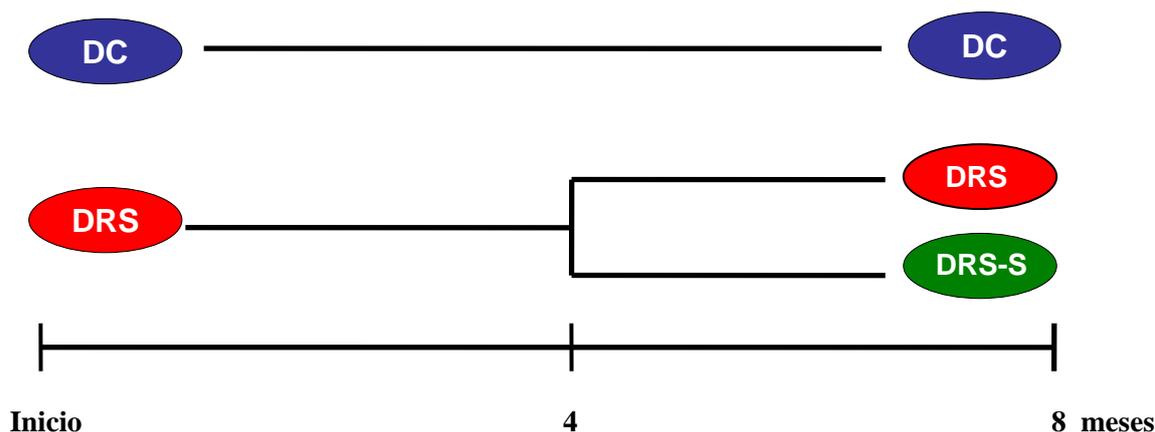
3. Mezcla de sales AIN-93M-MX (g/kg de sales): Carbonato de calcio 357.0; Fosfato monobásico de potasio 250; Cloruro de sodio 74; Sulfato de potasio 46.6; Citrato de potasio monohidratado 28.0; Oxido de magnesio 24.0; Citrato férrico 6.06; Carbonato de zinc 1.65; Carbonato de magnesio 0.63; Carbonato cuprico 0.30; Yodato de potasio 0.01; Selenato de sodio 0.01025; Molibdato de amonio 0.00795; Cromato de potasio 0.275.

4. Bitartrato

* La proteína de soja aislada usada en esta tesis (MP biochemicals, USA) contiene (g/100 g): proteína 92.0, humedad 6.0, cenizas 4.1, grasa 0.8, fibra 0.25, carbohidratos 2.85, calcio 0.15, fósforo 0.8, potasio 0.05, sodio 1.3, trypsin inhibidor 4.9 – 7.3 mg/g.

Durante el transcurso de la experiencia los animales se pesaron individualmente al menos dos veces por semana. Se determinaron la ingesta calórica y la ganancia de peso individuales de los animales pertenecientes a los diferentes lotes experimentales. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Figura 9. Diseño experimental.



Un número adecuado de animales de los tres grupos dietarios fueron sacrificados a los 4, 6, 7 y 8 meses de ingesta a los fines de evaluar el tiempo óptimo donde se produjeron los posibles cambios beneficiosos más significativos en relación a la dislipemia y la homeostasis de la glucosa en el lote en el cual la proteína de soja reemplazó a la caseína (DRS-S).

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS

Finalizado los distintos períodos experimentales, los animales fueron pesados y anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal) y las experiencias se llevaron a cabo entre las 8,00 y las 10,00 horas a excepción de ensayos específicos que se describirán posteriormente.

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava inferior e inmediatamente centrifugadas a 4°C. El suero obtenido se utilizó inmediatamente o se conservó a -20°C hasta su procesamiento. Los tejidos hepático, muscular y adiposos (epididimal y retroperitoneal) fueron extraídos, pesados e inmediatamente congelados utilizando una pinza de Wolleberger previamente enfriada en nieve carbónica y conservados a la temperatura de N₂ líquido hasta su procesamiento.



3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES - MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1. DETERMINACIONES SÉRICAS

a. Glucosa

La glucosa presente en el suero de ratas fue dosada por el método espectrofotométrico basado en el sistema enzimático glucosa oxidasa peroxidada de acuerdo a Bergmeyer, (1974). Los resultados se expresaron como mM.

b. Triglicéridos (Tg)

Los Tg se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando el kit enzimático comercial de Wiener SA (Santa Fe, Argentina) basado en un método enzimático colorimétrico. Los resultados se expresaron en mM.

c. Ácidos grasos no esterificados (AGNE)

Los AGNE se cuantificaron a través del método espectrofotométrico que emplea acil-CoA sintasa en presencia de ATP, catión Mg^{++} y coenzima A (CoA) para transformarlos, en una primera etapa, en acil-CoA. En una segunda etapa, este es oxidado por la acil-CoA oxidasa con producción de peróxido de hidrógeno. El mismo en presencia de peroxidasa permite la formación de un producto de condensación oxidativo con un máximo de absorción a 550 nm cuya intensidad de color resulta proporcional a la cantidad de ácidos grasos presentes en la muestra. Se utilizó para esta determinación el kit enzimático comercial WACO NEFA-C (Wako Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresaron como μM .

d. Colesterol total (C_T)

El C_T (suma del colesterol libre y esterificado) presente en el suero de ratas, se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el kit enzimático comercial de Wiener SA (Santa Fe, Argentina). Los resultados se expresaron en mM.

e. Insulina

La insulina inmunoreactiva (IRI) fue dosada por el método propuesto por Herbert y col. (1965) utilizando como estándar, insulina de rata (Novo Nordisk Dinamarca). La sensibilidad fue de $0,5 \mu U/ml$, con un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 8,7%, 6,2% y 5,1% para los rangos de determinación de 1-5, 5-10 y 10-50 μU de insulina/ml respectivamente y coeficientes de variación inter-ensayo de 6,6%, 5,0% y 5,2% para dichos rangos. Los resultados se expresaron como pM.



3.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA CARCASA

Seis ratas de cada grupo dietario, anestesiadas como se describió anteriormente, fueron rasuradas completamente. Luego se les practicó una incisión abdominal y se procedió a la remoción de las vísceras. Las carcadas fueron pesadas, colocadas en recipientes plásticos y congeladas a -20°C . Posteriormente fueron trituradas a la temperatura de nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea. Salvo indicación contraria, la determinación de la composición se efectuó en alícuotas de las mismas almacenadas a -20°C .

a. Determinación del contenido de agua

La determinación de agua se efectuó inmediatamente luego de la trituración de las carcadas. Para ello se deshidrataron alícuotas de aproximadamente 10 g en una estufa de secado de $75-80^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (hasta peso constante). El contenido de la muestra se obtuvo por diferencia de peso de la muestra (Cunniff, 1999).

b. Determinación del contenido de grasa

La determinación de grasa extraíble con éter se efectuó sobre alícuotas de carcada previamente deshidratadas. Para la extracción se utilizó un equipo Twysselman utilizando como solvente éter de petróleo (Cunniff, 1999).

c. Determinación del contenido proteico

El nitrógeno presente en 2 g de carcada molida no deshidratada fue convertido a sulfato de amonio y cuantificado por el método de Kjeldhal (Cunniff, 1999). El contenido de proteínas se estimó multiplicando el contenido de nitrógeno de la muestra por 6,25.

d. Determinación del contenido de cenizas

Las cenizas fueron determinadas por el método de incineración única. Alícuotas de aproximadamente 1 g de carcada molida deshidratada fueron incineradas en mufla a una temperatura de 550°C hasta la obtención de cenizas blancas (Cunniff, 1999).



3.3 **DETERMINACIONES “IN VIVO”**

Al finalizar el período experimental (8 meses de ingesta) se realizaron en los 3 grupos dietarios (DC, DRS y DRS-S) las determinaciones que se detallan a continuación:

a. **Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos (VSTG)**

Se determinó la VSTG utilizando para tal fin la metodología propuesta por Otway y Robinson, (1967). La misma se fundamenta en la inhibición de la remoción intravascular de las lipoproteínas de $d < 1,006$ g/ml por la administración de un detergente no iónico: **Triton WR 1339** (Sigma Chemical Company, USA). Los animales ayunados durante 12-18 horas fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal), luego se les administró por vía endovenosa una solución de Triton al 10% (v/v) en NaCl 0,9% (dosis: 600 mg/Kg peso). La velocidad de secreción de los triglicéridos se calculó considerando un incremento lineal de los triglicéridos plasmáticos en función del tiempo. Estudios preliminares en nuestro laboratorio demostraron que dicho incremento es lineal hasta las dos horas y media (Bernal y col., 1989). En muestras de sangre obtenidas al tiempo 0 minutos (previa administración del Triton WR 1339) y a los 60 y 120 minutos posteriores se analizó el contenido de triglicéridos por la técnica de Laurell, (1966) y se calculó la VSTG según la siguiente fórmula:

$$\text{VSTG nmol}/(\text{min} \times 100 \text{ g rata}) = \frac{[\text{Tg}_{120}] - [\text{Tg}_0] \times \text{Vp} \times 100}{120 \times \text{P} \times 1000}$$

Donde: VSTG: velocidad de secreción plasmática de triglicéridos

Tg₁₂₀: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 120 minutos

Tg₀: concentración (nmol/l) de triglicéridos plasmáticos al tiempo 0 minutos

Vp: volumen plasmático (ml)

P: peso del animal en gramos

100: factor para corregir la expresión por 100 g de rata

1000: factor para corregir las unidades de volumen

El volumen plasmático (Vp) se determinó en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del Azul de Evans (Wang y Hegsted, 1949). Para este propósito a animales ayunados y anestesiados como se describió previamente, se les extrajo 0,4 ml de sangre de la vena yugular y por la misma vía se les inyectó 0,2 ml de una solución de colorante Azul de Evans 0,4%. A los 5 minutos de la inyección del colorante se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre de la vena cava inferior. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el suero diluido 1/10 en ambos casos. La absorbancia de la muestra se leyó a 600 nm en espectrofotómetro. La absorbancia debida al



colorante fue calculada por diferencia entre el valor obtenido para la muestra de plasma diluido extraído antes y después de 5 minutos de la administración del Azul de Evans. La curva de calibrado fue construida agregando cantidades aditivas del colorante a la muestra basal de plasma diluido. El volumen plasmático fue calculado según la siguiente fórmula:

$$Vp \text{ (ml)} = \frac{m}{C}$$

Donde: m: es la masa en μg de Azul de Evans adicionada

C: la concentración en $\mu\text{g/ml}$ del colorante luego de 5 minutos de su administración.

b. Test de tolerancia grasa endovenoso: determinación de la velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos

El test de tolerancia grasa endovenoso es una herramienta adecuada para estudiar la dinámica de los triglicéridos tanto en estados metabólicos normales como alterados (Rösner, 1974). Utiliza una emulsión grasa artificial, **Intralipid**, aceite de soja compuesto por: ácido oleico, ácido linolénico, ácidos grasos saturados y lecitina 20%, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, lisolecitina, trazas de esfingomiélin (1-2%), glicerol (1,25%) y trazas de colesterol. Al ponerse en contacto con la circulación esta partícula lipídica adquiere apo CII, CIII y apo A de lipoproteínas (α -lipoproteínas-HDL) del animal receptor, constituyendo de esta manera un sustrato adecuado para ser degradado en forma similar a las VLDL y quilomicrones por las enzimas lipolíticas tisulares (especialmente del músculo esquelético).

El estudio se llevó a cabo con animales ayunados 16-18 horas a los cuales se les inyectó por vía endovenosa 0,1 ml/100 g de peso corporal de Intralipid al 10% (Kabivitrum, Inc., Alameda Ca, USA) como describimos en trabajos previos (Chicco y col., 2000). Se recolectaron muestras de sangre heparinizada (0,2-0,3 ml) inmediatamente antes y en forma seriada entre 2 y 30 minutos luego de la inyección y se mantuvieron a 0-4°C hasta finalizar el estudio. Posteriormente dichas muestras se centrifugaron a 600 rpm durante 10 minutos a esa temperatura. Se recolectó el plasma libre de glóbulos rojos y se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones para eliminar cualquier remanente de glóbulos rojos. Una alícuota del plasma (0,2 ml) se diluyó a 10 ml con solución fisiológica y se midió la dispersión de la luz por nefelometría.

Se realizó una curva de calibrado usando una dilución en solución salina 1/2000 del mismo batch de Intralipid como describiera Lewis y col. (1972). Todas las lecturas nefelométricas se ajustaron sustrayéndoles un blanco salino. El valor del tiempo cero se restó de los valores de cada



muestra post-inyección. Los valores obtenidos se graficaron en escala semilogarítmica en función del tiempo. Se calculó la constante cinética de primer orden K_2 de eliminación de la emulsión grasa de la circulación sanguínea (velocidad de remoción fraccional: $K_2\% \text{ min}^{-1}$) por el método de los cuadrados mínimos.

c. **Sensibilidad insulínica periférica global. Clamp euglucémica hiperinsulinémica**

Esta técnica fue utilizada con el fin de determinar la sensibilidad insulínica periférica global como una medida de la resistencia insulínica. La misma consiste en una infusión simultánea por vía endovenosa de insulina a una velocidad constante y glucosa a velocidad variable con objeto de mantener la euglucemia. Bajo estas condiciones de hiperinsulinemia la producción hepática de glucosa se encuentra inhibida y la secreción basal de insulina no se modifica bajo la infusión de insulina exógena.

El músculo esquelético capta aproximadamente el 85-90% de la glucosa total metabolizable (Mandarino, 1989). El hígado y el tejido adiposo juegan un rol mínimo en la utilización (Burnol y col., 1984). En esta situación, la masa de glucosa exógena perfundida equivale a la cantidad de glucosa utilizada por los tejidos periféricos.

La clamp euglucémica-hiperinsulinémica fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por DeFronzo y col. (1979) y utilizada en nuestro grupo (D'Alessandro y col., 2000).

Brevemente, después de 5 horas de ayuno un lote de ratas de cada grupo experimental fueron anestesiadas y se les extrajo una muestra de sangre en la cual se determinaron los niveles de glucosa e insulina. Inmediatamente se extrajo el músculo esquelético (gastronemio) que fue rápidamente congelado a la temperatura del nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta su procesamiento. A otro lote de ratas de cada grupo experimental previamente anestesiado se les colocó una cánula en la vena yugular derecha, a través de la cual se extrajeron muestras de sangre para la determinación de los niveles de glucosa e insulina durante el transcurso de la experiencia. La vena yugular izquierda se canalizó con una cánula de doble entrada, infundiéndole por una de ellas insulina altamente purificada (Actrapid, 0,8 U/Kg x hora) a velocidad constante durante dos horas por medio de una jeringa de infusión, mientras que por la segunda entrada de la cánula se infundió una solución de glucosa 20% (p/v) a velocidad variable usando una bomba peristáltica (Sage Instruments model 355). La infusión de glucosa comenzó a los 5 minutos posteriores a la iniciación de la infusión de insulina. En toda la experiencia la glucemia fue mantenida en su nivel basal (5,5-



6,0 mM, euglucemia). Previo a comenzar la infusión se extrajo sangre de la vena yugular derecha (tiempo cero), continuando con extracciones a intervalos de 3-5 minutos durante la primer hora y entre 5-7 minutos en la segunda hora de experiencia, determinándose la glucemia utilizando el equipo Accu-Chek Sensor Confort (Roche).

La velocidad de infusión de glucosa (VIG) en el estado estacionario (durante la segunda hora de la clamp) fue considerada como la velocidad de captación periférica global de glucosa y fue expresada como mg glucosa/(Kg x min). El hematocrito medido al comienzo y al final de la experiencia se mantuvo constante. Al finalizar la clamp se extrajeron muestras de tejido muscular esquelético (gastronemio) que se congelaron a la temperatura del nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.4. DETERMINACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO

3.4.1 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

a. Triglicéridos (Tg)

Alícuotas de tejido hepático diluidas convenientemente (1/10) con solución fisiológica, fueron homogeneizadas a alta velocidad utilizando un homogeneizador con vástago de teflón previamente enfriado y mantenido entre 0-4°C. Volúmenes adecuados de dichos homogeneizados (0,1 ml) fueron utilizados para la determinación del contenido de Tg de acuerdo a la técnica de Laurell (1966). Los resultados se expresaron en $\mu\text{moles/g}$ de tejido húmedo ($\mu\text{mol/g TH}$).

b. Colesterol Total (C_T)

Porciones de tejido hepático pulverizados y diluidos (1/5) con buffer PBS [Na_2HPO_4 800 mM, NaH_2PO_4 20 mM y NaCl 100 mM (pH 7,5)] fueron homogeneizados a alta velocidad con un homogeneizador con vástago de teflón según lo describen Rodgers y Puigserver, (2007). Volúmenes adecuados de los respectivos homogeneizados (0,2 ml) fueron extraídos con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1), filtrados y lavados según Folch y col. (1956). El extracto se resuspendió en una mezcla de butanol 60%, Triton X-100/metanol (2:1) 40%. Finalmente el contenido de colesterol se determinó utilizando el kit comercial de Wiener SA (Santa Fe, Argentina). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/g TH}$.



3.4.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

1. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

a. Carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1)

La actividad de la enzima CPT-1 se determinó espectrofotométricamente mediante la liberación de CoA-SH del palmitoil-CoA en homogeneizados de tejido hepático en presencia y ausencia de L-carnitina (Karlic y col., 2002). Brevemente, 1 g de tejido hepático se homogeneizó con un buffer [sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, etanol 0,1%, antipain 1 mg/L, aprotinin 2 mg/L, leupeptin 1 mg/L, pepstatin 0,7 mg/L, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,2 mM] en relación 1:5 (p/v). Luego de una centrifugación suave para la separación de detritos celulares y a 13000 rpm para el aislamiento mitocondrial, se separó el sobrenadante y se procedió a la determinación de la actividad de CPT-1. Se incubaron dos fracciones conteniendo en un volumen final de 1 ml: 800 μ l de buffer Tris-HCl-DTNB [Tris 116 mM, EDTA 2,5 mM, DTNB 0,11 mM y Triton X-100 0,2% (pH 8,0)], y hasta 75 μ l de buffer de homogeneización (detallado anteriormente) y 100 μ l de palmitoil-CoA 0,5 mM, con 5 μ l de L-carnitina 1,1 mM y sin L-carnitina, durante 5 minutos a 30°C agregándose luego la fuente de enzima registrándose las densidades ópticas espectrofotométricamente a 412 nm. Se calculó la actividad enzimática con y sin el agregado de L-carnitina. La diferencia entre las mismas corresponde a la actividad enzimática de CPT-1 y fue expresada como mU/mg proteína. El contenido de proteínas se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Lowry y col. (1951).

b. Oxidasa de ácidos grasos (FAO)

La actividad enzimática de la oxidasa de ácidos grasos fue cuantificada utilizando el procedimiento propuesto por Vamecq, (1990). Brevemente, se aisló una fracción enriquecida con peroxisomas según Goglia y col. (1989), homogeneizando (homogeneizador "Potter Elvehjem") 0,5 gr de tejido hepático con cinco volúmenes de un buffer frío que contenía: sacarosa 0,3 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y EDTA 0,5 mM. Luego de centrifugaciones a 7000 rpm para la separación de detritos celulares y posteriormente a 21000 rpm para el aislamiento peroxisomal, se resuspendió la fracción en el buffer anterior y se congeló inmediatamente hasta la determinación de la actividad. La actividad de FAO se determinó fluorométricamente mediante la liberación de H₂O₂ a través de una reacción peroxidativa acoplada, empleando homovanillato en presencia de horseradish peroxidase. La mezcla de reacción contenía: buffer glicilglicina 80 mM (pH 8,3), homovanillato 5 mM, Brij 58 0,1 g/L, horseradish peroxidase (tipo II) 0,1 mg, FAD 0,02 mM y palmitoil-CoA 0,1



mM. La reacción comenzó con el agregado de palmitoil-CoA y se registraron las lecturas comenzando 4 minutos luego de iniciada la misma. A intervalos de 2 minutos, una alícuota fue removida y mezclada con 3 ml de buffer carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 10,7). La fluorescencia producida se midió en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de 325 nm (excitación) y 425 nm (emisión). Además, se realizó la correspondiente curva de calibrado con concentraciones crecientes de H₂O₂ preparada de un solución al 30%. La actividad de la enzima se expresó como mU/mg proteína. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951).

2. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA LIPOGÉNESIS

a. Acetil CoA carboxilasa (ACC)

La actividad fue medida mediante el método propuesto por Zimmermann y col. (2003), con algunas modificaciones. Un volumen de tejido hepático fue homogenizado en 3 volúmenes de buffer de homogenización [KH₂PO₄ 9 mM, K₂HPO₄ 85mM, DTT 1 mM y KHCO₃ 70 mM (pH 7,0)]. La fracción citosólica fue obtenida luego de una centrifugación a 30000 rpm durante 1 hora 30 minutos a 4°C. La actividad de ACC se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm a 37°C con una mezcla de reacción conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), citrato de potasio 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glutatión 3,75 mM (pH 8,0), albúmina sérica bovina 0,75 mg/ml, acetyl-CoA 0,125 mM, fosfoenolpiruvato 5 mM, NADH 0,125 mM, piruvato quinasa 15 µg/ml y lactato dehidrogenasa 6 µg/ml. Cada 2,3 volúmenes de mezcla de reacción, 1 volumen de muestra activada fue añadido, y la reacción fue iniciada por la adición de KHCO₃ 1 M y ATP 150 mM. Para la activación de la muestra, 1 volumen de homogenato fue incubado con 1 volumen de buffer de activación [citrato potasio 20 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), albúmina sérica bovina 1,5 mg/ml, MgCl₂ 20 mM y glutatión reducido (GSH) 20 mM (pH 7,5)] por 15 minutos a 37°C. Una mezcla (0.76 ml) conteniendo todos los ingredientes excepto ATP y KHCO₃ es preincubada a 37°C, como blanco de reactivos. Luego de la adición de ATP, el consumo de NADH es registrado espectrofotométricamente a 340 nm por 1 minuto, posteriormente la reacción es iniciada por la adición de KHCO₃. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.



b. Sintasa de ácidos grasos (FAS)

La fracción citosólica de las muestras de homogeneizado hepático (con buffer conteniendo: sacarosa 0,25 M, DTT 1 mM y EDTA 1 mM; pH 7,4) fue obtenida por centrifugación a 30000 rpm durante 1 hora 30 minutos a 4°C y se determinó inmediatamente la actividad de FAS como fue descrito anteriormente por Halestrap y Denton, (1973). La actividad de FAS se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm a temperatura ambiente en un medio conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM (pH 6,5), NADPH 0,1 mM, acetil-CoA 25 μ M y cantidades adecuadas de muestra. La reacción se inició inmediatamente luego del agregado de malonil-CoA 60 μ M. Se registró la variación de densidad óptica debido a la oxidación de NADPH; una unidad de actividad enzimática representa 1 μ mol de NADPH oxidado por minuto a 37°C. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

c. Enzima málica (EM)

La actividad fue medida mediante el método propuesto por Ochoa, (1955) con una pequeña modificación de acuerdo a Hsu y Lardy, (1969). Se registró la variación de densidad óptica en un buffer de reacción conteniendo: trietanolamina 0,4 M, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,12 M y NADP^+ 3,4 mM. Luego de 10 minutos para estabilizar la lectura, se agregó L-malato 0,03 M y se midió la absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro a intervalos de 15 segundos. Una unidad de actividad enzimática representa 1 μ mol de NADP^+ reducido por minuto a 340 nm y a 37°C. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

d. Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-P DH)

La actividad de la enzima G-6-P DH fue analizada como se describió anteriormente (Chicco y col., 1996). Aproximadamente 500 mg de hígado congelado se homogeneizó con 10 volúmenes de buffer fosfato-bicarbonato [KHCO_3 70 mM, K_2HPO_4 85 mM, KH_2PO_4 9 mM, DTT 1 mM; (pH 8,0)] utilizando homogeneizador "Potter-Elvehjem". Luego de centrifugar 40 minutos a 15000 rpm se utilizó el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática. Se registró la variación de densidad óptica a 340 nm en un medio que contenía: buffer trietanolamina 0,04 M (pH 7,5), NADP^+ 0,5 mM, cantidades adecuadas de muestra y G-6-P 0,67 mM en un volumen final de 3 ml. La velocidad de formación de NADPH, expresada en μ mol/minuto, representa la actividad



enzimática de G-6-P DH. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

3.4.3 EXPRESIÓN DE LAS MASAS PROTEICAS POR LA TÉCNICA WESTERN BLOT

a. Receptor activador de la proliferación peroxisomal- α (PPAR- α)

100 mg de hígado pulverizado fue homogeneizado con un buffer (1/10) que contiene Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, aprotinin 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM, dejándolo reposar durante 120 minutos a 4°C según Federici y col. (2001). El lisado de tejido se centrifugó a 10000 rpm durante 45 minutos a fin de remover el material insoluble. La concentración de proteínas de los extractos fue determinada por el Método de Bradford.

El análisis por Western blot se realizó según Nagai y col. (2002). Las muestras (100 μ g proteína/línea) se desnaturalizaron durante 3 minutos a ebullición en un buffer de muestra Laemmli y luego se resolvieron por electroforesis en un gel al 12% de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se electro-transfirieron (50 volts constantes) a una membrana de PVDF toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,1% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer conteniendo Tween 20 0,1% y leche descremada 5% durante 8 horas a 4°C. Para el inmunoblotting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal de conejo, anti-PPAR- α (dilución: 1/400) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/2000) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La intensidad de las manchas se cuantificó utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo del Western blot entre 25 y 100 μ g de proteínas. El coeficiente de correlación ($r = 0,95$) entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observado en el inmunoblotting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La expresión del PPAR- α se normalizó con β -actina.



b. Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP-1)

Los extractos nucleares fueron obtenidos por centrifugación en gradiente de glucosa, de acuerdo al método descrito por Ascencio y col. (2004) con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido fue homogenizado en buffer de lisis (0,5 g tejido/3,75 ml buffer) conteniendo sacarosa 30 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 5mM, Triton X-100 0,05%, Tris/HCl 10 mM (pH 7,5), coctel inhibidor de proteasas 5µl/100 mg tejido. El homogenato fue centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en 2 ml de buffer sacarosa [sacarosa 2,3 M, MgCl₂ 2 mM, Tris/HCl 10 mM (pH 7,5) y coctel inhibidor de proteasas 5µl/100 mg tejido] y centrifugado a 32000 rpm por 1 hora a 4°C. El pellet obtenido se utilizó como *extracto nuclear* y fue resuspendido en 600 µl de buffer conteniendo glicerol 50%, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM y HEPES 50 mM (pH 7,5). El extracto nuclear fue conservado a -80°C. La concentración de proteínas de los extractos nucleares fue determinada por el Método de Bradford.

Los extractos nucleares (80 µg) fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 10% de poliacrilamida. Las proteínas se electro-transfirieron (50 volts constantes) a una membrana de PVDF toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,1% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer conteniendo Tween 20 0,1% y leche descremada 5% durante 8 horas a 4°C. Para el inmunoblotting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal de conejo: anti-SREBP-1 (dilución: 1/500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/4000) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La intensidad de las manchas se cuantificó utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo del Western blot entre 25 y 100 µg de proteínas. El coeficiente de correlación ($r = 0,93$) entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observado en el inmunoblotting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La expresión del SREBP-1 se normalizó con β -actina.



3.5. DETERMINACIONES EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

3.5.1. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ENZIMAS

a. Triglicéridos (Tg)

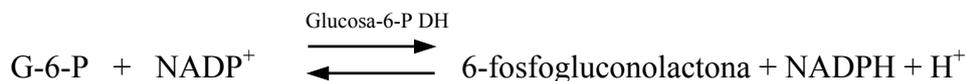
Se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en el ítem **3.4.1. a** para la determinación del contenido de triglicéridos hepáticos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g TH}$.

b. Glucógeno

Se cuantificó el contenido de glucógeno en homogeneizados de tejido muscular utilizando el método enzimático descrito por Huijing, (1970) y previamente utilizado por nuestro grupo (Gutman y col., 1987). Brevemente, el glucógeno fue hidrolizado por la acción de las enzimas α -amilasa y amilogucosidasa. La glucosa liberada se cuantificó de acuerdo al método de glucosa oxidasa/peroxidasa. Los resultados se expresaron en términos de glucosa liberada a partir del glucógeno como $\mu\text{moles de glucosa-glucógeno/g TH}$.

c. Glucosa – 6 – fosfato (G-6-P)

Los niveles de G-6-P se determinaron espectrofotométricamente mediante el método propuesto por Lang y Michal, (1974) donde:



Aproximadamente 120 mg de tejido muscular pulverizado fueron homogeneizados en (600 μl) de ácido perclórico 6 N y centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 6500 rpm. Se separó el primer sobrenadante y al precipitado se le agregó (0,5 x g tejido) ml de H₂O destilada y (0,5 x g tejido) ml de HClO₄ 0,6 N, se homogeneizó y se centrifugó a 6500 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante de la segunda centrifugación fue adicionado al de la primera y se le agregó K₂CO₃ 5M hasta pH 3,5. Se dejó reposar 15 minutos y se centrifugó 10 minutos a 6500 rpm. El sobrenadante se utilizó para la determinación de G-6-P. El medio de reacción (1 ml volumen final) consistió en: trietanolamina 0,2 M (pH 7,6), cantidades adecuadas del extracto, NADP⁺ 0,2 mM, MgCl₂ 5 mM y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa 170 U/L (G-6-P DH - 214 U/mg proteína). Las lecturas se realizaron a 340 nm. La reacción se produjo estequiométricamente bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados se expresaron en $\mu\text{moles G-6-P/g TH}$ y fueron calculados según la siguiente ecuación:



$$\frac{\Delta DO \times V}{\epsilon \times d \times v} \times f = \mu\text{moles/g tejido húmedo}$$

Donde: ΔDO = variación de la densidad óptica

ϵ = coeficiente de extinción ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$) correspondiente a la longitud de onda (λ) utilizada (para $\lambda = 340 \text{ nm}$, $\epsilon = 6,22$)

d = paso de luz cubeta (cm)

V = volumen de ensayo (ml)

v = volumen de muestra usada en el ensayo (ml)

f = factor de dilución calculado de acuerdo a Lowenstein, (1969):

$$f = \frac{[\text{g tejido} + (\text{ml HClO}_4 \times \text{densidad HClO}_4) \times (\text{ml finales extracto} + \text{ml K}_2\text{CO}_3)]}{\text{g tejido} \times \text{ml finales extracto}}$$

d. Aislamiento de la enzima fosfoproteína – fosfatasa

El aislamiento se realizó con el fin de obtener la enzima fosfoproteína – fosfatasa inespecífica para ser posteriormente utilizada en la determinación de la actividad enzimática piruvato dehidrogenasa (PDHc). Esta fosfatasa interviene en la defosforilación y, por ende, activación covalente de la fracción inactiva del complejo enzimático PDHc. La cantidad total de esta fosfatasa es escasa en el tejido muscular y se pierde durante el procesamiento, motivo por el cual es necesaria su adición.

Para la obtención de la enzima se utilizaron hígados de ratas adultas. Los mismos fueron homogeneizados en 3-4 volúmenes de buffer IED: imidazol 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 0,5 mM (pH 7,45) y centrifugados a 11500 rpm durante 20 minutos, de acuerdo a la técnica descrita por Brandt y col. (1974). Brevemente, el extracto de tejido fue precipitado por adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración final del 70%. El precipitado de sulfato de amonio fue recogido por centrifugación, disuelto en buffer Tris-HCl (Tris-HCl 20 mM, MgCl_2 1 mM, pH 8,0) y tratado con etanol (5 volúmenes). El precipitado obtenido por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos, fue extraído con buffer IED y dializado (16-18 horas) contra el mismo buffer.

La actividad fosforilasa-fosfatasa se cuantificó en presencia de p- NO_2 -fenil-fosfato, midiendo la velocidad de cambio de absorbancia de dicho sustrato a 405 nm (Bergmeyer, 1974). La actividad fosforilasa-fosfatasa es directamente proporcional a la cantidad de p-nitrofenol liberado por unidad de tiempo.



e. Complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc)

La extracción de PDHc del tejido muscular fue descrita previamente por nuestro grupo (D'Alessandro y col., 2000). Los músculos gastronemios fueron homogenizados en 20 volúmenes (p/v) de buffer de homogenización [HEPES 50 mM (pH 7,4), conteniendo Triton X-100 3%, EDTA 2 mM, DTT 5 mM, tiamina pirofosfato 0,5 mM, dicloroacetato 2 mM (inhibidor PDHK), FK 50 mM (inhibidor fosfoproteína fosfatasa), albúmina sérica 2%, N-tosil-L-fenilamina-clorometil cetona 0,1 mM, tripsina inhibidor 0,1 mg/ml y leupeptin 0,02 mg/ml] y homogeneizado y sonificado tres veces durante 30 segundos a 4°C. Después de la centrifugación a 4°C, el sobrenadante fue precipitado a la misma temperatura con polietileno glicol 9%. El pellet fue resuspendido en el buffer de homogenización y dividido para medir la forma activa de PDHc (PDHa) y la PDH total (PDHt). Una porción fue usada inmediatamente para medir la PDHa. Para medir la PDHt, otra porción fue incubada con fosfoproteína fosfatasa específica en presencia de MgCl₂ 10 mM a 30°C por 20 minutos. La actividad del PDHc (PDHt y PDHa) se determinaron espectrofotométricamente a 30°C midiendo la reducción del NAD⁺. La mezcla de ensayo contenía buffer fosfato 30 mM (pH 7,4), NAD⁺ 2,5 mM, coenzima A 0,5 mM, tiamina pirofosfato 0,5 mM, DTT 0,5 mM, MgCl₂ 5 mM, dihidrolipoyl deshidrogenasa 10 unidades, piruvato 0,5 mM y cantidades apropiadas de PDHc (0,5 – 1,0 mg proteína) en un volumen final de 2 ml. La reacción fue iniciada por la adición de la enzima, y todo el ensayo fue realizado a 30°C. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). La actividad PDHc fue expresada como η moles de NADH formados por minuto por g TH y por mg de proteína soluble.

f. Actividad hexoquinasa

Muestras de músculos congelados fueron homogenizadas con 20 volúmenes de buffer de homogenización conteniendo buffer fosfato 0,01 M (pH 7,0), β -mercaptoetanol 5 mM, EDTA-Na₂ 5 mM y glucosa 10 mM, siguiendo el método descrito por Grossbard y Schimke, (1966). Brevemente, el homogenato fue centrifugado 45 minutos a 11900 rpm, y el sobrenadante fue usado para medir la actividad enzimática. La actividad hexoquinasa fue medida espectrofotométricamente a 37°C en un buffer conteniendo Tris-HCl 74 mM (pH 7,4), glucosa 25 mM, NADP⁺ 0,55 mM, ATP 3,7 mM, MgCl₂ 7,4 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,3 U/ml a 30°C. La reacción se inicia con la adición del extracto muscular y la actividad se determinó espectrofotométricamente a 340 nm midiendo la reducción del NAD⁺. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951). La actividad hexoquinasa fue expresada como mU/mg proteína.



3.5.2 EXPRESIÓN DE LA MASA PROTEICA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA Glut-4

Las membranas del músculo gastronemio (rojo y blanco) fueron aisladas de acuerdo al método descrito por Rodnick y col. (1992) con algunas modificaciones. Brevemente, el tejido fue homogenizado en buffer de homogenización (5ml/g tejido) conteniendo: Tris/HCl 200 mM (pH 7,4), sacarosa 255 mM, EDTA 1 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, vanadato de sodio 1 mM, FNa 100 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, aprotinin 2 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml y pepstatin 1 µg/ml. El tejido fue homogenizado y centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 volúmenes de buffer de homogenización, rehomogeneizado y centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. Dos extracciones adicionales del pellet a 5000 rpm fueron realizadas y todos los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados y centrifugados a 30000 rpm durante 90 minutos. El pellet obtenido se disolvió en buffer de homogenización y fue conservado a -80°C. La concentración de proteínas de los extractos de membrana fue determinada por el Método de Bradford.

Las muestras (15 µg proteína/línea) se desnaturalizaron durante 3 minutos a ebullición en un buffer de muestra Laemmli y luego se resolvieron por electroforesis en un gel al 10% de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se electro-transfirieron (50 volts constantes) a una membrana de PVDF toda la noche empleando un buffer de transferencia (pH 8,8) que contenía Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,1% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con Tris-buffer conteniendo Tween 20 0,1% y leche descremada 5% durante 8 horas a 4°C. Para el inmunoblotting, las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal de cabra, anti-Glut-4 (dilución: 1/600) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a 4°C durante toda la noche. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/2000) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente y se procedió a la detección por quimioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). La intensidad de las manchas se cuantificó utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD). Estudios preliminares demostraron una linealidad en el ensayo del Western blot entre 10 y 100 µg de proteínas. El coeficiente de correlación ($r = 0,96$) entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observado en el inmunoblotting resultó lineal bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La expresión del Glut-4 se normalizó con α -tubulina.



4. REACTIVOS UTILIZADOS

Enzimas, sustratos y coenzimas utilizados en las técnicas previamente detalladas fueron provistos por SIGMA (St. Louis, MO, USA) o Boehringer Mannheim (Indianápolis, Ind., USA). La proteína de soja aislada fue provista por MP Biomedicals (Solon, OH, USA). Los anticuerpos fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El Intralipid (emulsión grasa 20%) fue obtenido de Kabivitrum (Alameda, CA, USA). Los demás reactivos químicos fueron de grado analítico (máxima pureza disponible comercialmente).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

El tamaño de las muestras fue calculado en base a las mediciones realizadas previamente en nuestro laboratorio con ratas alimentadas tanto con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS) considerando un poder del 80% (Gutman y col., 1987; Lombardo y col., 1996a; Soria y col., 2002; Rossi y col., 2005; Rossi y col., 2009).

Los resultados se expresaron como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron por ANOVA (análisis de varianza), seguidas de la inspección de las diferencias entre pares de medias por el test de Newman Keuls (Snedecor y Cochran, 1967). Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. En todos los casos los coeficientes de correlación inter-clases fueron al menos de 0,73.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS EXPERIMENTALES

PARTE 1: ANÁLISIS SECUENCIAL DEL TIEMPO REQUERIDO POR LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA PARA MEJORAR O REVERTIR LA DISLIPEMIA Y LA MODERADA HIPERGLUCEMIA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA

Como mencionamos en el capítulo “Introducción”, ratas normales alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia, moderada hiperglucemia y resistencia insulínica (RI) periférica global. Estas alteraciones se acompañan de un incremento de la ingesta calórica que se refleja en un moderado aumento del peso corporal en presencia de adiposidad visceral (Chicco y col., 2003; Rossi y col., 2005).

A partir de estudios a nivel humano y en animales de experimentación que señalan los efectos beneficiosos de la proteína de soja sobre la dislipemia e insensibilidad insulínica nos propusimos en la presente tesis utilizar el modelo no genético de ratas alimentadas con DRS previamente descrito a fines de evaluar la posibilidad de mejorar y/o revertir estas alteraciones por manipulación dietaria: cambio de la fuente proteica de la dieta (origen animal: caseína por origen vegetal: soja). (Objetivo general descrito en el ítem “Objetivos”)

Para poder concretar este objetivo general de tesis, el primer **objetivo específico** fue:

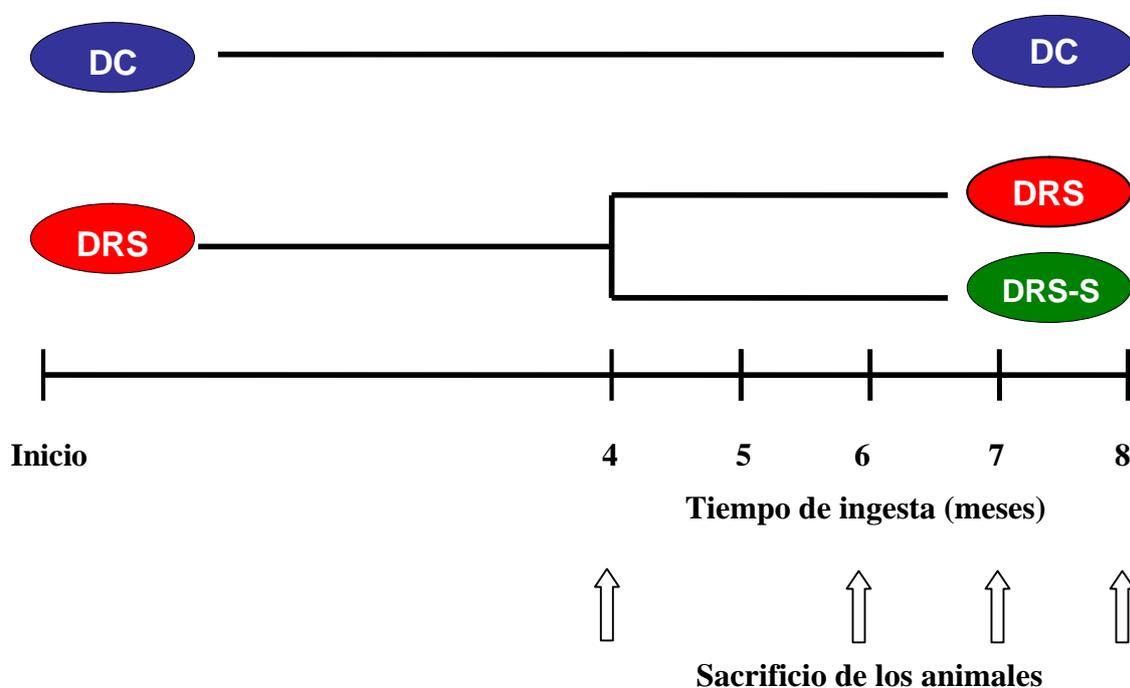
Determinar en forma secuencial si una vez alcanzada la dislipemia y resistencia insulínica estable (4 meses de ingesta crónica con una DRS) el cambio del tipo de proteína de la dieta puede mejorar o revertir los niveles elevados de lípidos plasmáticos (triglicéridos, colesterol y AGNE), el incremento del contenido de triglicéridos hepáticos (esteatosis hepática) y la moderada hiperglucemia. En particular se analizaron:

- Niveles de triglicéridos, colesterol, AGNE, glucosa e insulina plasmáticos. Contenido de triglicéridos hepáticos.

- Se determinó también el peso corporal y la ingesta calórica durante todo el período de experimentación.

Al respecto, se alimentaron ratas normales con DRS o dieta control (DC) durante 4 meses. Al finalizar este período se subdividió al grupo DRS en 2 subgrupos: 1) Subgrupo DRS que continuó con la misma dieta durante 4 meses adicionales y 2) Subgrupo DRS donde la fuente proteica caseína fue reemplazada isocalóricamente por proteína de soja aislada durante el mismo período (4 meses). El grupo control continuó con la DC hasta finalizar la experiencia. Los detalles de los grupos de animales y componentes de la dieta fueron descriptos en “Materiales y Métodos”. En todos los lotes se evaluaron en forma secuencial a partir de los 4 meses de ingesta los parámetros mencionados anteriormente (**Figura 10**).

Figura 10. Diseño experimental secuencial.



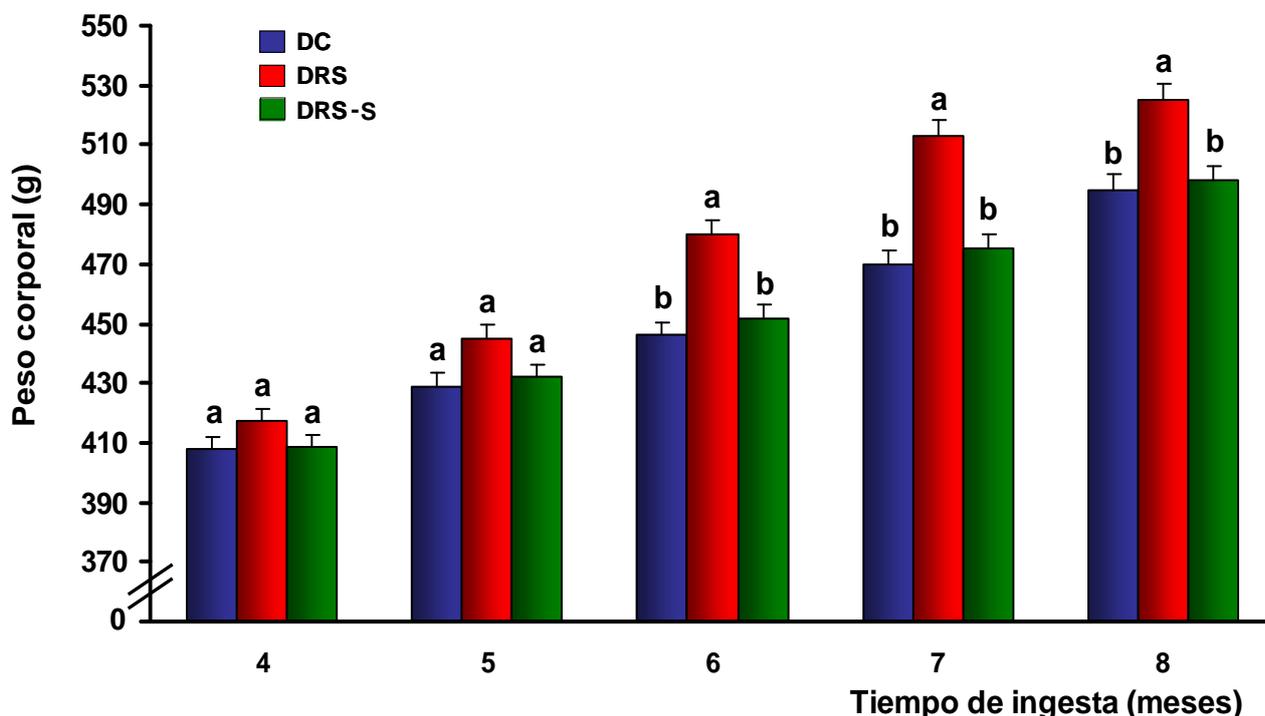
a) Ganancia de peso corporal e ingesta calórica

El peso corporal y la ingesta calórica fueron cuidadosamente monitoreados en los diferentes grupos dietarios a lo largo de todo el período experimental. La **Figura 11** muestra los cambios secuenciales del peso corporal en los 3 grupos dietarios. En esta figura se puede observar que al cabo de 4 meses de ingesta no se constataron diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales. Sin embargo, a partir del quinto mes, en los animales alimentados con DRS se observó una tendencia a incrementar el peso corporal sin llegar a ser aún significativa. Este

incremento de peso fue significativamente manifiesto a partir de los 6 meses de ingesta de DRS respecto al grupo alimentado con DC y continuó hasta el final de la experiencia. La sustitución de caseína por proteína de soja atenúo el incremento de peso corporal en la DRS, no observándose diferencias significativas con el grupo DC al finalizar el tiempo de ingesta.

Los cambios secuenciales de la ingesta calórica en función del tiempo en los 3 grupos experimentales son similares hasta los 5 meses. A partir de los 6 meses y hasta el final del período experimental, las ratas alimentadas con DRS incrementaron significativamente su ingesta calórica con respecto al grupo DC. La ingesta calórica del grupo DRS-S fue similar a la observada en el grupo DC, durante todo el período experimental. Los resultados obtenidos al finalizar la experiencia fueron kJ/día: media \pm SEM, (n=6) DC: 264,8 \pm 4,3; DRS: 334,8 \pm 7,0; DRS-S: 270,0 \pm 4,5; ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S.

Figura 11. Peso corporal en los animales alimentados con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS-proteína de soja (DRS-S).¹



¹Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable a cada tiempo es comparada con el test de Newman Keuls.



b) Contenido de triglicéridos hepáticos y niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total, AGNE, glucosa e insulina

En la **Figura 12A** analizamos el contenido de triglicéridos hepáticos en función del tiempo de dieta. En los animales alimentados con DRS los niveles de triglicéridos hepáticos fueron significativamente más elevados en todos los períodos analizados respecto del grupo DC. Al sustituir la caseína por proteína de soja a partir de los 4 meses de ingesta en el grupo alimentado con DRS (DRS-S), se observó un descenso significativo del contenido de triglicéridos hepáticos a partir de los 6 y hasta los 8 meses alcanzando valores similares a los observados en el grupo DC.

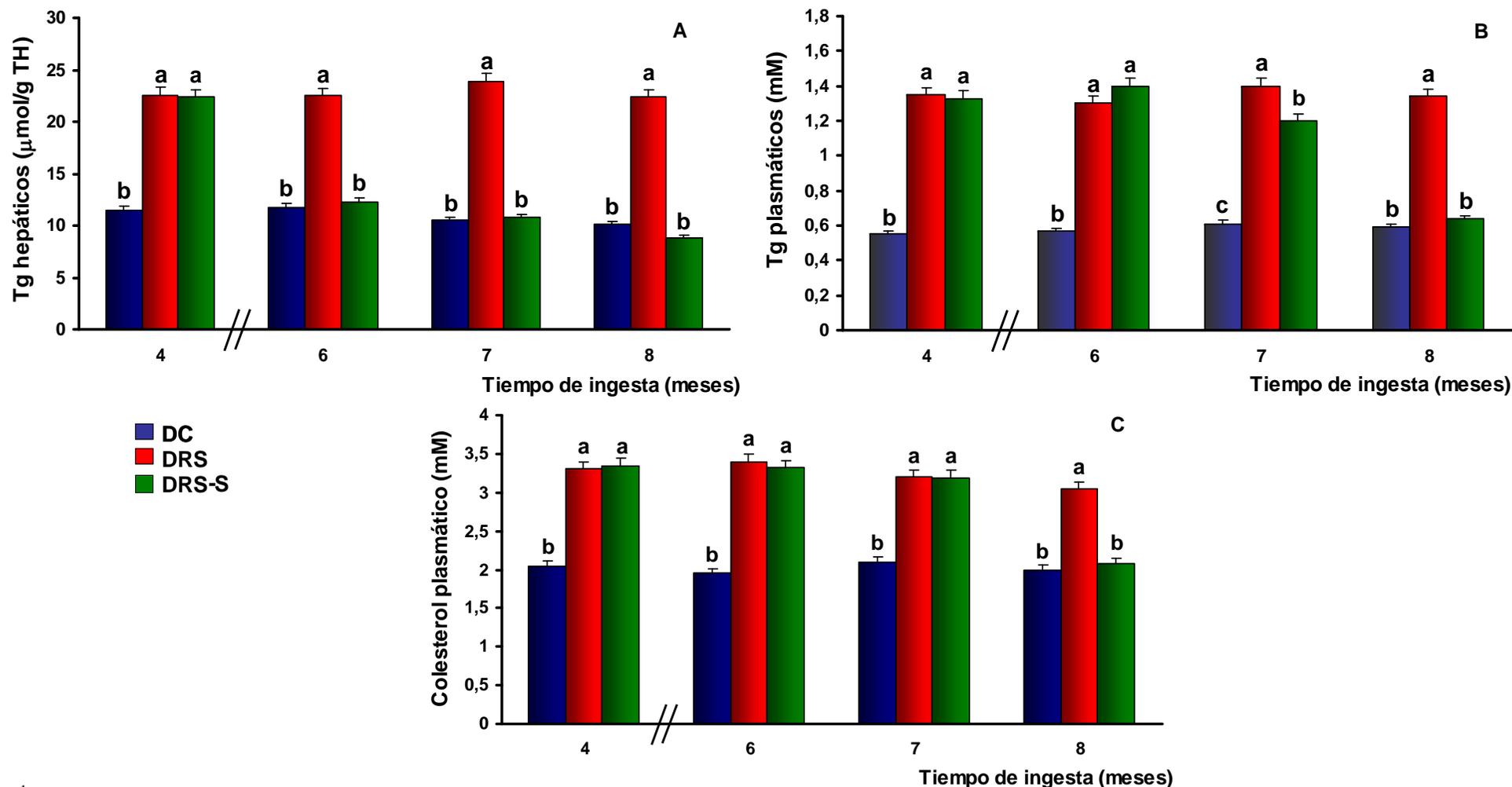
La **Figura 12B** muestra los niveles de triglicéridos plasmáticos en los distintos períodos de experimentación. Los animales del grupo DRS presentaron diferencias significativas con el grupo DC, durante todo el período experimental. Cuando se sustituyó la caseína por proteína de soja, los niveles de triglicéridos plasmáticos descendieron secuencialmente, y a los 8 meses de dieta alcanzaron valores similares al grupo control DC.

En la **Figura 12C** se muestran los niveles de colesterol plasmático en función del período experimental, obteniéndose el mismo patrón secuencial que el observado con los niveles de triglicéridos plasmáticos.

Como se ha demostrado en trabajos previos (Chicco y col., 2003; Lombardo y col., 1996b; Soria y col., 2001) los niveles plasmáticos de AGNE incrementan en el grupo DRS durante todo el período experimental, mientras que la glucemia en estos animales es significativamente diferente al lote alimentado con DC a partir de los 3 meses de ingesta. La administración de proteína de soja (**Tabla 7**) durante los últimos 4 meses de ingesta normalizó los niveles de AGNE y glucosa plasmáticos solo al final del período experimental (8 meses). La insulinemia no mostró diferencias significativas entre los lotes a partir de los 4 meses y hasta el final del período experimental.



Figura 12. Contenido de triglicéridos hepáticos y niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.¹



¹Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) cuando cada variable a cada tiempo es comparada con el test de Newman Keuls.



Tabla 7. Niveles plasmáticos de AGNE, glucosa e insulina en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S al finalizar el período experimental. ¹

Dieta	AGNE (μM)	Glucosa (mM)	Insulina (pM)
DC	310,0 \pm 10,0^b	6,00 \pm 0,17^b	375,0 \pm 30,0^a
DRS	730,0 \pm 80,0^a	8,20 \pm 0,19^a	369,0 \pm 33,0^a
DRS-S	320,0 \pm 40,0^b	6,72 \pm 0,10^b	370,0 \pm 27,0^a

¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comporten la misma letra supraescrita son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



Los resultados obtenidos demuestran que luego de 4 meses de sustitución de caseína por proteína de soja como fuente proteica en la DRS se logró la normalización de los niveles basales plasmáticos de triglicéridos, colesterol, AGNE y glucosa. En tejido hepático se observó una disminución del contenido de triglicéridos, alcanzando valores similares a los obtenidos en el grupo de animales alimentados con DC.

Por otro lado, el incremento de peso e ingesta calórica observado en el grupo DRS al final del período experimental, no pudo ser constatado en el grupo DRS-S. En este grupo el peso corporal promedio final fue similar al obtenido por el grupo DC.

Estos resultados sugieren que la sustitución de la fuente proteica de la dieta: caseína por proteína de soja durante 4 meses, es el tiempo más adecuado en las condiciones experimentales utilizadas para lograr un mejoramiento o reversión de la dislipemia y la moderada hiperglucemia inducidas por la administración crónica de una DRS (Oliva y col., 2008).

A partir de estos hallazgos nos propusimos analizar el efecto de la proteína de soja sobre algunos mecanismos a nivel hepático y músculo esquelético que podrían estar involucrados en la reversión de estos desordenes metabólicos.



PARTE 2: EFECTOS DE LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA SOBRE METABOLITOS, ENZIMAS Y RECEPTORES NUCLEARES EN TEJIDO HEPÁTICO

A partir de los resultados previamente descriptos, el segundo **objetivo específico** fue:

Una vez determinado el tiempo más adecuado capaz de lograr las mayores modificaciones de los parámetros plasmáticos y triglicéridos hepáticos, se analizaron en este tiempo (8 meses) los siguientes aspectos bioquímicos-metabólicos:

- Mecanismos involucrados en el metabolismo lipídico: En tejido hepático se evaluó: **1)** contenido de triglicéridos y colesterol; **2)** in vivo, velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos y remoción plasmática de triglicéridos; **3)** enzimas claves involucradas en la lipogénesis: acetil CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-P DH). Expresión de la masa proteica del factor de transcripción proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1); **4)** enzimas claves involucradas en la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial y peroxisomal: carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO). Expresión de la masa proteica del receptor activador de la proliferación peroxisomal-alfa (PPAR- α).

Para lograr estos objetivos, se alimentaron ratas normales con DRS durante 4 meses. Al finalizar este período, a la mitad de los animales se les sustituyó isocalóricamente la fuente proteica (caseína) por proteína de soja aislada durante 4 meses adicionales. Los animales controles recibieron durante los 8 meses una dieta control (DC). Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en “Materiales y Métodos”.

Los resultados alcanzados fueron los siguientes:

a) **Ganancia de peso corporal e ingesta calórica, peso del tejido adiposo y composición de la carcasa**

Como se puede observar en la **Tabla 8** y como se demostró en la Parte 1, el peso corporal y la ingesta calórica desde el inicio y hasta los 4 meses de dieta no mostró diferencias significativas entre las ratas alimentadas con DRS y el grupo control (DC). Al final del período de experimentación (8 meses), se corroboró que el grupo DRS muestra un incremento significativo en el peso e ingesta calórica en relación al grupo DC y que cuando se sustituyó la caseína por proteína de soja aislada (DRS-S), no se observaron diferencias significativas en ambos parámetros con



respecto al grupo control. Al mismo tiempo al finalizar el período experimental (8 meses) se observó una disminución significativa en el peso del tejido adiposo epididimal de los animales alimentados con DRS-S, sin alcanzar los valores del lote DC. Media \pm SEM (n = 6) (g) DC: $7,97 \pm 0,25$; DRS: $16,11 \pm 0,56$ y DRS-S: $13,26 \pm 0,25$; ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S y ($p < 0,05$) DRS-S vs. DC. Un patrón similar se constató en el peso del tejido adiposo retroperitoneal.

Los animales alimentados con DRS presentan un incremento significativo del peso de la carcasa respecto del lote que recibió DC. La sustitución de caseína por proteína de soja aislada disminuyó el peso de la carcasa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: media \pm SEM (n=6) peso (g) DC: $340,0 \pm 6,5$; DRS: $411,1 \pm 20,0$; DRS-S: $369,0 \pm 5,5$; ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S; ($p < 0,05$) DRS-S vs. DC. Con respecto a la composición de la carcasa se observó un incremento significativo del contenido de grasa en los animales del lote DRS que disminuyó significativamente cuando la caseína fue sustituida por proteína de soja aislada, sin alcanzar aún los valores del lote control. El contenido de agua también disminuyó significativamente en el grupo DRS, mientras que en el grupo DRS-S alcanzó valores similares al grupo DC. Los valores obtenidos fueron: media \pm SEM (n = 6) grasa (% peso húmedo) DC: $14,3 \pm 0,9$; DRS: $25,5 \pm 1,0$; DRS-S: $17,8 \pm 1,1$; ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S; ($p < 0,05$) DRS-S vs. DC; agua (% peso húmedo) DC: $60,2 \pm 1,8$; DRS: $52,8 \pm 1,2$; DRS-S: $58,9 \pm 1,1$; ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S. En el contenido de proteínas y cenizas de la carcasa no se observaron modificaciones en los tres grupos dietarios.



Tabla 8. Peso corporal e ingesta calórica de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹

Dieta	Peso corporal inicial (gr)	Peso corporal 4 meses (gr)	Ingesta calórica (0 – 4 meses) (kJ/día)	Dieta	Peso corporal 4 meses (gr)	Peso corporal 8 meses (gr)	Ingesta calórica (4 – 8 meses) (kJ/día)
DC (n=6)	181,6 ± 3,4^a	400,0 ± 8,1^a	265,8 ± 6,2^a	DC (n=6)	407,7 ± 7,7^a	478,6 ± 12,9^b	267,6 ± 5,9^b
DRS (n=12)	185,3 ± 4,4^a	415,1 ± 8,3^a	263,7 ± 3,6^a	DRS (n=6)	417,5 ± 7,2^a	525,1 ± 11,6^a	337,1 ± 7,4^a
				DRS-S (n=6)	408,7 ± 9,7^a	492,9 ± 7,2^b	273,0 ± 3,7^b

¹ Los valores se expresan como media ± SEM, n= número de animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra supraescrita son significativamente diferentes (p < 0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.



b) Metabolitos plasmáticos y niveles de insulina

Corroborando los resultados antes mostrados, se observó al finalizar el período de ingesta un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE, glucosa y colesterol total (C_T) en las ratas alimentadas con DRS en comparación a las que recibieron DC. Mediante la sustitución de la fuente proteica dietaria durante los últimos cuatro meses de ingesta (caseína por proteína de soja aislada) se logró normalizar todos los metabolitos previamente descriptos, mientras que los niveles plasmáticos de insulina no se modificaron en ninguno de los grupos dietarios.

Tabla 9. Niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE, C_T , glucosa e insulina en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S. ¹

Dieta	Triglicéridos (mM)	AGNE (μM)	C_T (mM)	Glucosa (mM)	Insulina (pM)
DC	0,64 \pm 0,04^b	313,0 \pm 12,0^b	2,18 \pm 0,08^b	6,20 \pm 0,15^b	365,0 \pm 28,0^a
DRS	1,35 \pm 0,08^a	745,0 \pm 69,0^a	3,24 \pm 0,08^a	8,15 \pm 0,16^a	372,0 \pm 30,0^a
DRS-S	0,64 \pm 0,07^b	318,0 \pm 32,0^b	2,08 \pm 0,15^b	6,68 \pm 0,12^b	382,0 \pm 26,0^a

¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra supraescrita son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

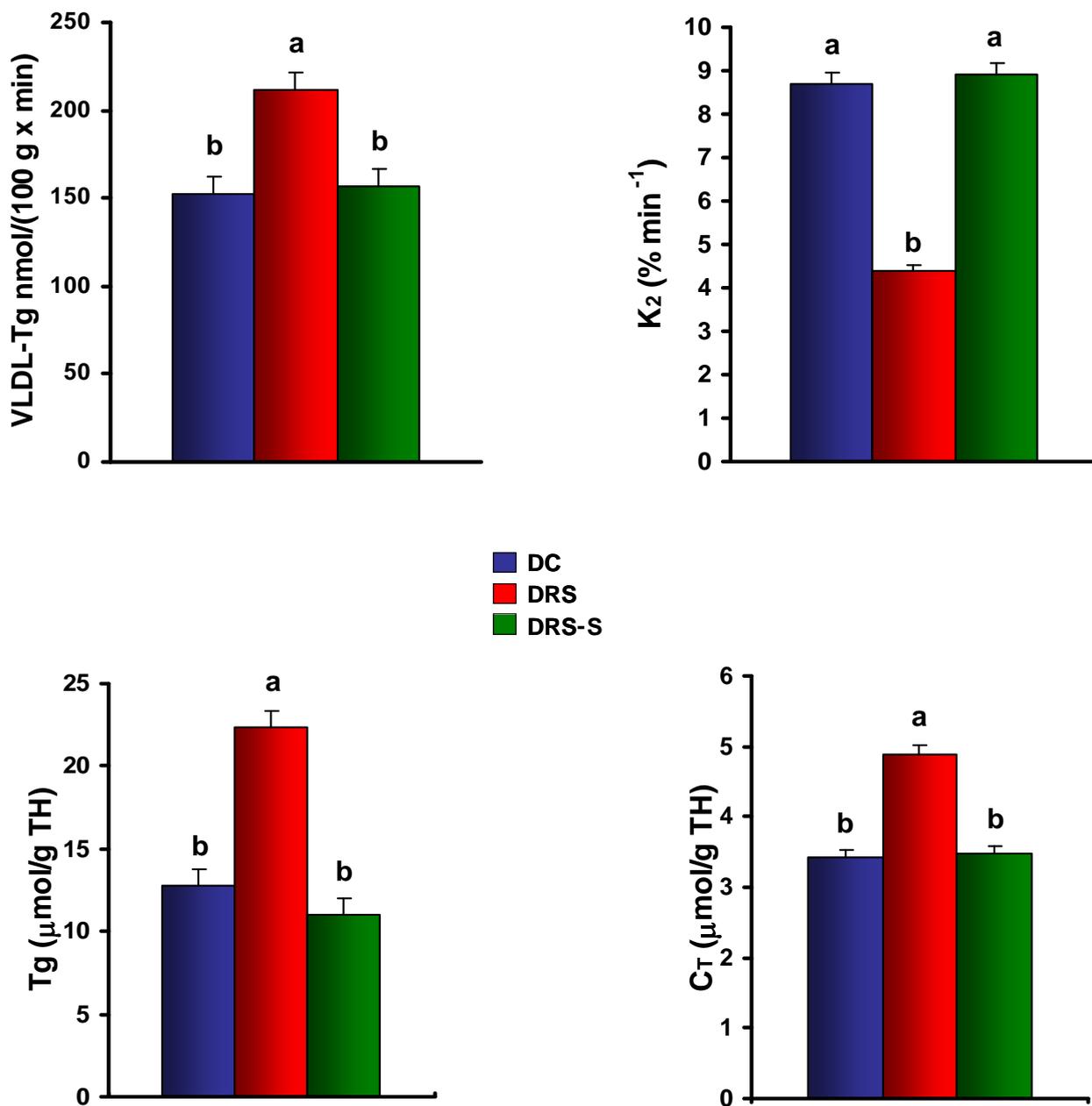


c) Velocidad de secreción de VLDL-Tg y remoción de Tg plasmáticos

La **Figura 13** muestra las velocidades de secreción hepática de VLDL-Tg y de remoción de Tg plasmáticos ($K_2\% \text{ min}^{-1}$) y los niveles de triglicéridos y colesterol hepático en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. El incremento observado en los triglicéridos plasmáticos de ratas dislipémicas (**Tabla 9**) se vio acompañado de una mayor velocidad de secreción de VLDL-Tg y una menor remoción de los Tg plasmáticos ($p < 0,05$). Además, el contenido de triglicéridos y colesterol hepático incrementaron significativamente en los animales con DRS ($p < 0,05$) comparados con sus respectivos controles etéreos alimentados con DC. Mediante la sustitución de la fuente proteica (caseína por proteína de soja aislada) la velocidad de secreción de VLDL-Tg y el contenido de triglicéridos y colesterol total hepático disminuyeron significativamente alcanzando valores similares al control, mientras que la remoción de Tg plasmáticos incrementó, igualando los valores observados en el grupo DC.



Figura 13. Velocidades de secreción hepática de VLDL-Tg y de remoción plasmática de Tg (K_2 % min^{-1}) y concentración de triglicéridos (Tg) y colesterol total (C_T) hepáticos en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

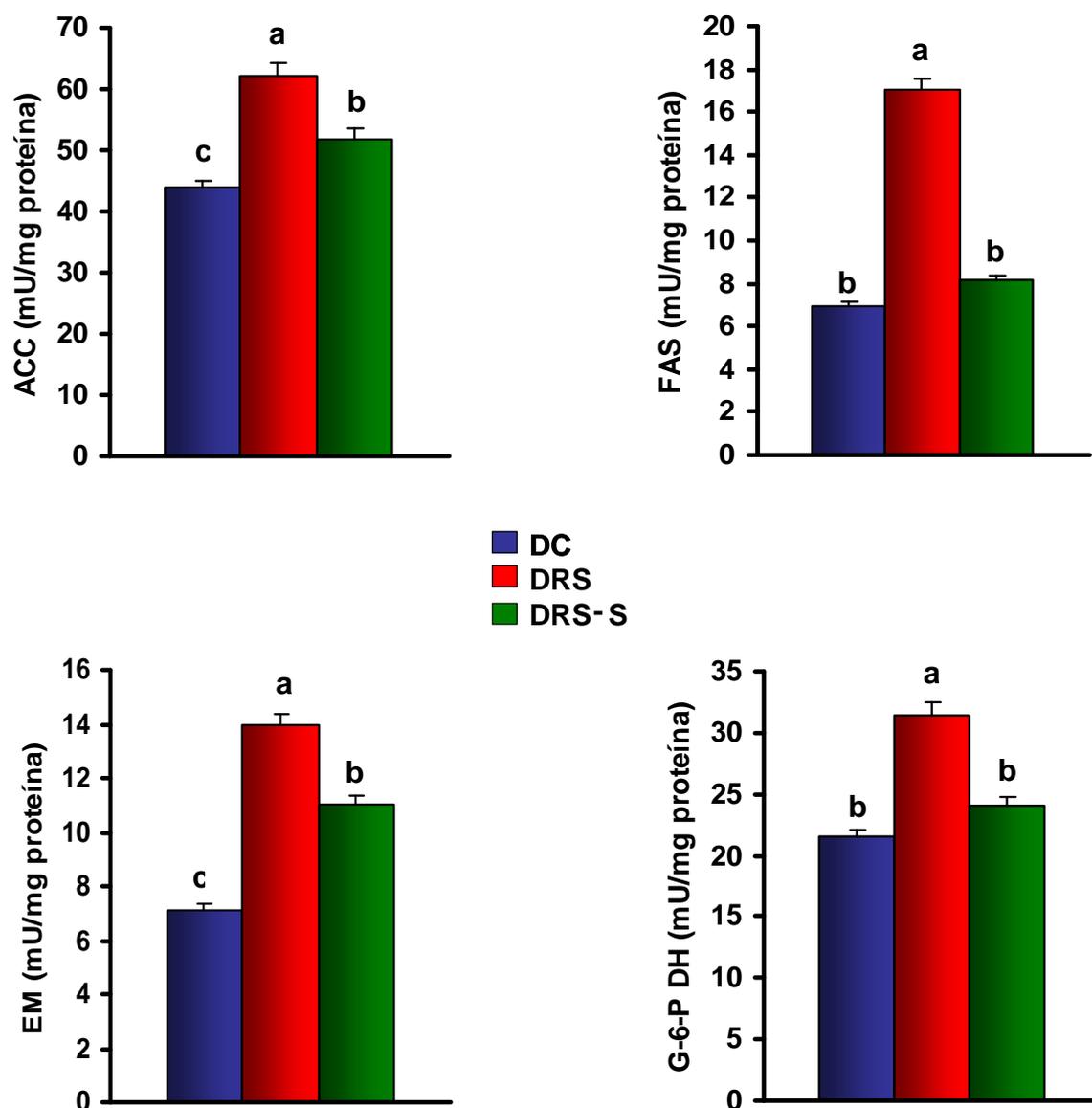


d) Actividades de enzimas involucradas en la lipogénesis

En la **Figura 14** se observan las actividades de enzimas involucradas en la síntesis “*de novo*” de ácidos grasos: acetil-CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-P DH). La DRS indujo en hígado, un incremento significativo de las actividades de las enzimas lipogénicas en comparación con animales alimentados con dieta control (DC), lo que condice con una inducción en la síntesis “*de novo*” de ácidos grasos. Cuando la proteína de soja aislada reemplazó a la caseína como fuente proteica dietaria, se normalizaron las actividades enzimáticas FAS y G-6-P DH alcanzando valores semejantes al grupo control; mientras que las actividades ACC y EM disminuyeron significativamente pero sin aún alcanzar los valores observados en los animales alimentados con DC.



Figura 14. Actividades de enzimas lipogénicas: ACC, FAS, EM y G-6-P DH en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S.¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

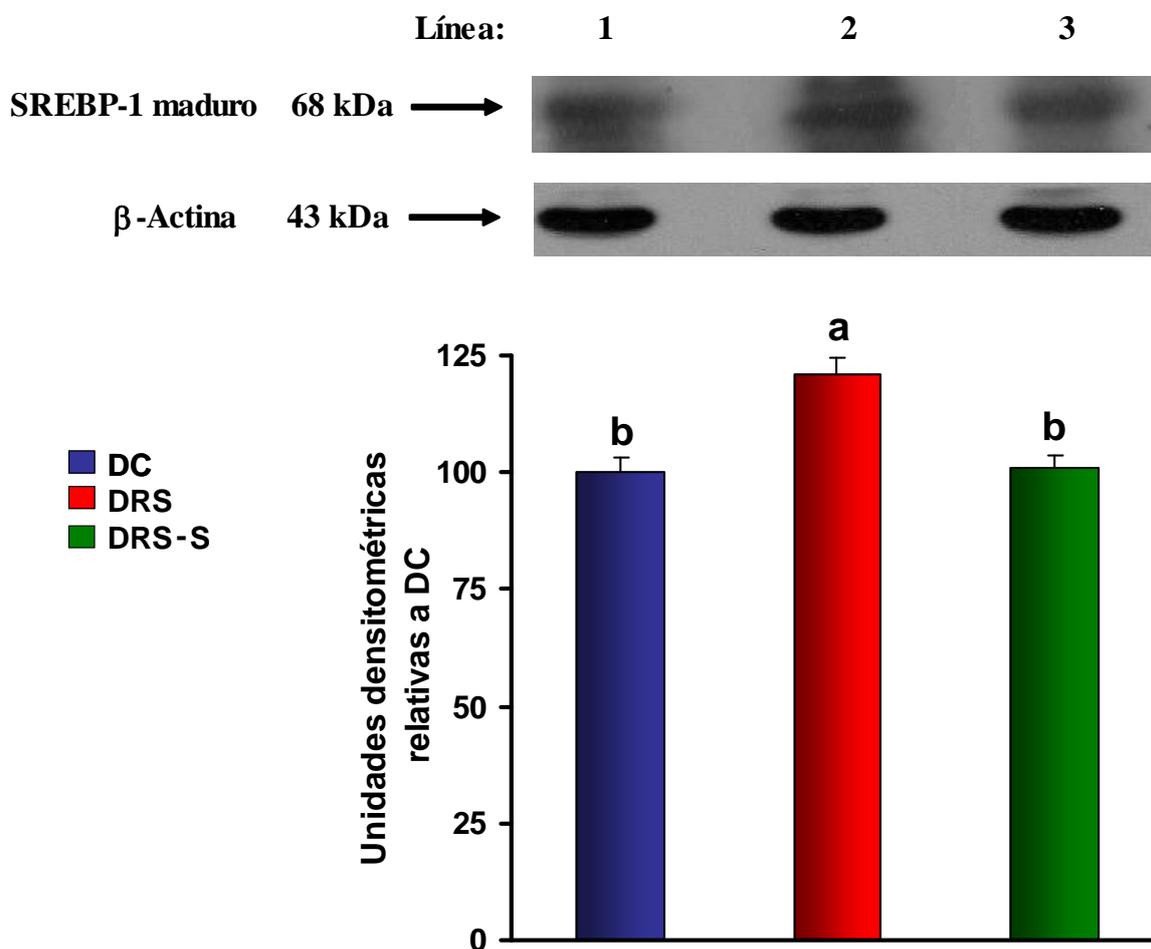


A partir de los resultados expuestos, nos interesó analizar el efecto de la administración crónica de una DRS y la sustitución de la fuente proteica de la dieta (caseína por proteína de soja aislada) sobre el SREBP-1, factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión génica de las enzimas lipogénicas antes mencionadas.

e) Expresión de la masa proteica del factor de transcripción SREBP-1

La expresión de la masa proteica del SREBP-1 maduro fue cuantificada en los tres grupos experimentales. Al respecto, los animales alimentados con DRS presentaron un aumento significativo en la masa proteica del SREBP-1 respecto a los observados en los animales de igual sexo y edad alimentados con DC. La proteína de soja dietaria logró normalizar los niveles de la masa proteica de este factor de transcripción (**Figura 15**).

Figura 15. Expresión de la masa proteica del SREBP-1 en hígado de animales alimentados con DC, DRS o DRS-S. ¹

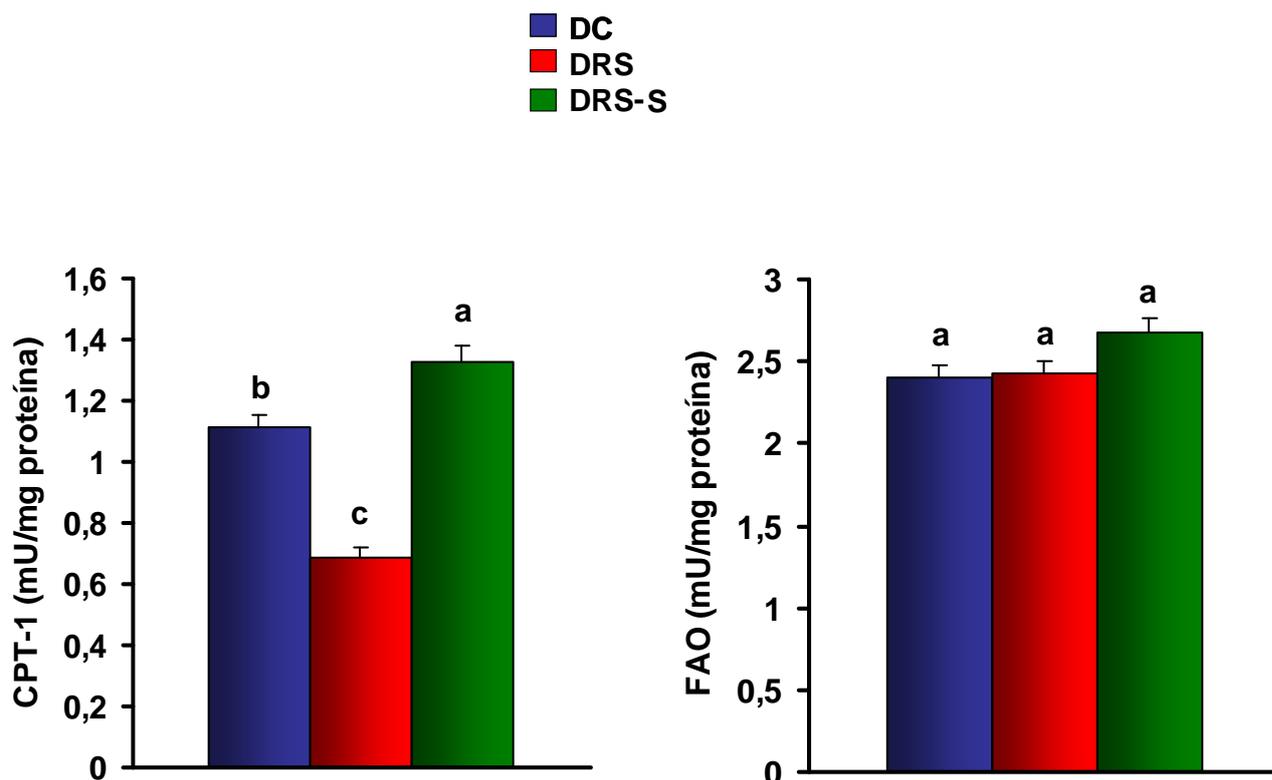


¹ *Panel superior:* Inmunoblots del SREBP-1 hepático y β -actina en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. Los marcadores moleculares se indica a la izquierda: Línea 1: DC; Línea 2: DRS y Línea 3: DRS-S. *Panel inferior:* Análisis densitométrico de la expresión de la masa proteica del SREBP-1c en tejido hepático. Los valores de la expresión de la masa proteica del SREBP-1 fueron corregidos por los niveles de β -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.

f) Actividades de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos

Al analizar las actividades de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos, observamos que los animales alimentados con DRS exhibieron una actividad CPT-1 significativamente menor ($p < 0,05$) respecto a los animales que recibieron dieta control (**Figura 16**). La administración de DRS-S incrementó ($p < 0,05$) la actividad CPT-1 significativamente en comparación con los grupos DC y DRS. Con respecto a la FAO, se pudo observar que no existen diferencias significativas entre los animales alimentados con DC y con DRS, mientras que hay un ligero incremento en la actividad de esta enzima en los animales alimentados con DRS-S aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Figura 16. Actividades de las enzimas CPT-1 y FAO en animales alimentados con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

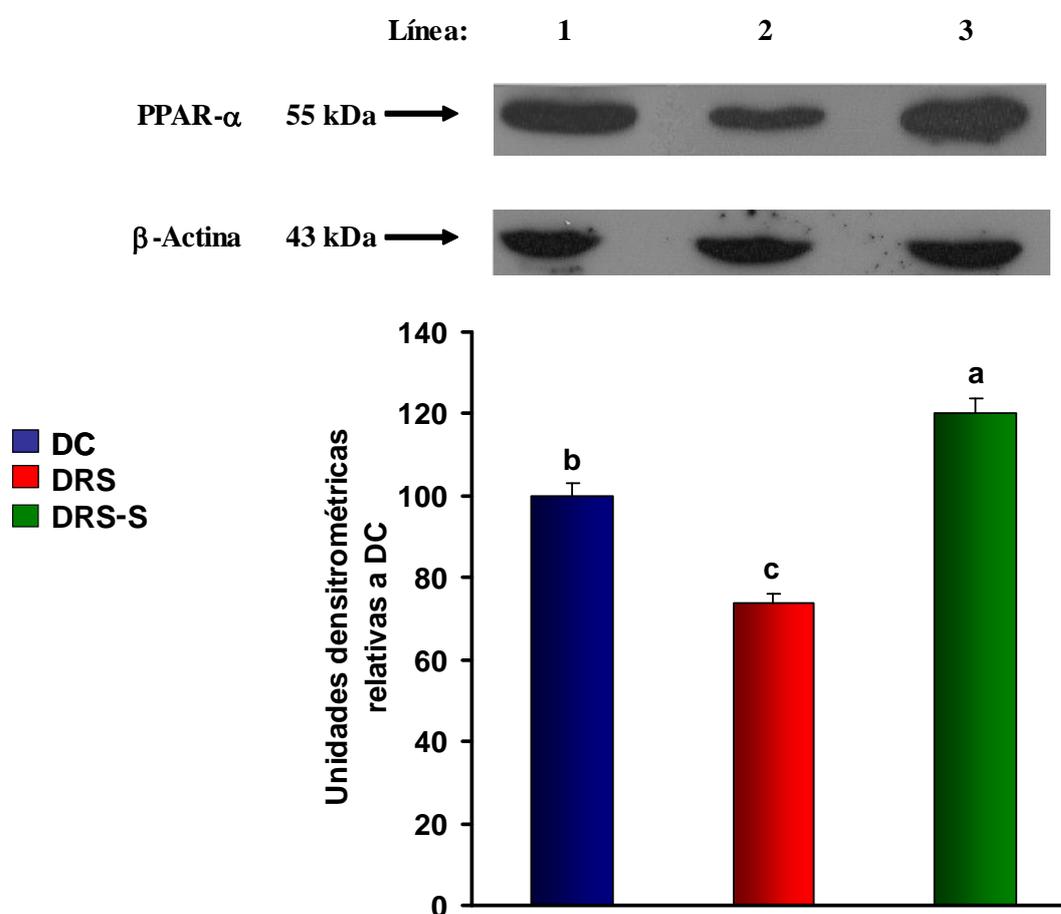


g) Expresión de la masa proteica del factor de transcripción PPAR- α

El PPAR- α se encuentra involucrado en la regulación de la expresión génica de enzimas de la oxidación de ácidos grasos (CPT-1 – FAO).

En la **Figura 17** observamos que los animales alimentados con DRS presentaron una disminución significativa de la expresión de la masa proteica del PPAR- α respecto a los animales controles, mientras que con el reemplazo de la fuente proteica (caseína por proteína de soja) en los 4 últimos meses de ingesta, la expresión de la masa proteica del PPAR- α alcanzó niveles aún superiores a los observados en los animales alimentados con DC.

Figura 17. Expresión de la masa proteica del PPAR- α en hígado de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblots del PPAR- α hepático y β -actina en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S.

Los marcadores moleculares se indica a la izquierda: Línea 1: DC; Línea 2: DRS y Línea 3: DRS-S.

Panel inferior: Análisis densitométrico de la expresión de la masa proteica del PPAR- α en tejido hepático.

Los valores de la expresión de la masa proteica del PPAR- α fueron corregidos por los niveles de β -actina presentes en cada una de las muestras. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.



DISCUSIÓN PARTE 2

Los resultados alcanzados al presente demuestran algunos mecanismos involucrados en los efectos beneficiosos de la proteína de soja aislada - administrada en reemplazo de la caseína como fuente proteica en una dieta rica en sacarosa - sobre la dislipemia, el incremento de peso corporal, la adiposidad visceral y la moderada hiperglucemia basal inducida crónicamente por dicha dieta en este modelo nutricional experimental. Los hallazgos más importantes fueron: **a)** La proteína de soja previno el incremento de peso corporal, limitando la adiposidad visceral. **b)** Redujo marcadamente la incrementada secreción hepática de VLDL-Tg, aumentando su remoción plasmática, conduciendo a una normalización de los niveles de Tg plasmáticos. Más aún, tanto los niveles de colesterol y AGNE plasmáticos retornaron a valores normales semejantes a los observados en los animales controles cuando la proteína de soja aislada reemplazó a la caseína presente en la DRS durante los últimos 4 meses de ingesta. La administración de proteína de soja aislada fue capaz de revertir la esteatosis hepática. **c)** Las incrementadas actividades de las enzimas claves de la lipogénesis observada en los animales alimentados con DRS fueron normalizadas o mejoradas bajo la administración de proteína de soja dietaria. Esto se acompañó de un decrecimiento de la expresión de la masa proteica del SREBP-1, el que alcanzó valores semejantes a los observados en los animales controles. **d)** Por otro lado, la proteína de soja incrementó la actividad CPT-1, esta enzima que es activada por el PPAR- α controla la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria para su posterior oxidación. Bajo estas condiciones experimentales, también se observó un incremento significativo de la expresión de la masa proteica del PPAR- α . **e)** La sustitución dietaria de caseína por proteína de soja normalizó la moderada hiperglucemia (los niveles de glucemia basal alcanzaron valores semejantes a los del grupo control) sin cambios en la insulinemia (Oliva y col., 2009; Oliva y col., 2010).

Mediante la sustitución de la fuente proteica dietaria (caseína de origen animal por proteína de soja aislada de origen vegetal) durante los últimos 4 meses de la administración de una DRS, la ingesta calórica y el peso corporal alcanzaron valores similares a los del grupo control (DC). Esto se acompañó de una reducción de aproximadamente el 18% del peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal y un decrecimiento del contenido de grasa y peso de la carcasa del 11 y 30% respectivamente. Diferentes estudios sugieren que el consumo de proteína de soja tiene efectos beneficiosos sobre la obesidad (para revisión Velasquez y Bathena, 2007).

La proteína de soja contiene muchos componentes bioactivos o nutrientes que pueden tener múltiples mecanismos de acción, por lo tanto, en los ensayos de intervención nutricional es difícil



separar los efectos de cada componente en particular sobre el peso corporal y la reducción de la ingesta de alimentos. Al respecto, Banz y col. (2004) observaron en ratas Zucker diabéticas obesas que la administración de proteína de soja rica en isoflavonas reducía la grasa visceral, mientras que Takahashi y col. (2009) no encontraron diferencias significativas en el peso corporal y la grasa visceral en ratas alimentadas con proteína de soja en ausencia o presencia de isoflavonas.

Algunos investigadores identificaron varios péptidos con propiedades anorexígenas en la soja. Yoshikawa y col. (1999), encontraron que un fragmento del péptido glicinina de la proteína de soja, Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg, posee actividad hipocolesterolemica y además, debido a su homología estructural con enterostatina, tiene actividad anorexígena favoreciendo la disminución de la ingesta de alimentos. Además, Takenaka y col. (2000) encontraron que un péptido presente en la subunidad A₅A₄B₃ de la glicinina tiene actividad hipocolesterolemica y anorexígena.

El sistema endocrino-intestinal juega un papel importante en la regulación de la ingesta y el peso corporal, y un número de señales hormonales derivadas del intestino han sido caracterizadas. Entre ellas, la colecistoquinina (CCK), la cual es una hormona intestinal producida por las células enteroendocrinas llamadas “células I” y liberada desde el duodeno hacia el torrente sanguíneo. Estudios farmacológicos han demostrado que la CCK suprime la ingesta de alimentos por inducción de sensación de saciedad a corto plazo y por reducción del vaciamiento gástrico, por lo cual es considerada un mediador fisiológico importante que actúa como una señal de saciedad a corto plazo (Moran y col., 1992).

Si bien en el presente estudio no analizamos los mecanismos que subyacen en la reducción de la ingesta calórica observada en los animales alimentados con DRS-S en comparación a los que ingirieron DRS, trabajos recientes de Nishi y col. (2003) han observado en ratas que la proteína de soja y sus hidrolizados estimulan la secreción de CCK por reacción directa sobre las células de la mucosa intestinal. Por ejemplo, se ha demostrado que la β -conglucininina - la principal proteína de la soja - reduce la ingesta de alimentos de una manera dependiente de CCK y que la inhibición del vaciamiento gástrico esta asociada con esta supresión. Además, se ha visto, que los péptidos de β -conglucininina se unen directamente a componentes de la membrana de las células intestinales, estimulando la liberación de CCK desde las células, lo cual conduce a la supresión de la ingesta de alimentos vía los receptores de CCK periféricos (Nishi y col., 2001).

Otros posibles mecanismos involucrados en los efectos favorables de la proteína de soja dietaria sobre la obesidad incluyen los estudios realizados por Torre-Villalvazo y col. (2008) quienes demostraron en ratas Sprague Dawley alimentadas durante 180 días con dieta rica en grasa,



en la cual la caseína fue reemplazada por proteína de soja, un aumento en la expresión génica de la proteína desacoplante-1 (UCP-1) en tejido adiposo marrón, observando una mayor capacidad termogénica que se reflejó en la reducción de grasa corporal en comparación con los animales de igual sexo y edad en los cuales la fuente proteica dietaria fue la caseína. Iritani y col. (1996) constataron en ratas Wistar obesas (fa/fa) alimentadas con una dieta que contenía 5% de aceite de maíz, caseína o proteína de soja como fuente proteica durante 3 semanas, que los animales alimentados con proteína de soja mostraron un aumento significativo de los niveles de conversión de tiroxina a triiodotironina en los microsomas hepáticos, de esta manera se incrementaba la producción de triiodotironina, sugiriendo un mecanismo que favorecería la reducción del peso corporal en las ratas obesas. Más aún, Tovar y col. (2005) demostraron que la proteína de soja fue capaz de reducir la expresión génica del SREBP-1 en adipocitos de ratas ZDF fa/fa previniendo su hipertrofia. Es posible que el/los mecanismos anteriormente mencionados, estén involucrados en la reducción de la ingesta calórica contribuyendo a la disminución de la adiposidad visceral, el peso corporal y el contenido lipídico de la carcasa cuando se reemplazó la caseína por proteína de soja aislada en las ratas alimentadas crónicamente con DRS (Oliva y col., 2010).

Confirmando estudios previos del grupo (Chicco y col., 2000; Fortino y col., 2007; Lombardo y col., 2007) en los animales alimentados crónicamente con una dieta rica en sacarosa se constató un incremento en la secreción de VLDL-Tg y una defectuosa remoción de triglicéridos plasmáticos, acompañado de un mayor contenido hepático de triglicéridos (esteatosis) e hipertrigliceridemia. En el presente trabajo demostramos que la sustitución de caseína por proteína de soja en la DRS durante los 4 últimos meses de experimentación juega un rol importante en los cambios observados en el metabolismo lipídico y niveles de glucemia. La velocidad de secreción de VLDL-Tg y el contenido hepático de triglicéridos y colesterol fueron completamente normalizados. Además la adición de proteína de soja aislada disminuyó la excesiva disponibilidad de AGNE plasmáticos presente en los animales alimentados con DRS provenientes de una incrementada lipólisis basal (Selenscig y col., 2010). Esto contribuyó a decrecer la síntesis y secreción de VLDL-Tg limitando la formación de partículas de LDL y por lo tanto reduciendo los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol. En este contexto, la glucemia basal también alcanzó valores semejantes a los animales alimentados con DC (Oliva y col., 2009).

En un trabajo reciente, Tovar y col. (2005) mostraron en ratas Zucker fa/fa alimentadas con dieta control con proteína de soja como fuente proteica durante 160 días una marcada reducción de los niveles de colesterol sérico que se asoció con una estimulación de la síntesis de ácidos biliares posiblemente a través de la inducción de la enzima colesterol-7 α -hidroxilasa 1 comparadas con



aquellas que recibieron caseína. En línea con nuestros resultados, estudios “in vivo” de Sugano y col. (1982) en ratas alimentadas por un período corto de tiempo (4 semanas) con DRS donde la fuente proteica fue la proteína de soja, observaron un decrecimiento de la secreción hepática de Tg y colesterol cuando se las comparó con animales que recibieron DRS donde la caseína fue utilizada como proteína dietaria. Pfeuffer y Barth, (1992) demostraron en ratas normales alimentadas con DRS durante 7 semanas, que la concentración de colesterol plasmático y la velocidad de secreción de Tg fueron sensiblemente menores cuando la proteína de soja, en comparación con la caseína, fue utilizada como fuente proteica.

La reversión de la dislipemia sugiere que la principal acción de la proteína de soja en el metabolismo lipídico hepático está relacionada con un cambio en el destino metabólico: síntesis y almacenamiento de lípidos a oxidación y que ambos mecanismos contribuirían al efecto hipolipemiante de la proteína de soja. Los resultados obtenidos se orientan hacia esta dirección ya que la administración de proteína de soja a la DRS fue capaz de disminuir no solo las incrementadas actividades de las enzimas lipogénicas ACC, FAS, EM y G-6-P DH sino también la expresión de la masa proteica del SREBP-1, incrementando al mismo tiempo la expresión de la masa proteica del PPAR- α y la actividad de enzimas blanco (CPT-1 y FAO), favoreciendo a nivel hepático la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos. Similarmente, Iritani y col. (1996) observaron en ratas Wistar obesas (fa/fa) que la administración de proteína de soja como fuente proteica dietaria durante 3 semanas redujo los niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos, asociado a una menor actividad y expresión de las enzimas lipogénicas claves (ACC, FAS, EM y G-6-P DH). Tovar y col. (2005) demostraron en ratas machos Zucker (fa/fa) alimentadas por 160 días con una dieta conteniendo proteína de soja, una disminución en la expresión ARNm del SREBP-1 hepático y de numerosas enzimas blanco como FAS, esteroil CoA desaturasa 1 y $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas, decreciendo la lipogénesis. En el mismo sentido, Ascencio y col. (2004) observaron en ratas Wistar normales una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos y hepáticos, así como en la expresión de las enzimas lipogénicas (FAS y EM) y la proteína de unión al elemento receptor de esteroides, SREBP-1. En estos animales la proteína de soja reemplazó a la caseína como fuente proteica dietaria durante 150 días. Torres-Villalvazo y col. (2008) observaron también en ratas Sprague Dawley alimentadas con dieta rica en grasa durante 6 meses un decrecimiento de la expresión génica del SREBP-1 y una menor deposición lipídica hepática cuando la fuente proteica dietaria administrada fue la proteína de soja en lugar de caseína.

Un trabajo reciente de Hegarty y col. (2005) postularon que el receptor LXR- α estaría probablemente relacionado en los mecanismos por los cuales la proteína de soja reduce la síntesis



de ácidos grasos y colesterol. Ellos demostraron que el LXR- α induce la expresión del ARNm del SREBP-1c, utilizando un agonista específico del LXR (TO- 901317).

Por otra parte, el/los mecanismos fisiológicos por el cual la proteína de soja induce la activación del PPAR- α no están aún claros. Al respecto, Tovar y col. (2005) observaron un incremento en la expresión génica de la enzima CPT-1 y del PPAR- α , acompañado de una reducción del contenido de lípidos hepáticos en ratas Zucker fa/fa alimentadas con proteína de soja aislada. Estos hallazgos sugieren que un incremento en la oxidación de ácidos grasos contribuiría a la disminución del contenido de lípidos hepáticos en este modelo experimental. Además, Ronis y col. (2009) demostraron en ratas Sprague Dawley alimentadas durante 14 días con una dieta AIN-93G un incremento significativo en la expresión del ARNm de la CPT-1 y del PPAR- α en los animales que recibieron proteína de soja aislada como fuente proteica comparados con los animales alimentados con caseína. El factor de transcripción PPAR- α es activado por ligandos tales como: ácidos grasos, fibratos e isoflavonas, lo que también indicaría que otros componentes fuertemente asociados con la proteína de soja como son las isoflavonas podrían jugar un rol importante en el metabolismo lipídico (Mezei y col., 2003). Al respecto, Kim y col. (2004) demostraron en células HepG2 que la genisteína – una de las principales isoflavonas de la proteína de soja - incrementó la expresión génica de la CPT-1 hepática y que dicha expresión no fue modificada por la presencia de ICI 182780 un potente inhibidor del receptor de estrógenos, sugiriendo que el efecto de la genisteína era independiente de este receptor. Además, la genisteína indujo la expresión del ARNm del PPAR- α y sus niveles de proteínas sugiriendo que la genisteína podría ser un ligando potencial del PPAR- α . Nuestros resultados concuerdan con los conceptos mencionados anteriormente, ya que en los animales alimentados con DRS la administración de proteína de soja indujo un incremento de la expresión de la masa proteica del PPAR- α y de la actividad de las enzimas CPT-1 y FAO.

En relación a los cambios inducidos por las isoflavonas se ha constatado también que las mismas presentan un efecto hipotrigliceridémico, debido principalmente a su estructura similar a los estrógenos endógenos (Setchell y Cassidy, 1999). Demonty y col. (2002) han demostrado en ratas Sprague Dawley alimentadas con dietas conteniendo 20% de proteínas (proteína de soja aislada, caseína o caseína con agregado de isoflavonas: genisteína y daidzeína), una disminución de los triglicéridos plasmáticos. Esto fue observado tanto en ratas alimentadas con proteína de soja aislada como con isoflavonas, demostrando que la adición de isoflavonas a la dieta con caseína reprodujo el efecto hipotrigliceridémico de la proteína de soja aislada, sugiriendo que las isoflavonas podrían ser responsables, al menos en parte, del efecto hipocolesterolémico de la proteína de soja. Peluso y col. (2000) demostraron en ratas Zucker (fa/fa) alimentadas con tres tipos de dieta: caseína, proteína de



soja pobre en isoflavonas y proteína de soja rica en isoflavonas, una disminución de los lípidos plasmáticos y hepáticos en las ratas alimentadas con proteína de soja, pobre o rica en isoflavonas, proponiendo que el efecto hipolipidémico de la proteína de soja podría ser causado por una interacción cooperativa entre los componentes proteicos y las isoflavonas. La proteína de soja aislada utilizada en nuestro diseño experimental contiene isoflavonas (97 mg de isoflavonas totales por 100 g de proteína comestible) por lo que no podemos descartar la contribución de las mismas en la normalización de la dislipemia en los animales alimentados crónicamente con DRS.

Otros componentes de la proteína de soja podrían también estar involucrados en la regulación del metabolismo lipídico. Al respecto, diferentes estudios han observado que las saponinas, inhibidores de tripsina y ácido fítico ejercerían mediante diferentes mecanismos un efecto hipocolesterolémico (Lin y col., 2005; Potter, 1995; Erdman, 2000; Zhou y Erdman, 1995; Oakenfull, 2001).

La administración de proteína de soja normalizó en animales alimentados con DRS los moderadamente elevados niveles de glucemia basal sin modificar la insulinemia. En esta dirección, Lavigne y col. (2000) demostraron un decrecimiento de la glucemia en ayunas en ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con proteína de soja cuando se las comparó con un grupo de animales de igual sexo y edad en donde la caseína se utilizó como fuente proteica. Más aún, luego de una sobrecarga endovenosa de glucosa, el área bajo la curva (niveles de glucemia) fue menor en los animales alimentados con proteína de soja, mejorando también la sensibilidad insulínica. Ascencio y col. (2004) observaron en ratas alimentadas con dieta rica en grasa donde la fuente proteica fue soja niveles normales de insulina plasmática y de glucemia.

La composición aminoacídica de la proteína de soja parece también jugar un rol en el metabolismo lipídico y en la homeostasis de la glucosa, ya que la misma a diferencia de la caseína, presenta una alta relación arginina/lisina que induce un incremento en los niveles séricos de glucagon (Torres y col., 2006). De aquí, que la capacidad de la proteína de soja de regular la relación I/G podría deberse a su composición en aminoácidos (Tovar y col., 2002; Torres y col., 2006; Sanchez y Hubbard, 1991; Calbet y MacLean, 2002). Se sugiere también que las diferencias en el patrón de aminoácidos estarían involucradas en la regulación del SREBP-1c y por ende, en la regulación de la lipogénesis (Shukla y col., 2007).



En conclusión, hemos podido constatar en los animales dislipémicos, insulino resistentes alimentados con una DRS, que la sustitución de la fuente proteica (caseína por proteína de soja) condujo a la reversión de la dislipemia y mejoramiento de la adiposidad visceral. Los presentes datos sugieren que entre otros, un posible mecanismo/mecanismos relacionado con este proceso involucra la reducción de la biosíntesis hepática de triglicéridos a través de una “down regulation” de la masa proteica del SREBP-1, el decrecimiento de las enzimas blanco de la lipogénesis y una menor disponibilidad de AGNE plasmáticos. Esto se acompañó de un incremento en la oxidación hepática de ácidos grasos (mayor actividad CPT-1 y FAO) a través de una “up regulation” de la masa proteica del factor de transcripción PPAR- α . Sin embargo, no podemos descartar que la reducción de la ingesta calórica podría contribuir en si misma a algunos de los efectos mencionados anteriormente.

Además, la normalización de los niveles de glucemia basal sin cambios en la insulinemia nos condujo a analizar el posible efecto beneficioso de la proteína de soja sobre la sensibilidad insulínica periférica global; así como aspectos relacionados con las vías oxidativa y no oxidativa de la glucosa en músculo esquelético (mayor sitio de utilización de la glucosa bajo el estímulo de la insulina).



PARTE 3: EFECTOS DE LA PROTEÍNA DE SOJA SOBRE LA SENSIBILIDAD INSULÍNICA PERIFÉRICA GLOBAL. UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA EN EL MÚSCULO GASTRONEMIO

Como mencionamos en la “Introducción”, ratas normales alimentadas en forma crónica con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan moderada hiperglucemia y una marcada resistencia insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulínica), sin cambios en los niveles basales de insulina plasmática. La resistencia insulínica está fuertemente correlacionada con el aumento de los niveles de AGNE y Tg en plasma, y el acumulo de triglicéridos musculares, aspectos presentes en los animales alimentados crónicamente con DRS.

De acuerdo a los resultados y conclusiones expuestas en la Parte 2 de esta tesis y siendo el músculo esquelético un organo clave en el metabolismo de la glucosa bajo la acción insulínica, el **tercer objetivo específico** fue analizar en dicho tejido - en condiciones basales y al finalizar la clamp euglucémica-hiperinsulínica - en los animales en los cuales la proteína de soja reemplazó a la caseína como fuente proteica dietaria: **1)** vía oxidativa de la glucosa [estimada por la actividad del complejo enzimático piruvato dehidrogenasa (PDHc)], contenido de triglicéridos y vía no oxidativa: contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato; **2)** actividad de la enzima hexoquinasa y la expresión de la masa proteica del transportador de glucosa Glut-4.

Para lograr estos objetivos, se alimentaron ratas normales con DRS durante 4 meses. Al finalizar este período, a la mitad de los animales se les sustituyó isocalóricamente la fuente proteica (caseína) por proteína de soja aislada durante 4 meses adicionales. Los animales controles recibieron durante los 8 meses una dieta control (DC). Más detalles de los grupos de animales y componentes de las dietas fueron descriptos en “Materiales y Métodos”.

Los resultados alcanzados al final del período experimental fueron los siguientes:



a) Estudio de la sensibilidad insulínica periférica global: velocidad de infusión de glucosa (VIG)

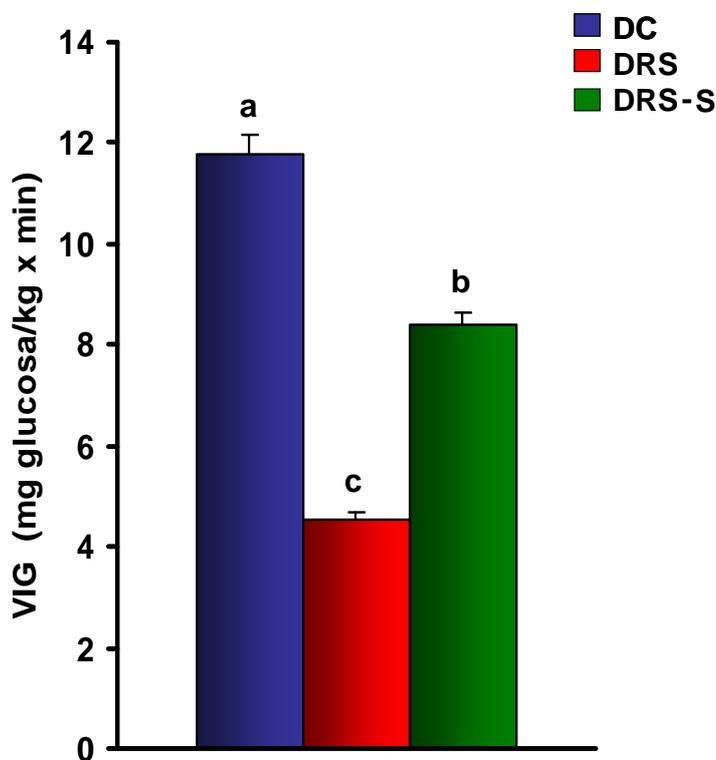
Al comienzo de la clamp (tiempo 0 o basal después de 5 horas de ayuno) los niveles de glucemia fueron (mM) media \pm SEM, (n=6): DC: $5,85 \pm 0,15$; DRS: $7,87 \pm 0,12$; DRS-S: $6,10 \pm 0,22$ ($p < 0,05$) DRS vs. DC y DRS-S. Los niveles plasmáticos de insulina obtenidos en estas condiciones fueron similares a aquellos observados al final del período de oscuridad (datos no mostrados).

En el estado estacionario, la VIG fue significativamente inferior en los animales alimentados con DRS en comparación con aquellos de igual sexo y edad alimentados con DC. Estos resultados demuestran un importante deterioro de la sensibilidad insulínica periférica global inducida por la administración crónica de DRS, corroborando resultados previamente demostrados (Chicco y col., 2003).

Al sustituir la fuente proteica caseína por proteína de soja aislada, pudimos observar que la administración de esta última mejora sensiblemente la resistencia insulínica periférica global presente en el grupo con DRS, pero sin alcanzar aún los niveles observados los animales controles (**Figura 18**).



Figura 18. Velocidad de infusión de glucosa (VIG) en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹



	DC	DRS	DRS-S
Glucosa (mmol/l)	5,70 ± 0,24	5,90 ± 0,29	5,98 ± 0,06
Insulina (μU/ml)	702 ± 39	762 ± 36	716 ± 35

¹ Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls. Glucosa e insulina: los valores representan los niveles alcanzados en el estado estacionario durante los últimos 60 minutos de la clamp euglicémica-hiperinsulinémica.



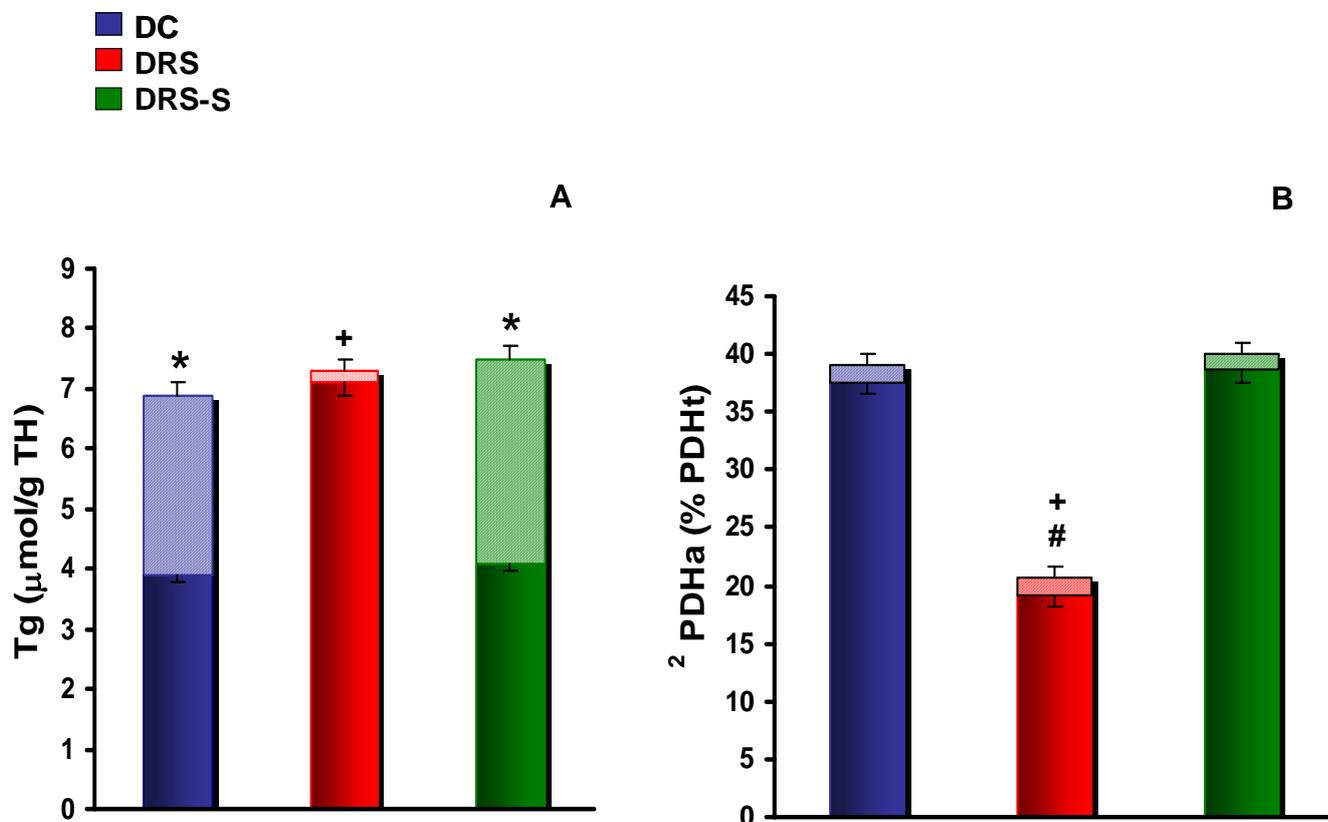
b) Vía oxidativa de la glucosa y contenido de triglicéridos (Tg) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica

Al comienzo (0 minutos) de la clamp las ratas alimentadas con DRS mostraron un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de Tg en el músculo gastronemio (**Figura 19A**), y un significativo descenso de la actividad del complejo piruvato dehidrogenasa en su forma activa (PDHa) comparado con el grupo que recibió DC ($p < 0,05$) (**Figura 19B**). Cuando la fuente proteica en el grupo DRS fue reemplazada por proteína de soja aislada, tanto el contenido de Tg (**Figura 19A**) como la actividad del complejo PDH (PDHa) (**Figura 19B**) alcanzaron los niveles observados en los animales de igual sexo y edad alimentados con DC.

Al finalizar la clamp euglucémica-hiperinsulinémica (120 minutos), el contenido de Tg (**Figura 19A**) alcanzó valores similares en todos los grupos dietarios. Sin embargo, este incremento fue de un 70-80% tanto en el grupo control como en grupo DRS-S, mientras que solo un 6% para el grupo DRS cuando se los comparó con los resultados obtenidos al comienzo de la clamp. En los tres grupos dietarios no se observaron cambios en la actividad PDHa (**Figura 19B**). En ambas condiciones experimentales la actividad total del complejo (PDHt) no se modificó en los 3 grupos dietarios.



Figura 19. Contenido de triglicéridos (Tg) y actividad PDHa al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglicémica-hiperinsulinémica en el músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ Los valores se expresan como media ± SEM, al inicio y al final de la clamp con al menos 6 animales en cada grupo experimental. (■) inicio (0 minutos) y (▣) final de la clamp (120 minutos).

* (p<0,05) DC y DRS-S 0 minutos vs. 120 minutos. ⁺ (p<0,05) DRS 0 minutos vs. DC y DRS-S 0 minutos.

[#] (p<0,05) DRS 120 minutos vs. DC y DRS-S 120 minutos.

² PDHa: forma activa del complejo PDH, expresada como porcentaje de la actividad total del PDHc (PDHa: actividad basal x 100/actividad total)



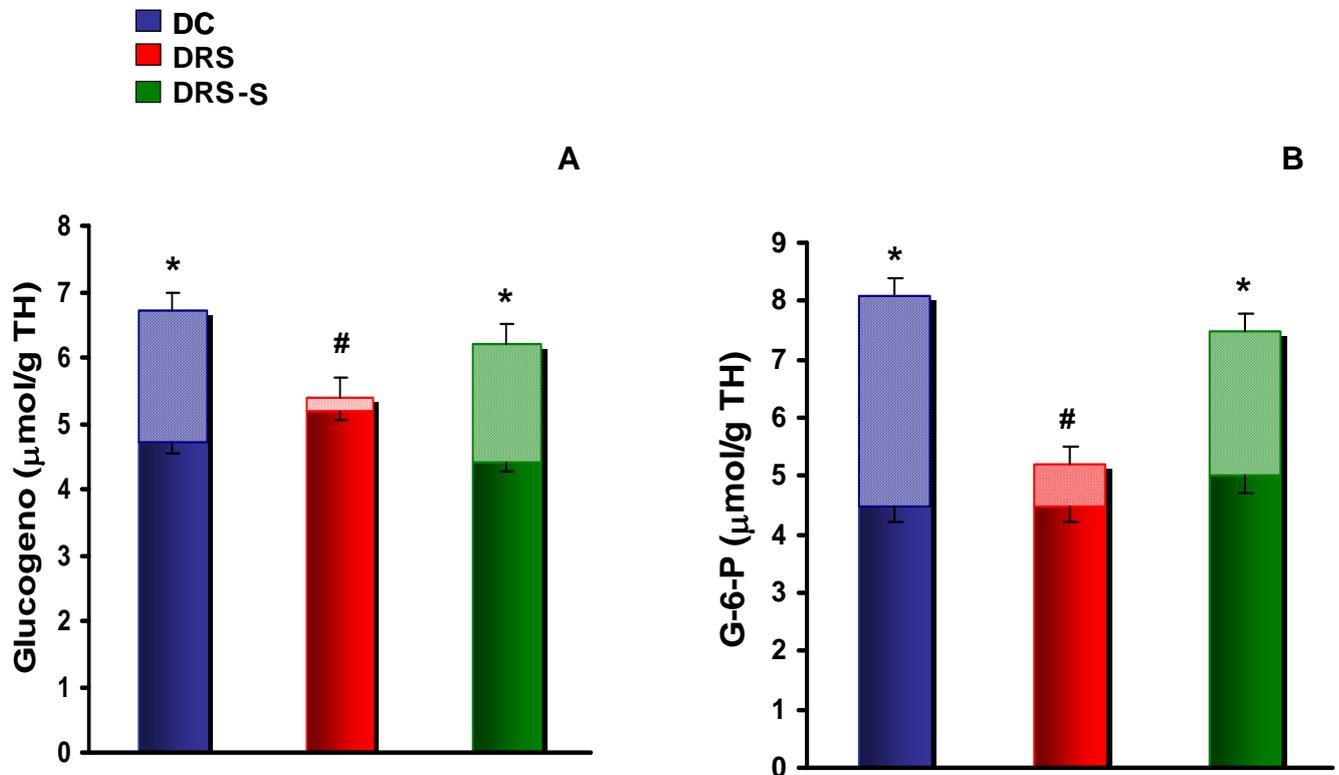
c) Vía no oxidativa de la glucosa: contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato (G-6-P) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica

Al inicio (0 minutos) de la clamp las ratas alimentadas con DRS o DRS-S no mostraron cambios en el contenido de glucógeno (**Figura 20A**) y G-6-P (**Figura 20B**) comparado con el grupo de igual sexo y edad alimentados con DC.

Al finalizar la clamp (120 minutos), bajo el estímulo de la insulina se observó un mayor contenido de glucógeno y G-6-P en el grupo DC. Sin embargo, ningún cambio significativo en estos parámetros fue observado en el grupo alimentado con DRS. Cuando la fuente proteica en la DRS (caseína) fue reemplazada por proteína de soja aislada en los últimos 4 meses del período experimental, el contenido de glucógeno y G-6-P bajo la acción insulínica fueron similares a los observados en los animales alimentados con DC (**Figura 20 A y B**).



Figura 20. Contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato (G-6-P) al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglicémica-hiperinsulinémica en músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM, al inicio y al final de la clamp con al menos 6 animales en cada grupo experimental. (■) inicio (0 minutos) y (▨) final de la clamp (120 minutos). * ($p < 0,05$) DC y DRS-S 0 minutos vs. 120 minutos; # ($p < 0,05$) DRS 120 minutos vs. DC y DRS-S 120 minutos.

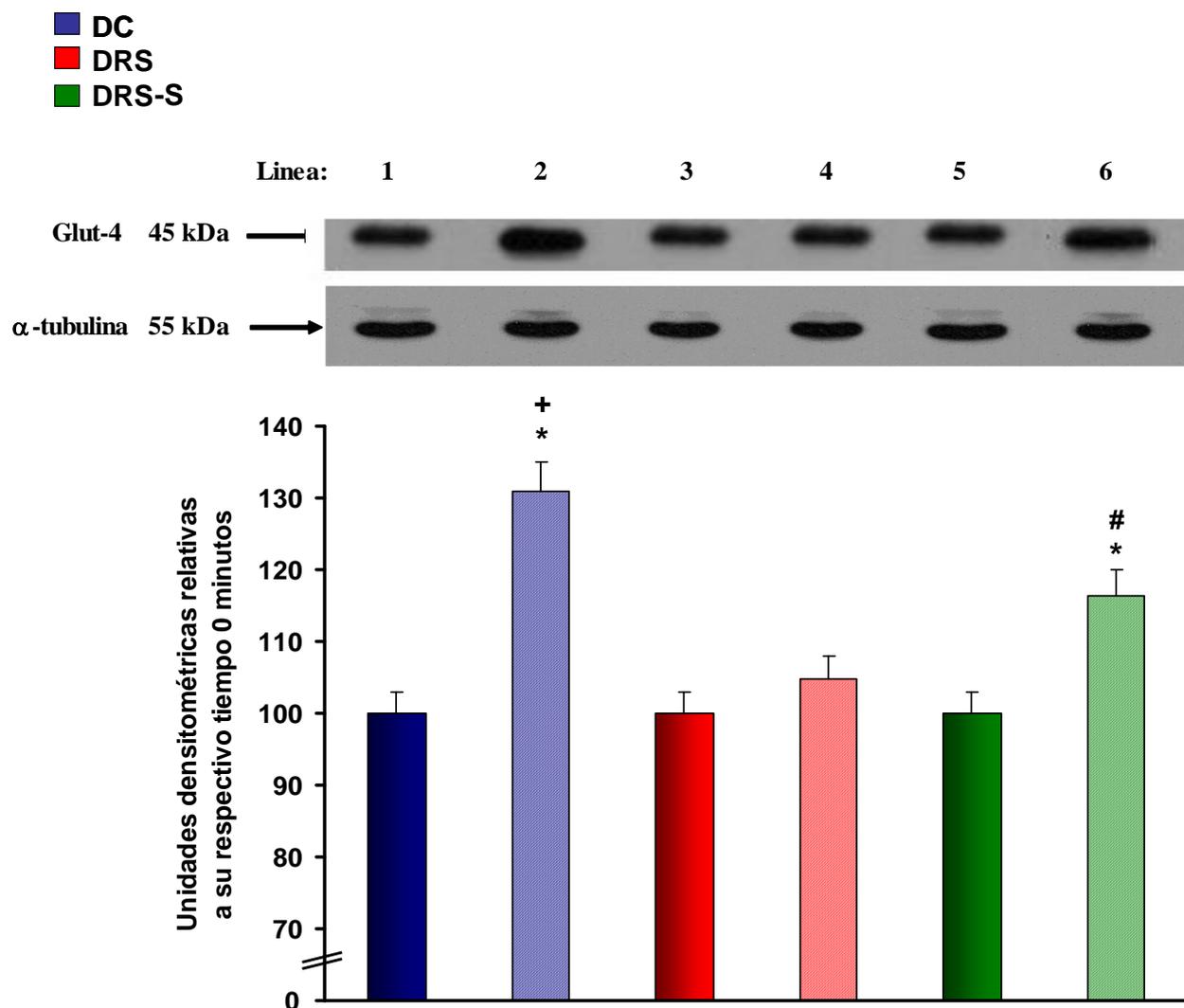


d) **Expresión de la masa proteica del transportador Glut-4 y actividad de la enzima hexoquinasa**

Al inicio (0 minutos) de la clamp las ratas alimentadas con DRS y DRS-S no mostraron cambios en la expresión de la masa proteica del Glut-4, respecto a los animales alimentados con DC.

Como era de esperar, frente al estímulo de la insulina (final de la clamp, 120 minutos) las ratas alimentadas con DC presentaron un aumento significativo ($\approx 31\%$) en la expresión de la masa proteica del Glut-4 con respecto a su nivel basal. Un comportamiento diferente se observó en las ratas alimentadas con DRS. En las mismas la hormona no estimuló la translocación del Glut-4. La sustitución de caseína por proteína de soja dietaria en las ratas alimentadas con DRS indujo un incremento ($\approx 16\%$) en la expresión de la masa proteica del Glut-4 frente al estímulo de la insulina, pero sin alcanzar los niveles observados en el grupo control (**Figura 21**).

Figura 21. Expresión de la masa proteica del Glut-4 al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (tiempo 120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en el músculo gastronemio de ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. ¹



¹ *Panel superior:* Immunoblots del Glut-4 y α -tubulina en músculo esquelético al inicio (tiempo 0 minutos) y al finalizar (120 minutos) la clamp euglucémica-hiperinsulinémica en ratas alimentadas con DC, DRS o DRS-S. Los marcadores moleculares se indican a la izquierda: Línea 1: DC 0 minutos; Línea 2: DC 120 minutos; Línea 3: DRS 0 minutos; Línea 4: DRS 120 minutos; Línea 5: DRS-S 0 minutos; Línea 6: DRS-S 120 minutos. *Panel inferior:* Análisis densitométrico de la expresión de la masa proteica del Glut-4 en músculo esquelético. Los valores de la expresión de la masa proteica del Glut-4 fueron corregidos por los niveles de α -tubulina presentes en cada una de las muestras. Los valores se expresan como media \pm SEM relativo a su respectivo tiempo inicial (0 minutos). Al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. (■) inicio (0 minutos) y (▣) final de la clamp (120 minutos). * ($p < 0,05$) DC y DRS-S 0 minutos vs. 120 minutos; + ($p < 0,05$) DC 120 minutos vs. DRS y DRS-S 120 minutos; # ($p < 0,05$) DRS-S 120 minutos vs. DRS 120 minutos.



Como se puede observar en la **Tabla 10**, la actividad de la enzima hexoquinasa citoplasmática se encuentra disminuida en los animales alimentados con DRS cuando se los compara con sus controles etéreos alimentados con DC. Cuando en la DRS se sustituyó la fuente proteica, caseína por proteína de soja, se observó un incremento significativo de la actividad de la enzima, pero sin alcanzar aún los niveles del grupo DC.

Tabla 10. Actividad hexoquinasa en músculo gastronemio de animales alimentados con DC, DRS o DRS-S. ¹

	DC	DRS	DRS-S
Hexoquinasa			
mU/mg proteína	42,80 ± 1,15^a	31,7 ± 2,50^c	37,62 ± 0,62^b

¹ Los valores se expresan como media ± SEM, al menos 6 animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores que no comparten las mismas letras supraescritas son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman Keuls.



DISCUSIÓN PARTE 3

En las ratas dislipemicas insulino resistentes en las cuales la proteína de soja aislada reemplazó a la caseína como fuente proteica dietaria se constató que: **a)** La glucemia basal retornó a valores normales, sin cambios en la insulinemia. Esto se acompañó de un sustancial mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica). **b)** En músculo esquelético se revirtió la alterada oxidación de glucosa (la actividad del complejo enzimático PDH alcanzó valores semejantes al grupo DC), disminuyó el incrementado contenido de Tg intramuscular en condiciones basales y su comportamiento bajo la acción insulínica fue similar a la del grupo control. **c)** Frente al estímulo de la insulina, normalizó los alterados niveles de glucógeno y glucosa-6-fosfato observados en los animales alimentados con DRS. **d)** Mejoró significativamente la actividad de la enzima hexoquinasa, aunque sin alcanzar los niveles observados en el grupo DC. **e)** La expresión de la masa proteica del Glut-4 en condiciones basales fue similar en los 3 grupos experimentales (DC, DRS, DRS-S). La insulina no estimuló la expresión de la masa proteica del transportador en los animales alimentados con DRS, en cambio bajo el estímulo de la hormona incrementó significativamente en el grupo DRS-S, aunque sin alcanzar los niveles del grupo DC.

Como mencionamos previamente en la “Introducción”, la administración crónica de DRS indujo un sensible deterioro de la sensibilidad insulínica periférica global (resistencia insulínica, VIG significativamente disminuida) acompañada de anormal homeostasis de la glucosa. La resistencia insulínica se encuentra fuertemente correlacionada con el incremento de AGNE y Tg plasmáticos y el contenido de Tg intramusculares. En el presente trabajo, la clamp euglucémica fue realizada utilizando niveles suprafisiológicos de insulina, lo que implica un estímulo muy importante (máximo) en la captación de glucosa estimulada por la hormona. Bajo estas condiciones experimentales, la alterada capacidad de oxidación de la glucosa – estimada por la actividad enzimática del complejo PDH – en condiciones basales y durante la clamp euglucémica-hiperinsulinémica, fue completamente normalizada cuando la proteína de soja aislada reemplazó a la caseína como fuente proteica dietaria. Además, la administración de proteína de soja normalizó el contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato estimulado por la insulina.

Como mencionamos anteriormente (Discusión Parte 2 de la presente tesis), los niveles AGNE plasmáticos retornaron a los valores observados en los animales controles (DC), esto indicaría una reducción en el flujo de este metabolito desde el tejido adiposo hacia tejidos no adiposos, incluyendo el músculo esquelético, principalmente por un mejoramiento en la sensibilidad



insulínica periférica global. Los presentes datos sugieren que el efecto hipolipemiante de la proteína de soja disminuye la disponibilidad de combustible lipídico en el músculo esquelético de ratas alimentadas con DRS, lo cual podría restaurar la oxidación de la glucosa y contribuir al mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica global. En esta línea, Lavigne y col. (2000) demostraron en ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con dietas isoenergéticas que contenían caseína o proteína de soja, que las ratas alimentadas con proteína de soja mostraron una mejora en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad insulínica periférica global con respecto a los animales alimentados con caseína. Más aún, en estos animales se constató un decrecimiento de los triglicéridos plasmáticos. Cederroth y col. (2008) administraron a ratones machos CD1 durante 3 semanas dietas isocalóricas con proteína de soja o caseína como fuente proteica. La dieta con proteína de soja contenía isoflavonas (daidzeína y genisteína). Los animales alimentados con esta última dieta, presentaron un significativo incremento en la sensibilidad insulínica periférica global acompañada por una mayor captación de glucosa por el músculo esquelético. Iritani y col. (1997) observaron en ratas Wistar fa/fa alimentadas con una dieta rica en grasas saturadas durante 3 semanas, que sustituyendo la caseína por proteína de soja incrementaron los niveles de ARNm del receptor de insulina en hígado y tejido adiposo, mejorando la sensibilidad insulínica sin modificar significativamente los niveles de glucemia.

Confirmando estudios previos de D'Alessandro y col. (2006), en los animales alimentados crónicamente con una dieta rica en sacarosa se constató una disminución significativa en la actividad de la enzima hexoquinasa, sin modificaciones significativas en la expresión de la masa proteica de transportador Glut-4 en condiciones basales. Es bien conocido que el ciclo de transporte del Glut-4 entre la superficie celular y el depósito intracelular se encuentra alterado en el músculo esquelético en situaciones de obesidad y diabetes tipo 2, aún en presencia de niveles similares de Glut-4 total disponible (Bonen y col., 2004). Por otro lado, los resultados de la presente tesis demuestran que el incremento sustancial en la expresión de la masa proteica del Glut-4 en el músculo gastronemio observado en los animales controles (DC) bajo el estímulo de la insulina (clamp euglucémica-hiperinsulínemica) no pudo ser constatado en el grupo de ratas alimentadas con DRS. Estos datos sugieren la posibilidad de que un defecto en el tráfico de la vesícula de Glut-4 a la membrana plasmática bajo la acción de la insulina pueda contribuir a la insensibilidad insulínica presente en el músculo esquelético de estos animales. La sustitución de caseína por proteína de soja en la DRS durante los 4 últimos meses de experimentación mejoró significativamente la actividad de la hexoquinasa, pero sin alcanzar aún los valores observados en el grupo DC. En los animales alimentados con DRS-S la insulina estimuló la translocación del Glut-4 aumentando la expresión de



la masa proteica del transportador en la membrana del músculo gastronemio, aunque los niveles alcanzados fueron aún significativamente menores que los observados en el grupo DC. El mejoramiento de la actividad de la enzima hexoquinasa y la translocación del transportador Glut-4, junto con el mejor funcionamiento de las vías oxidativas y no oxidativas de la glucosa en músculo esquelético así como la normalización de la dislipemia, podrían constituir algunos de los mecanismos involucrados en el efecto beneficioso de la proteína de soja sobre el mejoramiento de la sensibilidad insulínica periférica global. Al respecto, Tremblay y col. (2003) alimentando ratas Wistar con dieta rica en grasas (23% p/p) conteniendo caseína o proteína de soja como fuente proteica durante 4 semanas, demostraron un aumento en la expresión de la masa proteica del Glut-4 en la fracción de membrana frente al estímulo de insulina cuando los animales recibieron proteína de soja, comparados con el grupo que recibió caseína.

Otro aspecto del efecto de la proteína de soja sobre el metabolismo lipídico y glucemia en músculo esquelético fue analizado por Morifuji y col. (2006). Estos autores administraron a ratas Sprague Dawley durante dos semanas una dieta AIN 93, en donde la caseína o proteína de soja fue utilizada como fuente proteica. En los animales alimentados con proteína de soja se observó en músculo esquelético un incremento significativo de la expresión génica de: CPT-1, acil-CoA oxidasa, FAT/CD36 y PPAR- α entre otros, cuando se los comparó con los animales que recibieron caseína como fuente proteica dietaria. Esto se acompañó de un decrecimiento de la glucemia, de lípidos plasmáticos y de Tg hepáticos.

Como mencionamos en la “Discusión Parte 2”, no podemos descartar la posible participación de otros componentes de la proteína de soja que podrían estar involucrados en la regulación de la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad insulínica periférica global, como son la composición aminoacídica y las isoflavonas. Diferencias en la composición aminoacídica de las proteínas dietarias son muy importantes para mediar los cambios dinámicos de insulina y glucosa dependientes de proteínas. (Sanchez y Hubbard, 1991, Sugghano y col., 1984). En relación a los isoflavonas, Mezei y col. (2003) alimentaron ratas Zucker obesas durante 8 semanas con una dieta AIN 93, en la cual la caseína fue reemplazada por proteína de soja rica o pobre en isoflavonas, como fuente proteica. Ellos constataron un mejoramiento del metabolismo lipídico y la tolerancia a la glucosa. Además, Cho y col. (2010) demostraron que la daidzeina y su metabolito equol en cultivos de adipocitos (3T3 -L1) estimulan la captación de glucosa por la insulina incrementando posiblemente la activación del PPAR- γ . Esto indicaría que la daidzeina enfatiza la captación de glucosa estimulada por la insulina y esto sería mediado por una “up regulation” de la expresión del IRS-1 y Glut-4.



En conclusión, la proteína de soja aislada fue capaz de mejorar la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad insulínica periférica global en animales dislipémicos insulino resistentes. Esto fue acompañado de la reversión de la dislipemia. Si bien el/los mecanismos involucrados en el efecto beneficioso de la proteína de soja aislada no están aún bien dilucidados, los resultados aquí expuestos sugieren que en el músculo esquelético la normalización y/o mejoramiento de metabolitos y enzimas involucrados en la utilización de la glucosa, así como la expresión de la masa proteica del Glut-4 bajo la acción insulínica podrían jugar un rol importante en este proceso.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Las patologías asociadas al Síndrome Plurimetabólico representan uno de los principales problemas que aquejan a la salud mundial y también a nuestro país. Este síndrome resulta de la conjunción de factores genéticos y factores relacionados al estilo de vida (nutricionales y actividad física). Los macronutrientes de la dieta juegan un rol muy importante en su desarrollo. Dada la posibilidad de modificar estos últimos, los mismos han sido el blanco elegido tanto para el estudio de los mecanismos implicados en la fisiopatología como para la aplicación de intervenciones que resulten beneficiosas para la salud.

A partir de estudios a nivel humano y en animales de experimentación que señalan los efectos beneficiosos de la proteína de soja sobre la dislipemia e insensibilidad insulínica, el objetivo del presente trabajo se focalizó en el estudio de la influencia que ejerce la sustitución de la fuente proteica (caseína por proteína de soja) dietaria sobre aspectos del metabolismo lipídico y sensibilidad insulínica. Para ello nos propusimos utilizar el modelo no genético de ratas alimentadas con DRS a fines de evaluar la posibilidad de mejorar y/o revertir estas alteraciones por manipulación dietaria: cambio de la fuente proteica de la dieta (origen animal: caseína por origen vegetal: proteína de soja).

En este contexto, los resultados del presente estudio demuestran que la sustitución de caseína por proteína de soja aislada, en el modelo experimental utilizado, previno el incremento de peso corporal, limitando la adiposidad visceral y revirtiendo la dislipemia (normalizó los niveles de AGNE, Tg y colesterol plasmáticos) y la esteatosis hepática. Los posibles mecanismos involucrados en este proceso a nivel hepático incluyen un incremento de las actividades de las enzimas blanco en la oxidación de ácidos grasos a través de una “up regulation” de la expresión de la masa proteica del PPAR- α y una disminución de las actividades de las enzimas involucradas en la síntesis “de novo” de ácidos grasos a través de una “down regulation” de la expresión de la masa proteica del SREBP-1. Además la menor disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos, contribuyó también a disminuir la síntesis y secreción de VLDL-Tg limitando la formación de partículas LDL y por lo tanto reduciendo los niveles plasmáticos de Tg y colesterol. En este contexto la glucemia basal alcanzó niveles normales y la resistencia insulínica periférica global mejoró substancialmente. El músculo esquelético contribuyó significativamente en este aspecto, ya que la administración de proteína de soja normalizó la oxidación de la glucosa, el contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato y mejoró la translocación del Glut-4 bajo la acción insulínica.



Si bien la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales hacia el humano debe ser muy cuidadosa este trabajo pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos que podrían estar involucrados en el mejoramiento y/o reversión de alteraciones metabólicas susceptibles de modificar por la dieta. Atento a ello, consideramos que el consumo de soja como fuente proteica de la dieta podría contribuir, entre otros nutrientes, en la prevención y mejoramiento de patologías asociadas al Síndrome plurimetabólico.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Abdul-Ghani, M.A. y DeFronzo, R.A. (2010). *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. J. of Biomed. and Biotech., ID 476279.
- ✓ Adams, M.R.; Golden, D.L.; Franke, A.A.; Potter, S.M.; Smith, H.S. y Anthony, M.S. (2004). *Dietary soy-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice*. J. Nutr., 134: 511-516.
- ✓ Anderson, J.W.; Johnstone, B.M. y Cook-Newell, M.E. (1995). *Meta-analysis of the effects on soy protein intake of serum lipids*. N. Engl. J. Med., 333: 276-282.
- ✓ Anderson, J.W.; Belinda, M.S. y Washnock, C.S. (1999). *Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake*. Am. J. Clin. Nutr., 70(suppl): 464S-474S.
- ✓ Aoyama, Y.; Fukui, K.; Takamatsu, K.; Hashimoto, Y. y Yamamoto, T. (2000). *Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK)*. Nutr., 16 (5): 349-354.
- ✓ Ascencio, C.; Torres, N.; Isoard-Acosta, F.; Gomez-Pérez, F.; Hernandez-Pando, R. y Tovar, A.R. (2004). *Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats*. J. Nutr., 134: 522-529.
- ✓ Banz, W.J.; Davis, J.; Peterson, R. y Iqbal, M.J. (2004). *Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rats*. Obesity research, 12 (12): 1907-1913.
- ✓ Basciano, H.; Federico, L. y Adeli, K. (2005). *Fructose, insulin resistance and metabolic dislipidemia*. Nutrition & Metabolism, 2(1): 5.
- ✓ Bell, K.S.; Schmitz-Peiffer, C.; Lim-Fraser, M.; Biden, T.J.; Cooney, G.J. y Kraegen, E.W. (2000). *Acute reversal of lipid-induced muscle insulin resistance is associated with rapid alteration in PKC θ localization*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 279: 1196-1201.
- ✓ Berger, J.; Leibowitz, M.D.; Doebber, T.W.; Elbrecht, A.; Zhang, B.; Zhou, G.; Biswas, C.; Cullinan, C.A.; Hayes, N.S.; Li, Y.; Tanen, M.; Ventre, J.; Wu, M.S.; Bergeri, G.D.; Mosley, R.; Marquisi, R.; Santini, C.; Sahoo, S.P.; Tolman, R.L.; Smith, R.G. y Moller, D.E. (1999). *Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and PPAR δ ligands produce distinct biological effects*. J. of Biol. Chem., 274(10): 6718-6725.



- ✓ Bergmeyer, H.U. (1974). *Methods for determination of metabolites. Methods of enzymatic analysis*. 2° English edition, (Eds: Bergmeyer HU, ed.). New York Academic Press.
- ✓ Bernal, C.; Basílico, M.Z.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1989). *Secretion and removal rates of very low-density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet*. Nutr. Rep. Int., 40: 71-83.
- ✓ Bezerra, R.M.N.; Ueno, M.; Silva, M.S.; Tavares, D.Q.; Carvalho, C.R.O. y Saad, M.J.A. (2000). *A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats*. J. Nutr., 130: 1531-1535.
- ✓ Bonen, A.; Parolin, M.L.; Steinberg, G.R.; Calles-Escandon, J.; Tandon, N.N.; Glatz, J.F.C.; Luiken, J.J.; Heigenhauser, G.J.F. y Dyck, D.J. (2004). *Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36*. FASEB J., 18: 1144-6.
- ✓ Bosello, O.; Cominacini, L.; Zocca, I.; Garbin, U.; Compri, R.; Davoli, A. y Brunetti, L. (1988). *Short- and long-term effects of hypocaloric diets containing proteins of different sources on plasma lipids and apoproteins of obese subjects*. Ann. Nutr. Metab., 32(4): 206-14.
- ✓ Brandt, H.; Killilea, S.D. y Lee E.Y. (1974). *Activation of phosphorylase phosphatase by a novel procedure: evidence for a regulatory mechanism involving the release of a catalytic subunit from enzyme-inhibitor complex(es) of higher molecular weight*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61(2): 598-604.
- ✓ Brenner, R.R.; Rimoldi, O.J.; Lombardo, Y.B.; González; M.S.; Bernasconi, A.M.; Chicco, A.G. y Basabe, J.C. (2003). *Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet*. Lipids, 38: 733-742.
- ✓ Brenner, R.R. (2006). *Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal: Enfoques actuales*. Rev. Farm., 148: 33-49.
- ✓ Burnol, A., Ferre, P., Leturque, A. y Girard, J. (1984). *Technics for studying insulin resistance in vivo*. Ann. Endocrinol., 45(6): 375-379.



- ✓ Calbet, J.A. y MacLean, D.A. (2002). *Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans*. J Nutr., 132: 2174-82.
- ✓ Cederroth, C.R.; Vinciguerra, M.; Gjinovci, A.; Kühne, F.; Klein, M.; Cederroth, M.; Caille, D.; Suter, M.; Neumann, D.; James, R.W.; Doerge, D.R.; Wallimann, T.; Meda, P.; Foti, M.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Vassalli, J. y Nef, S. (2008). *Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism*. Diabetes, 57: 1176-1185.
- ✓ Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1996). *Effect of moderate levels of dietary fish oil on insulin secretion and sensitivity, and pancreas insulin content in normal rats*. Ann. Nutr. Metab., 40(2): 61-70.
- ✓ Chicco, A.; Basabe, J.C.; Karabatas, L.; Ferraris, N.; Fortino, A. y Lombardo, Y.B. (2000). *Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats*. Metabolism, 49: 1346-1351.
- ✓ Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Pastorale, C.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003). *Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet*. J. Nutr., 133: 127-133.
- ✓ Cho, K.W.; Lee, O.; Banz, W.J.; Moustaid-Moussa, N.; Shay, N.F. y Kim, Y. (2010). *Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR γ transcriptional activity*. The J. of Nutr. Biochem., 21 (9): 841-847
- ✓ Cohen, A.M. y Teitelbaum, A. (1964). *Effect of dietary sucrose and starch on oral glucose tolerance and insulin-like activity*. Am. J. Physiol., 206: 105-8.
- ✓ Corcoran, M.P.; Lamon-Fava, S. y Fielding, R.A. (2007). *Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise*. Am. J. Clin. Nutr., 85: 662-677.
- ✓ Cunniff, P. (1999). *Official methods of analysis of association of official agricultural chemists*. (16th ed), Gaithersburgs, Maryland: AOAC International.



- ✓ Davis, J.; Iqbal, M.J.; Steinle, J.; Oitker, J.; Higginbotham, D.A.; Peterson, R.G. y Banz, W.J. (2005). *Soy protein influences the development of the metabolic syndrome in male obese ZDFxSHHF rats*. *Horm. Metab. Res.*, 37(5): 316-25.
- ✓ D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.; Karabatas, L. y Lombardo, Y.B. (2000). *Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: Effect of moderate levels of dietary fish oil*. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 273-280.
- ✓ D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.; Karabatas, L.; y Lombardo, Y.B. (2006). *Músculo esquelético: relación lípidos-resistencia insulínica en un modelo experimental de dislipemia*. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.*, 43: 3-15.
- ✓ DeFronzo, R.A.; Tobin, J.D. y Andres, R. (1979). *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am. J. Physiol.*, 237: 214-223.
- ✓ Demonty, I.; Lamarche, B.; Deshaies, Y. y Jacques, H. (2002). *Role of soy isoflavones in the hypotriglyceridemic effect of soy protein in the rat*. *J. of Nutr. Biochem.*, 13 (11): 671-677.
- ✓ Desvergne, B. y Wahli, W. (1999). *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism*. *Endocr. Rev.*, 20(5): 649-88.
- ✓ Desvergne, B.; Michalik, L. y Wahli, W. (2006). *Transcriptional regulation of metabolism*. *Physiol. Rev.*, 86: 465-514.
- ✓ Dewell, A.; Hollenbeck, C.B. y Bruce, B. (2002). *The effects of soy derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87: 118-121.
- ✓ Donnelly, R.; Reed, M.J.; Azhar, S. y Reaven, G.M. (1994). *Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose- induced insulin resistance*. *Endocrinology*, 135: 2369-2374.
- ✓ Dubuquoy, L.; Dharancy, S.; Nutten, S.; Pettersson, S.; Auwerx, J. y Desreumaux, P. (2002). *Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases*. *Lancet*, 360: 1410-1418.



- ✓ Ellis, B.A.; Poynten, A.; Lowy, A.J.; Furler, S.M.; Chisholm, D.J.; Kraegen, E.W. y Cooney, G.J. (2000). *Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279: E554-E560.
- ✓ Erdman, J.W. (2000). *Soy protein and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA*. *Circulation*, 14: 2555-2559.
- ✓ Erdman, J.W.; Badger, T.M.; Lampe, J.W.; Setchell, K.D.R. y Messina, M. (2004). *Not all products are created equal: caution needed in interpretation of research results*. *J. Nutr.*, 134(suppl): 1229S-1233S.
- ✓ FAOSTAT. (2009). *Food and agriculture organization of the united nations: for a world without hunger*. Technical Tips On Line. <http://faostat.fao.org>.
- ✓ Federici, M.; Hubal, M.; Perego, L.; Ranalli, M.; Caradona, Z.; Perego, C.; Usellini, L.; Nano, R.; Bonini, O.; Bertizzi, F.; Marlier, L.N.J.L.; Davalli, A.M.; Casadente, O.; Pontiroli, A.E.; Gerry, M.; Marchetti, P.; Lauro, R.; Sesti, G. y Folli, F. (2001). *High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of langerhans. A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward apoptotic cell death program*. *Diabetes*, 50: 1290-1301.
- ✓ Ferre, P. (2004). *The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity*. *Diabetes*, 53: S43-50.
- ✓ Freedman, D.S.; Khan, L.K.; Dietz, W.H.; Srinivasan, S.R. y Berenson, G.S. (2001). *Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood. The Bogalusa Heart Study*. *Pediatrics*, 108: 712-718.
- ✓ Folch, J.; Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1956). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- ✓ Fortino, M.A.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2007). *The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model*. *Nutrition*, 23: 489-497.
- ✓ Gagliardino, J.J. (2000). *An overview of Argentine contributions to diabetes in the decade of the 1990s*. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 16: 43-70.



- ✓ Gianazza, E.; Eberini, I.; Arnoldi, A.; Wait, R. y Sirtori, C.R. (2003). *A proteomic investigation of isolated soy proteins with variable effects in experimental and clinical studies*. J. Nutr., 133: 9-14.
- ✓ Goglia, F.; Liverini, G.; Lanni, A.; Iossa, S. y Barletta, A. (1989). *Morphological and functional modifications of rat liver peroxisomal subpopulations during cold exposure*. Exp. Biol., 48: 127-133.
- ✓ Grossbard, L. y Schimke, R.T. (1966). *Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms*. J. of Biol. Chem., 241 (15): 3546-3560.
- ✓ Gutman, R.; Basílico, M.Z.; Bernal, C.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (1987). *Long-Term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose rich diet*. Metabolism, 36: 1013-1020.
- ✓ Halestrap, A.P. y Denton, R.M. (1973). *Insulin and the regulation of adipose tissue acetyl-CoA carboxylase*. Biochem. J., 132: 509-517.
- ✓ Harris, W.S.; Hustvedt, B.E.; Haegen, E.; Green, M.H.; Lu, G. y Drevon, C.A. (1997). *N-3 fatty acids and chylomicron metabolism in the rat*. J. Lipid Res., 38: 503-515.
- ✓ Hegarty, B.D.; Bobard, A.; Hainault, I.; Ferré, P.; Bossard, P. y Foufelle, F. (2005). *Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c*. PNAS, 102 (3): 791-796.
- ✓ Hein, G.J.; Bernasconi, A.M.; Montanaro, M.A.; Pellon-Maison, M.; Finarelli, G.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. y Brenner, R.R. (2010). *Nuclear receptors and hepatic lipogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 298: E429-E439.
- ✓ Herbert, V.; Lau, K.S.; Gottlieb, C.W. y Bleicher, S.J. (1965). *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 25(10): 1375-84.
- ✓ Hirche, F.; Schöder, A.; Knoth, B.; Stangl, G.I. y Eder, K. (2006). *Methionine-induces elevation of plasma homocysteine concentration is associated with an increase of plasma cholesterol in adult rats*. Ann. Nutr. Metab., 50: 139-146.



- ✓ Horton, J.D.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (2002). *SREBPs: activators of complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J. Clin. Invest., 109: 1125-31.
- ✓ Hsu, R.Y. y Lardy, H.A. (1969). *Malic enzyme*. In: *Methods in Enzymology* (Lowenstein, JM, ed.), vol XIII, pp 230-235. Academic Press, New York.
- ✓ Huijing, F. (1970). *A rapid enzymatic method for glycogen estimation in very small tissue samples*. Clin. Chem. Acta, 33: 567-572.
- ✓ Hurley, C.; Richard, D.; Deshaies, Y. y Jacques, H. (1998). *Soy protein isolate in the presence of cornstarch reduces body fat gain in rats*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 76: 1000-7.
- ✓ Hwang, D. (2000). *Fatty acids and immune responses – a new perspective in searching for clues to mechanism*. Annu. Rev. Nutr., 20: 431-456.
- ✓ Iritani, N.; Hosomi, H.; Fukuda, H.; Tada, K. e Ikeda, H. (1996). *Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats*. J. Nutr., 126: 380-388.
- ✓ Iritani, N.; Sugimoto, T.; Fukuda, H.; Komiya, M. e Ikeda, H. (1997). *Dietary soybean protein increases insulin receptor gene expression in Wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low*. J. Nutr., 127: 1077-1083.
- ✓ Itani, S.I.; Ruderman, N.B.; Schmieder, F. y Boden, G. (2002). *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, Protein kinase C, and I κ B- α* . Diabetes, 51: 2005–2011.
- ✓ Joseph, S.B.; Laffitte, B.A.; Patel, P.H.; Watson, M.A.; Matsukuma, K.E.; Walczak, R. Collins, J.L.; Osborne, T.F. y Tontonoz, P. (2002). *Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors*. J. Biol. Chem., 277(13): 11019-11025.
- ✓ Kabashima, T.; Takumi, Kawaguchi, T.; Wadzinski, B.E. y Uyeda, K. (2003). *Xylulose-5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose-5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver*. PNAS, 100 (9): 5107-5112.
- ✓ Karlic, H.; Lohninger, S.; Koeck, T. y Lohninger, A. (2002). *L-carnitine stimulates carnitine acyltransferases in the liver of aged rats*. J. Histochem. Cytochem., 50: 205-212.



- ✓ Kawano, K.; Hirashima, T.; Mori, S.; Saitoh, Y.; Kurosumi, M. y Natori, T. (1992). *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain*. Diabetes, 41: 1422-1428.
- ✓ Kim, S.; Shin, H.; Kim, S.Y.; Kim, J.H.; Lee, Y.S.; Kim, D. y Lee, M. (2004). *Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR α* . Mol. and Cel. Endoc., 220: 51-58.
- ✓ Klimes, I.; Seböková, E.; Vrána, A. y Kazdová, L. (1993). *Raised dietary intake of N-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. Animal studies*. Annals of the NY Acad. of Sciences, 14: 69-81.
- ✓ Koo, H.Y.; Wallig, M. A.; Chung, B.H.; Nara, T.N.; Cho, S.H.S. y Nakamura, M.T. (2008). *Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver*. Bioch. Et Bioph. Acta, 1782: 341-348.
- ✓ Kraegen, E.W.; James, D.E.; Storlien, L.H.; Burleigh, K.M. y Chisholm, D.J. (1986). *In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: Assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration*. Diabetologia, 29: 192-198.
- ✓ Kraegen, E.W.; Clark, P.W.; Jenkins, A.B.; Daley, E.A.; Chisholm, D.J. y Storlien, L.H. (1991). *Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats*. Diabetes, 40(11): 1397-403.
- ✓ Kris-Etherton, P.M.; Harris, W.S. y Appel, L.J. (2002). *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 106: 2747-2757.
- ✓ Kurowska, E.M. y Carroll, K.K. (1994). *Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids*. J. Nutr., 124: 364-370.
- ✓ Lang, G. y Michal, G. (1974). *Metabolites: Carbohydrate metabolism in methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer, H.U. de Velag Chemie International, Deerfield Beach F.L. 3: 1238-1242.
- ✓ Lavigne, C.; Marette, A. y Jacques, H. (2000). *Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats*. Am. J. Physiol. Endocrinology Metab., 278: E491-E500.



- ✓ Laurell, S. (1966). *A method for routine determination of plasma triglyceride*. Scan. J. Clin. Lab. Invest., 18: 668-672.
- ✓ Lewis, B.; Boberg, J. y Carlson, L.A. (1972). *Determination of the intravenous fat tolerance test with Intralipid by nephelometry*. Atherosclerosis, 1: 83-86.
- ✓ Lewis, G.; Carpentier, A.; Khosrow, A. y Giacca, A. (2002). *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes*. Endocrine Reviews, 23: 201-229.
- ✓ Lichtenstein, A.H. (1998). *Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk*. J. Nutr., 128: 1589-1592.
- ✓ Lin, C.; Tsai, C. y Lin, S. (2005). *Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets*. World J. Gastroenterol., 11(35): 5549-5552.
- ✓ Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; Mocchiutti, N.; Rodi, M.; Nusimovich, B. y Gutman, R. (1983). *Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and triglyceride storage and mobilization of heart of rats*. Horm. Metab. Res., 15: 69-76.
- ✓ Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Martinelli, M.; Soria, A. y Gutman, R. (1996a). *Dietary fish oil normalizes dyslipemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet*. Biochem. Biophys. Acta, 1299: 175-182.
- ✓ Lombardo, Y.B.; Drago, S.; Chicco, A.; Fainsteein-Day, R.; Gutman, R.; Gagliardino, J.J. y Gomez Dumm, C.L. (1996b). *Long-term administration of sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas*. Metabolism, 45: 1527-1532.
- ✓ Lombardo, Y.B. y Chicco, A. (2006). *Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review*. J. Nutr. Biochem., 17: 1-13.
- ✓ Lombardo, Y.B.; Hein, G. y Chicco, A. (2007). *Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity*. Lipids, 42: 427-437.



- ✓ Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianazza, E.; Arnoldi, A.; Kurowska, E.; Carroll, K.K. y Sirtori, C.R. (2000). *Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells*. J. Nutr., 130: 2543-2549.
- ✓ Lowenstein, J.M. (1969). *Citric acid cycle. Methods in enzymology*. Volume XIII. (Lowenstein JM, ed). New York and London Academic Press.
- ✓ Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- ✓ Lu, T.T.; Repa, J.J. y Mangelsdorf, D.J. (2001). *Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism*. J. Biol. Chem., 276: 37735-37738.
- ✓ Mandarino, L.J. (1989). *Regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase and glycogen synthase in man*. Diabetes Metab. Rev., 5(6): 475-486.
- ✓ Martin, R.J.; Welton, R.F. y Baumgardt, B.R. (1973). *Adipose and liver tissue enzyme profiles in obese hyperglycemic mice*. Medicine Proceedings, 142: 241-245.
- ✓ Martín de Santa Olalla, L.; Sánchez Muniz, F. J. y Vaquero, M. P. (2009). *N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity*. Nutr. Hosp., 24(2): 113-127.
- ✓ Matsui, H.; Okumura, K.; Kawakami, K.; Hibino, M.; Toki, Y. y Ito, T. (1997). *Improved insulin sensitivity by bezafibrate in rats: relationship to fatty acid composition of skeletal-muscle triglycerides*. Diabetes, 46(3): 348-53.
- ✓ Mezei, O.; Banz, W.J.; Steger, R.W. y Peluso, M.R. (2003). *Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells*. J. Nutr., 133: 1238-1243.
- ✓ Miyada, K.S.; McCaw, S.E.; Patel, H.V.; Rachubinski, R.A. y Capone, J.P. (1996). *The orphan nuclear hormone receptor LXR α interacts with the peroxisome proliferator-activated receptor and inhibits peroxisome proliferator signaling*. J. Biol. Chem., 271: 9289-9192.
- ✓ Moran, T.H.; Sawyer, T.K.; Seeb, D.H.; Ameglio, P.J.; Lombard, M.A. y McHugh, P.R. (1992). *Potent and sustained satiety actions of a cholecystokinin octapeptide analogue*. Am. J. Clin. Nutr., 55(1 Suppl): 286S-290S.



- ✓ Mori, T.A.; Burke, V.; Puddey, I.B.; Watts, G.F.; O'Neal, D.N. y Best, J.D. (2000). *Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men*. Am. J. Clin. Nutr., 71: 1085-1094.
- ✓ Morifuji, M.; Sanbongi, C. y Sugiura, K. (2006). *Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats*. Br. J. Nutr., 96(3): 469-75.
- ✓ Morita, T.; Oh-hashi, A.; Takei, K.; Ikai, M.; Kasaoka, S. y Kiriya, S. (1997). *Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet*. J. Nutr., 127: 470-477.
- ✓ Nagai, Y.; Nishio, Y.; Nakamura, T.; Maegawa, H.; Kikkawa, R. y Kashiwagi, A. (2002). *Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α* . Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 282: 1180-1190.
- ✓ Nishi, T.; Hara, H.; Hira, T. y Tomita, F. (2001). *Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells*. Exp. Biol. Med., 226(11): 1031-1036.
- ✓ Nishi, T.; Hara, H. y Tomita, F. (2003). *Soybean β -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats*. J. Nutr., 133: 352-357.
- ✓ Nishimura, M.; Fedorov, S.; y Uyeda, K. (1994). *Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-biphosphate in rat liver*. J. of Biolog. Chem., 269(42): 26100-26106.
- ✓ Nishimura, M. y Uyeda, K. (1995). *Purification and characterization of a novel xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase catalyzing dephosphorylation of Fructose-6-phosphate, 2-kinase:Fructose-2,6-bisphosphatase*. J. of Biolog. Chem., 270(44): 26341-26346.
- ✓ Oakenfull, D. (2001). *Soy protein, saponins and plasma cholesterol*. J. Nutr., 131: 2971.
- ✓ Ochoa, S. (1955). "*Malic enzyme*." Methods Enzymol., 1: 739-753.



- ✓ Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2008). *Efectos de la sustitución de caseína por proteína de soja como fuente proteica en dislipemia experimental*. FABICIB, 12: 57-67.
- ✓ Oliva, M.E.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2009). *Soy protein reverse dyslipidemia and the altered capacity of insulina stimulated glucose utilization in skeletal muscle of sucrose-rich fed rats*. Brit. J. of Nutr., 102: 60-68.
- ✓ Oliva, M.E.; Selenscig, D., D'Alessandro, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2010). *Soya protein ameliorates the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dyslipemic insulin resistant rat model*. Brit. J. of Nutr., (en prensa).
- ✓ Otway, S. y Robinson, D. (1967). *The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions*. J. Physiological., 190: 321-330.
- ✓ Pagliassotti, M.J.; Prach, P.A.; Koppenhafer, T.A. y Pan, D.A. (1996). *Changes in insulin action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats*. Am. J. Physiol., 271: 1319-1326.
- ✓ Pan, D.A.; Lillioja, S.; Kriketos, A.D.; Milner, M.R.; Baur, L.A.; Bogardus, C.; Jenkins, A.B. y Storlien, L.H. (1997). *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetes, 46(6): 983-8.
- ✓ Peet, D.J.; Janowski, B.A. y Magelsdorf, D.J. (1998). *The LXRs: a new class of oxysterol receptors*. Curr. Opin. Genet. Dev., 8: 571-575.
- ✓ Pedersen, O.; Kahn, C.R.; Flier, J.S. y Kahn, B.B. (1991). *High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut-4) in fat cells of rats*. Endocrinology, 129: 771-777.
- ✓ Peluso, M.R.; Winters, T.A.; Shanahan, M.F. y Banz, W.J. (2000). *A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats*. J. Nutr., 130: 2333-2342.
- ✓ Peterson, R.G.; Shaw, W.N.; Neel, M.A.; Little, L.A. y Eichberg, J. (1990). *Zucker diabetic fatty rat as model for non-insulin-dependent diabetes mellitus*. ILAR news, 32: 16-19.



- ✓ Pfeuffer, M. y Barth, C.A. (1992). *Dietary sucrose but not starch promotes protein induced differences in rates of VLDL secretion and plasma lipid concentrations in rats*. J. Nutr., 122: 1582-1586.
- ✓ Pighin, D.; Karabatas, L.; Rossi, A.; Chicco, A.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003). *Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet*. J. Nutr., 133(12): 4095-101.
- ✓ Podolin, D.A.; Gayles, E.C.; Wei, Y.; Thresher, J.S. y Pagliassotti, M.J. (1998). *Menhaden oil prevents but not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats*. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., 274: 840-848.
- ✓ Potter, S. (1995). *Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy*. J. Nutr., 125: 606S-611S.
- ✓ Randle, P. J. (1988). *Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones*. Diabetes Metab. Rev., 4(7): 623-38.
- ✓ Reaven, G.M.; Risser, T.R.; Chen, Y.D. y Reaven, E.P. (1979). *Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats*. J. Lipid Res., 20: 371-378.
- ✓ Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C. (1993). *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of AIN-76A rodent diets*. J. Nutr., 123: 1939-1951.
- ✓ Repa, J.J.; Liang, G.; Ou, J.; Bashmakov, Y.; Lobaccaro, J.M.; Shimomura, I.; Shan, B. Brown, M.S.; Goldstein, J.L. y Mangelsdorf, D.J. (2000). *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta*. Genes Dev., 14: 2819-2830.
- ✓ Ridner, E. (2006). *Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud*. Primera Edición. Buenos Aires. ISBN: 987-23125-0-8.
- ✓ Rodgers, J. y Puigserver, P. (2007). *Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic situin 1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 104: 12861-12866.



- ✓ Rodnick, K.; Slot, J.W.; Studeska, D.R.; Hanpeter, D.E.; Robinson, L.J.; Geuze, H.J. y James, D.E. (1992). *Immunocytochemical and biochemical studies of Glut-4 in rat skeletal muscle*. J. Biol. Chem., 267: 6278-6285.
- ✓ Ronis, M.J.; Chen, Y.; Badeaux, J. y Badgerm, T.M. (2009). *Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR and SREBP signaling*. J. Nutr., 139: 1431-1438.
- ✓ Rösner, S. (1974). *Studies on an intravenous fat tolerance test: Methodological experimental and clinical experiences with Intralipid*. Acta Med. Scand. Suppl. I, 564: 1-4.
- ✓ Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B.; Lacorte, J.; Chicco, A.G.; Rouault, C.; Slama, G. y Rizkalla, S.W. (2005). *Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats*. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., 289: R486-R494.
- ✓ Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2009). *Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: Effects of fish oil*. Nutrition, 26(2): 209-217.
- ✓ Russell, J.C. y Amy, R.M. (1986). *Early atherosclerotic lesions in a susceptible rat model: the LA/N corpulent rat*. Atherosclerosis, 60: 119-129.
- ✓ Sanchez, A. y Hubbard, R.W. (1991). *Plasma amino acids and the insulin/glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis*. Med. Hyp., 35: 324-9.
- ✓ Schmitz-Peiffer, C.; Browne, C.L.; Oakes, N.D.; Watkinson, A.; Chisholm, D.J.; Kraegen, E.W. y Biden, T.J. (1997). *Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat*. Diabetes, 46(2): 169-178.
- ✓ Schoonjans, K.; Peinado-Onsurbe, J.; Lefebvre, A.M.; Heyman, R.A.; Briggs, M.; Deeb, S.; Staels, B. y Auwerx, J. (1996). *PPARα and PPARγ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene*. The EMBO Journal, 15: 5336-5348.
- ✓ Segunda Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. (2009). Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina.



- ✓ Selenscig, D.; Rossi, A.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2010). *Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance: effect of dietary fish oil*. *Metabolism*, 59(6): 787-95.
- ✓ Setchell, K.D.R. y Cassidy, A. (1999). *Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health*. *J. Nutr.*, 129(suppl): 758S-767S.
- ✓ Sevilla, L.; Gumà, A.; Enrique-Tarancón, G.; Mora, S.; Muñoz, P.; Palacín, M.; Testar, X. y Zorzano, A. (1997). *Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut-4 expression in skeletal muscle and adipose tissue*. *Bioch. and Bioph. Research Comm.*, 235(1): 89-93.
- ✓ Shimizu, S.; Ugi, S.; Maegawa, H.; Egawa, K.; Nishio, Y.; Yoshizaki, T.; Shi, K.; Nagai, Y.; Morino, K.; Nemoto, K.; Nakamura, T.; Bryer-Ash, M. y Kashiwagi, A. (2003). *Protein-tyrosine Phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression*. *J. of Biol. Chemist.*, 278(44): 43095–43101.
- ✓ Shukla, A.; Brandsch, C.; Bettzieche, A.; Hirche, F.; Stangl, G.I. y Eder, K. (2007). *Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes*. *J. of Nut. Bioch.*, 18: 313-321.
- ✓ Singh, R.J.; Randall, L.N. y Gyuhwa, G. (2006). *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: Oilseed Crops*. Volume 4. CRC. pp. 15. ISBN 978-0849336393.
- ✓ Snedecor, G.W.P y Cochran, W.G. (1967). *“Statistical methods”*. Ames, Iowa University Press IA Pp 339-350.
- ✓ Soria, A.; D’Alessandro, M.E. y Lombardo, Y.B. (2001). *Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes*. *J. Appl. Physiol.*, 91: 2109-2116.
- ✓ Soria, A.; Chicco, A.; D’Alessandro, M.E.; Rossi, A. y Lombardo, Y.B. (2002). *Dietary fish oil reverse epididimal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dislipemic sucrose fed rat model*. *J. of Nutr. Biochem.*, 13: 209-218.
- ✓ Stannard, S.R. y Jhonson, N.A. (2003). *Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than “thrifty” genes?*. *J. Physiol.*, 554(3): 595-607.



- ✓ Storlien, L.H.; Kraegen, E.W.; Chisholm, D.J.; Ford, G.L.; Bruce, D.G. y Pascoe, W.S. (1987). *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats*. *Science*, 21 (237): 885-8.
- ✓ Storlien, L.H.; Pan, D.A.; Kusunoki, M. y Cooney, G.J. (1993). *Effects of benfluorex on in vivo patterns of insulin resistance induced by diets rich in fat or fructose*. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 9 (Suppl S1): 65S-72S.
- ✓ Sugano, M.; Tanaka, K. y Ide, T. (1982). *Secretion of cholesterol, triglyceride and apolipoproteína A-I by isolated perfused liver from rats fed soybean proteína and casein or their amino acid mixture*. *J. Nutr.*, 112: 855-862.
- ✓ Sugano, M.; Ishiwaki, N. y Nakashira, K. (1984). *Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rat. Significance of the arginine/lysine ratio*. *Ann. Nutr. Metab.*, 28: 192-199.
- ✓ Takahashi, Y.; Odbayar, T. e Ide, T. (2009). *A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver*. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 44: 223-230.
- ✓ Takenaka, Y.; Utsumi, S. y Yoshikawa, M. (2000). *Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin AlaB1b subunit by site-directed mutagenesis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(12): 2731-3.
- ✓ Taouis, M.; Dagou, C.; Ster, C.; Durand, G.; Pinault, M. y Delarue, J. (2002). *N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle*. *Am. J. Physiol.*, 282: 664-671.
- ✓ Thorburn, A.W.; Storlien, L.H.; Jenkins, A.B.; Khouri, S. y Kraegen, E.W. (1989). *Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49: 1155-63.
- ✓ Torres, N.; Torre-Villalvazo, I. y Tovar, A.R. (2006). *Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders*. *J. Nutr. Biochem.*, 17(6): 365-373.
- ✓ Torres-Villalvazo, I.; Tovar, A.R.; Ramos-Barragán, V.E.; Cerbón-Cervantes, M.A. y 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.



- ✓ Tovar, A.R.; Ascencio, C. y Torres, N. (2002). *Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 283: E1016-E1022.
- ✓ Tovar, A.R.; Torre-Villalvazo, I.; Ochoa, M.; Elias, A.L.; Ortiz, V.; Aguilar-Salinas, C.A. y Torres, N. (2005). *Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyper-insulinemic obese Zucker fa/fa rats*. J. Lipid. Res., 46: 1823-1832.
- ✓ Tremblay, F.; Lavigne, C.; Jacques, H. y Marette, A. (2003). *Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Glut-4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats*. Diabetes, 52: 29-37.
- ✓ Vamecq, J. (1990). *Fluorometric assay of peroxisomal oxidase*. Anal. Biochem., 186: 340-349.
- ✓ Velasquez, M. y Bhathena, S.J. (2007). *Role of dietary soy protein in obesity*. Int. J. Med. Sci., 4: 72-82.
- ✓ Venkatachalam, G.; Sakharkar, M.K.; Kumar, A.P. y Clement, M.V. (2009). *PPRESearch: Peroxisome Proliferator Activator Element Search Database*. Int. J. Integ. Biol., 8(1): 37-42.
- ✓ Vrāna, A.; Poledne, R.; Fábry, P. y Kazdová, L. (1978). *Palmitate and glucose oxidation by diaphragm of rats with fructose-induced hypertriglyceridemia*. Metabolism, 27(8): 885-8.
- ✓ Vrāna, A.; Kazdová, L.; Dobesová, Z.; Kunes, J.; Kren, V.; Bílá, V.; Stolba, P. y Klimes, I. (1993). *Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 14(683): 57-68.
- ✓ Wang, C.F. y Hegsted, D.M. (1949). *Normal blood volume, plasma volume and thiocyanate space in rats and their relation to body weight*. Am. J. Physiol., 156: 218-227.
- ✓ Wang, W. y González de Mejia, E. (2005). *A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases*. Institute of Food Technologists., 4: 63-78.
- ✓ Yoshikawa, M.; Yamamoto, T. y Takenaka, Y. (1999). *Study on a low molecular weight peptide derived from soybean protein having hypocholesterolemic activity*. Soy protein research, 2: 125-128.



- ✓ Yoshikawa, T.; Ide, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Matsuzaka, T.; Yatoh, S.; Kitamine, T.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Sekiya, M.; Takahashi, A.; Hastay, A.H.; Sato, R.; Sone, H.; Osuga, J.I.; Ishibashi, S. y Yamada, N. (2003). *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling*. *Molecular Endocrinology*, 17: 1240-1254.
- ✓ Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D.; Zong, H.; Wang, Y.; Bergeron, R.; Kim, J.K.; Cushman, S.W.; Cooney, G.J.; Atcheson, B.; White, M.F.; Kraegen, E.W. y Shulman, G.I. (2002). *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol-3-kinase activity in muscle*. *The J. of biological chemistry*, 277 (52): 50230-50236.
- ✓ Xu, J.; Nakamura, M.T.; Cho, H.P. y Clarke, S.D. (1999). *Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 23577-23583.
- ✓ Zelcer, N. y Tontonoz, P. (2006). *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. *J. Clin. Invest.*, 116: 607-614.
- ✓ Zimmermann, R.; Haemmerle, G. y Wagner, E.M. (2003). *Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue*. *J. Lipid Res.*, 44: 2089-2099.
- ✓ Zhou, J.R. y Erdman, J.W. (1995). *Phytic acid in health and disease*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35(6): 495-508.

**PUBLICACIONES, CAPITULO DE
LIBRO Y PRESENTACIONES A
CONGRESOS Y REUNIONES
CIENTÍFICAS**



PUBLICACIONES

- ✓ Oliva, M.E.; Selenscig, D.; D'Alessandro, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2010). "SOYA PROTEIN AMELIORATES THE METABOLIC ABNORMALITIES OF DYSFUNCTIONAL ADIPOSE TISSUE OF DYSLIPEMIC INSULIN RESISTANT RAT MODEL." British Journal of Nutrition (en prensa).

- ✓ Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2009). "SOY PROTEIN REVERSE DYSLIPIDEMIA AND THE ALTERED CAPACITY OF INSULIN STIMULATED GLUCOSE UTILIZATION IN SKELETAL MUSCLE OF SUCROSE-RICH FED RATS." British Journal of Nutrition, 102: 60-68.

- ✓ Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2008). "EFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN DE CASEÍNA POR PROTEÍNA DE SOJA COMO FUENTE PROTEICA EN DISLIPEMIA EXPERIMENTAL". FABICIB, 12: 57-67.

- ✓ Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Hein, G.; Oliva, M.E. y Lombardo YB. (2008). "DIETRARY CHIA SEED RICH IN ALPHA-LINOLENIC ACID IMPROVES ADIPOSITY AND NORMALIZES HYPERTRIGLYCERIDEMIA AND INSULIN-RESISTANCE IN DYSLIPEMIC RATS." British Journal of Nutrition, 101: 41-50.

CAPITULO DE LIBRO

- ✓ Lombardo, Y.B.; Oliva, M.E.; Selenscig, D. y Chicco, A. (2010). "SOYBEAN PROTEIN: EFFECT OF DIETARY SOYBEAN PROTEIN (Glycine max L) ON LIPID METABOLISM AND INSULIN SENSITIVITY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF DYSLIPIDEMIA AND INSULIN RESISTANCE." (por invitación). Título del libro: "NUTS AND SEEDS IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION". Editores del libro: Preedy VR, Watson RR, Patel VB. Elsevier (en prensa).



PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

CONGRESOS INTERNACIONALES

- ✓ “EFECTO DE LA PROTEÍNA DE SOJA SOBRE LA ADIPOSIDAD VISCERAL Y LA SENSIBILIDAD INSULÍNICA EN RATAS DISLIPÉMICAS”. Lombardo, Y.B.; Oliva, M.E.; Selenscig, D.; D’Alessandro, M.E. y Chicco, A. XV Congreso Latinoamericano de Nutrición – Sociedad Latinoamericana de nutrición. Santiago de Chile – Chile, 15 y 19 de noviembre de 2009. Revista Chilena de Nutrición. ISSN 0716 - 1549 versión impresa y ISSN 0717 - 7518 versión electrónica, 2009.
- ✓ “SOY PROTEIN IMPROVES VISCERAL ADIPOSITY AND INSULIN SENSITIVITY IN DYSLIPEMIC RATS FED A SUCROSE RICH DIET.” Lombardo, Y.B.; Selenscig, D.; Oliva, M.E.; D’Alessandro, M.E. y Chicco, A.. 27th International Symposium on diabetes and nutrition – Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Postdam – Alemania, 25 y 28 de junio de 2009.

CONGRESOS NACIONALES

- ✓ “LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA MEJORA MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE ADIPOSIDAD DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES”. Oliva, M.E.; Selenscig, D.; Chicco, A. y Lombardo Y.B. XVII Congreso Argentino de Diabetes. Mar del Plata – Argentina, 21 y 23 de octubre de 2010. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, Vol 44, 4, 2010.
- ✓ “EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LA FUENTE PROTEICA (CASEÍNA POR SOJA) SOBRE LA ADIPOSIDAD VISCERAL EN RATAS DISLIPÉMICAS, INSULINO RESISTENTES (IR)”. D’Alessandro, M.E.; Selenscig, D.; Oliva, M.E. y Chicco, A. LIII Reunión Científica Anual – Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata – Argentina, 19 y 22 de noviembre de 2008. Medicina, Bs. As, vol 68 (supl II). ISSN 0025.7680, 2008.
- ✓ “SUSTITUCIÓN DE CASEÍNA POR PROTEÍNA DE SOJA COMO FUENTE PROTEICA: EFECTOS EN DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULINICA EXPERIMENTAL”. Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. XVI Congreso Argentino de Diabetes. Buenos Aires – Argentina, 10 y 12 de octubre de 2008. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes, Vol 42, 2, 2008.



- ✓ “EFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN DE CASEÍNA POR PROTEÍNA DE SOJA COMO FUENTE PROTEICA EN DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULINICA EXPERIMENTAL”. Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. Jornadas Lípidos 2008. Rosario – Argentina, 7 y 8 de agosto de 2008.

- ✓ “DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULINICA: EFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN DE CASEÍNA POR PROTEÍNA DE SOJA COMO FUENTE PROTEICA”. Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. XV Congreso de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo (SAEM). Buenos Aires – Argentina, 14 al 17 de noviembre de 2007. Revista Argentina de Endocrinología y metabolismo (RAEM), Vol. 44, N° Sup., 2007.

- ✓ “EFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN DE CASEÍNA POR PROTEÍNA DE SOJA COMO FUENTE PROTEICA EN DISLIPEMIA Y RESISTENCIA INSULINICA”. Oliva, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. Undécimo Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral., Santa Fe - Argentina, 10 y 11 de octubre de 2007. Mención Especial: El trabajo ha recibido una Mención Especial en el Concurso de trabajos presentados en el área de Ciencias Biológicas y de la Salud, subarea Medicina.