



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“REGULACIÓN CIRCADIANA DE LA CYP7A1 Y  
CYP27 EN HÍGADO DE RATA: EFECTO DE LA  
SOYA”.

T E S I S

Que para obtener el título de  
Licenciado(a) en Nutrición

P R E S E N T A

Flores Islas Isabel Monserrat

**DIRECTOR:**

**DR. ARMANDO R. TOVAR PALACIO**  
INCMNSZ. México, D. F.



Pachuca, Hidalgo.

Octubre, 2005

# INDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	1
2. Introducción	3
2.1 Colesterol	5
2.2 Regulación de la síntesis de colesterol	8
2.3 Ácidos Biliares	9
2.3.1 Síntesis de Ácidos Biliares	9
2.3.2 CYP7 A1 (7 $\alpha$ -Hidroxilasa de colesterol)	14
2.3.3 CYP27 A1 (27 $\alpha$ -Hidroxilasa de colesterol)	15
2.4 Regulación Nutricia de la CYP7A1 y CYP27A1	16
2.4.1 Ritmo circadiano de 7 $\alpha$ -Hidroxilasa de colesterol	16
2.5 Soya	17
2.5.1 Composición de la Soya	17
2.6 Soya e hiperlipidemia	21
2.6.1 Mecanismos propuestos para la disminución de Hipercolesterolemia por la Soya	22
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6. Metodología	28
6.1 Tipo de estudio.	28

6.2 Población de estudio	28
6.3 Diseño del estudio	28
6.3.1 Tratamientos	29
6.4 Alimentación	29
6.5 Extracción de órganos y mediciones fisiológicas	31
6.6 Selección de la muestra	31
6.6.1 Criterios de inclusión	31
6.6.2 Criterios de exclusión	31
6.6.3 Criterios de eliminación	31
6.7 Diagrama de bloques	32
6.8 Métodos de recolección de datos	33
6.8.1 Determinación del peso corporal	33
6.8.2 Determinación del consumo de alimento	33
6.8.3 Obtención de muestras y tejidos	33
6.8.4 Determinación de parámetros bioquímicos	33
6.8.4.1 Determinación de colesterol y triglicéridos en tejidos	33
6.9 Consideraciones éticas	36
6.10 Análisis estadístico	36
7. Resultados	37
7.1 Consumo de alimento	37
7.2 Peso Corporal	37
7.3 Colesterol en suero	40
7.4 Triglicéridos en suero	42
7.5 Colesterol en hígado	43
7.6 Triglicéridos en hígado	44
7.7 Análisis por Northern Blot de la expresión génica de CYP7A1 y CYP 27A1 en hígado de rata.	45

8. Discusión	46
9. Conclusiones	49
10. Referencias Bibliográficas	50
11. Anexos	60
I. Extracción de lípidos por el Método de Folch	60
II. Extracción de RNA	62
II A. Reactivo para la extracción de RNA total	64
III. Cuantificación de RNA	66
IV. Electroforesis de RNA	67
V. Northern Blot	68
V A. Reactivos para cuantificación de RNA	69
V B. Transferencia de RNA del Gel a la membrana	70
V C. Reactivos para transferencia del Gel a la membrana	71
V D. Marcaje con sondas (REDIPRIME II)	72
V E. Reactivos para el marcaje con sonda	74

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Estructura del Colesterol	6
Figura 2. Estructura bioquímica del Colesterol	6
Figura 3. Principales rutas biosintéticas de ácidos biliares	11
Figura 4. Fisiología de los ácidos biliares	13
Figura 5. Las cascadas de receptores nucleares	14
Figura 6. Comparación cuantitativa de la actividad de 7 alpha-hidroxilasa	16
Figura 7. Composición de la Soya	17
Figura 8. Efecto de la proteína de Soya sobre la expresión de la CYP7A1 y CYP27A1	24
Figura 9. Registro del consumo de alimento	38
Figura 10. Ganancia de peso	40
Figura 11. Concentración de Colesterol en Suero	41

Figura 12. Concentración de Triglicéridos en Suero	42
Figura 13. Concentración de Colesterol en Hígado	43
Figura 14. Concentración de Triglicéridos en Hígado	44
Figura 15. Expresión génica de CYP27A1	45
Figura 16. Expresión génica de CYP7A1	45
Tabla 1. Contenido nutrimental del aislado de proteína de Soya por cada 100gr.	18
	19
Tabla 2. Aislado de proteína de Soya	30
Tabla 3. Contenido de las dietas	35
Tabla 4. Contenido de reactivos	

# 1. RESUMEN

El colesterol es eliminado del organismo en forma de ácidos biliares, siendo el hígado el órgano central de la regulación de la homeostasis del colesterol. La transformación de colesterol en ácidos biliares se puede llevar a cabo por 2 vías diferentes: la neutra (conocida también como clásica) y la ruta ácida (o alterna). En la primera, el primer paso y el más importante es la hidroxilación en la posición 7 del colesterol, reacción catalizada por la enzima 7  $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) que constituye la reacción limitante en la síntesis de ácidos biliares y la ruta ácida, que tiene como reacción limitante a la enzima 27  $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27A1).

Estudios previos en humanos y en animales que consumen proteína de soya presentan menores concentraciones de colesterol en sangre y en tejido hepático por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar si la proteína de soya o la presencia de altas concentraciones de colesterol regulan la expresión génica de las enzimas CYP7A1 y CYP27A1 en hígado de rata. Para el diseño experimental se utilizaron 96 ratas macho de la cepa Wistar que fueron divididas en 4 grupos de 24 ratas cada uno. 1) Ratas alimentadas con 20% de caseína, 2) Ratas alimentadas con 20% de proteína de soya 3) Ratas alimentadas con 20% de caseína + un exceso de colesterol (2% de colesterol) y 4) Ratas alimentadas con 20% de proteína de soya + 2% de colesterol. Los 4 grupos fueron alimentados por 20 días en horario restringido y después se obtuvieron muestras de sangre e hígado para determinar las concentraciones de colesterol y triglicéridos; en hígado se hizo la extracción de RNA para evaluar la expresión de CYP7A1 y CYP27A1. Los resultados muestran que la presencia de altas concentraciones de colesterol en hígado de ratas alimentadas con caseína son los inductores de las enzimas CYP7A1 y CYP27A1 responsables de la síntesis de ácidos biliares más que el tipo de proteína dietaria. Las concentraciones de colesterol fueron más altas en los animales alimentados con caseína que con proteína de soya. Los grupos que fueron alimentados con la dieta alta en colesterol

presentaban concentraciones más altas de colesterol e inducían principalmente la ruta alterna (CYP27A1) para eliminar las concentraciones de colesterol en el organismo. Por lo que se concluye que la síntesis de ácidos biliares esta primariamente determinada por la concentración de colesterol dietario, y en un menor grado por el tipo de proteína consumida, lo que indica que la proteína de soya regula la eliminación de colesterol a través de la formación de ácidos biliares por otro mecanismo que quizá involucre al transporte de estos a nivel intestinal.

Palabras clave: 7  $\alpha$ -hidroxilasa, 27  $\alpha$ -hidroxilasa, ácidos biliares, colesterol, soya.



## 2. INTRODUCCIÓN

### **La evolución de la nutrición y el desarrollo de la nutriología molecular.**

El ser humano, desde su aparición en la Tierra, ha variado considerablemente su tipo de alimentación y la manera en que consume la energía aportada por los alimentos de acuerdo a la época, condiciones geográficas, climatológicas, sociales y culturales en las que le ha tocado vivir.

Hace aproximadamente un millón de años nuestros ancestros que migraron de Siberia a través del Estrecho de Bering hacia Norteamérica tenían un alto consumo de proteínas de origen animal debido a la caza del elefante y del mamut. Estos cazadores inicialmente poblaron muy escasamente los continentes Norte y Sudamericanos y al ir mejorando las condiciones climáticas la población de estos cazadores empezó a incrementar y al mismo tiempo hubo la desaparición de 31 géneros de grandes herbívoros. Existe evidencia arqueológica de que alrededor de 6,000 años A. C se inició el cultivo del maíz, de la calabaza, del chile y de otras plantas lo que permitió el desarrollo de otras culturas en Mesoamérica.

Aproximadamente, 1500 años A. C hubo un desarrollo suficiente de la agricultura que permitió que se expandieran diferentes culturas con un fondo genético similar que contenía genes amerindios y que se expandieron con el tiempo a pesar de la instalación de grupos españoles y europeos años después. Esta carga de genes amerindios sirvió como un mecanismo de selección natural sobreviviendo solo aquellos humanos en los que se llevó a cabo la adaptación al medio ambiente, sin embargo, en la actualidad este mismo fondo genético se ha vuelto desventajoso sobre todo en nuestra sociedad donde el aporte calórico dado por consumo de productos industrializados, incluyendo bebidas endulzadas con azúcares refinados, grasas saturadas y un aumento en el consumo del huevo ha aumentado considerablemente en los últimos años lo que se ha asociado con el desarrollo de la

obesidad y enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, cardiovasculares, tumores malignos (1), cálculos biliares entre otras enfermedades, ocasionando el denominado síndrome del Nuevo Mundo (2). En estas patologías el factor dietético adquiere gran importancia y ha despertado el interés tanto del clínico como del investigador en ciencias básicas para entender la relación existente entre la dieta y la expresión genética.

Hoy en día sabemos que un estado nutricional adecuado depende de la disponibilidad, ingestión, calidad y cantidad de nutrientes contenidos en los alimentos, cuya absorción, transporte, metabolismo, transformación y excreción son controlados a nivel genético, en donde existe variación entre individuos y poblaciones con diferente trasfondo evolutivo, observándose siempre una respuesta metabólica común para mantener de esta manera una homeostasis, aunque en diferente grado ante un cambio en la dieta (3, 4)

Es por tanto una necesidad el conocer los mecanismos de interacción entre los nutrientes y los genes para tener éxito en las intervenciones dietarias con fines terapéuticos en este tipo de enfermedades. Con los avances recientes de la Biología molecular se ha desarrollado una nueva área de la Nutrición denominada Nutriología Molecular, cuyos objetivos son:

- 1) Estudiar los sitios específicos en los cuales los nutrientes afectan la vía de expresión génica de proteínas importantes en el metabolismo.
- 2) Conocer cuales son los mecanismos de regulación de algunos genes por nutrientes.
- 3) Definir las necesidades de nutrientes, así como determinar las consecuencias de la ingestión de un nutriente en exceso o en carencia.

Actualmente la regulación de la expresión de gen es por nutrientes, es una nueva frontera para la siguiente generación de nutricionistas.

Los constituyentes de la dieta que se han estudiado con mayor profundidad sobre los mecanismos de la vía de expresión génica son los ácidos grasos poliinsaturados, el colesterol, la glucosa (5) y los aminoácidos, así como algunos nutrimentos inorgánicos así como también algunas vitaminas incluyendo principalmente a la vitamina A y D, entre otros. (6)

## 2.1 COLESTEROL

El colesterol es un lípido de gran importancia tanto para la morfología como la fisiología de la célula, así como también para que se lleve a cabo el correcto desarrollo de los organismos (7). En el hígado se lleva a cabo la regulación de la homeostasis del colesterol el cual desempeña muchas funciones en el organismo, incluyendo el ser:

- Un componente esencial de las membranas celulares (**Figura 1**).
- Un precursor de los cinco tipos principales de hormonas esteroideas: progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides.
- Un precursor de la vitamina D (8).
- Precursor de los ácidos biliares.

Los organismos superiores tienen dos vías de adquisición del colesterol, ya sea mediante la dieta, o bien, si la dieta no lo contiene, tienen la capacidad de sintetizarlo a partir de acetyl-CoA (9). Por lo tanto, el organismo requiere de un aporte continuo de colesterol.

Existen mecanismos reguladores que tratan de equilibrar la cantidad de colesterol que el organismo fabrica diariamente a partir de la ingesta dietética así como la cantidad excretada en la bilis o como sales biliares para facilitar el control de nivel de colesterol plasmático.

La falla de estos mecanismos de control puede dar lugar a una elevación de colesterol plasmático y a un aumento del riesgo de enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica entre otras.

El colesterol es una molécula esteroidea de 27 carbonos. Los 27 átomos de carbono del colesterol provienen exclusivamente del acetil-CoA (**Figura 2**). Se trata de uno de los grandes grupos de compuestos derivados del grupo de isopreno de cinco carbonos. El colesterol se sintetiza en la mayoría de los tejidos (excepto en los glóbulos rojos), pero el lugar principal es el hígado. También, el intestino es un órgano importante en la síntesis del colesterol. Las paredes arteriales también pueden sintetizar el colesterol, lo que podría relacionarse con el cuadro patológico de la aterosclerosis (7).

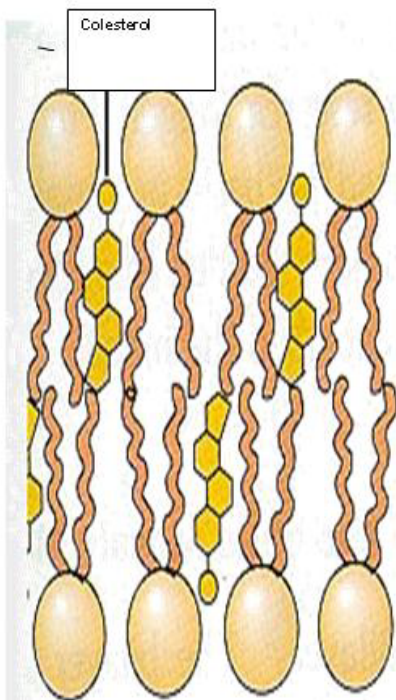


Figura 1. Estructura del colesterol (colest-5-en-3-b-ol)  
Tomado de Devin T.M. "Bioquímica"

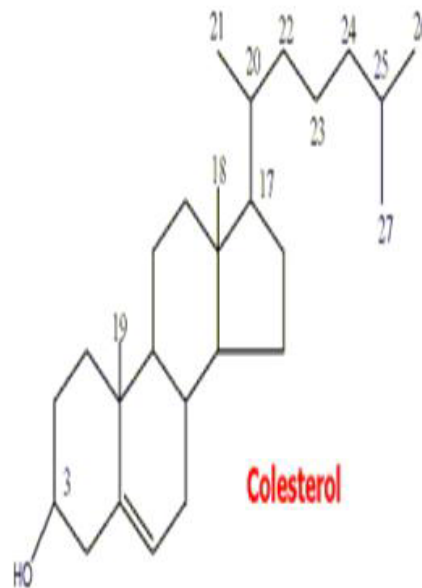


Figura 2. Estructura bioquímica del colesterol  
(colest-5-en-3-b-ol)

Tomado de Devin T.M. "Bioquímica"

El organismo sintetiza de 1.0 a 1.5 g de colesterol por día, o sea, 3 a 4 veces más que el contenido de colesterol de una dieta normal que es de unos 300 mg por día. Sin embargo, el sistema de síntesis de colesterol tiene un mecanismo regulador dependiente, en parte, de la cantidad de colesterol absorbida en el intestino. Cuando el colesterol dietético es bajo, su síntesis en el organismo aumenta y lo opuesto sucede en el caso contrario; de esta manera, hay una tendencia a sostener el colesterol corporal a un nivel relativamente constante (10-13). Del colesterol metabolizado, cerca del 50% es convertido en ácidos biliares, el 10% es utilizado para la síntesis de hormonas esteroideas; y el restante es excretado junto con los ácidos biliares y fosfolípidos en bilis por disposición en heces (14). La biosíntesis de colesterol en humanos es sensible a varios factores de la dieta. Al añadir colesterol a la dieta en concentraciones fisiológicas se produce un modesto incremento en la concentración de colesterol circulante, con una ligera inhibición recíproca de la síntesis (15).

Cuando el colesterol se obtiene a través de la alimentación, se absorbe en el intestino delgado por difusión pasiva o por medio de transporte a través de proteínas específicas. El colesterol es entonces transportado por el sistema linfático en forma de quilomicrones y posteriormente vía sanguínea hasta el hígado como quilomicrones remanentes. En el hígado el colesterol se almacena, o si se requiere es exportado como complejos lipoprotéicos que se denominan lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoprotein), las cuales tienen un contenido elevado de triglicéridos (Tg) y colesterol (16). Las partículas VLDL durante su trayecto en el organismo son convertidas a lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein), por medio de la lipasa lipoprotéica, enzima que remueve triglicéridos de las VLDL (7). Finalmente las partículas LDL son endocitadas en todas las células que requieren colesterol por medio de un receptor específico para partículas LDL. Un defecto genético en este receptor es una de las causas principales para el desarrollo de una enfermedad denominada hipercolesterolemia familiar. Cuando las partículas LDL se han endocitado, las vesículas que contienen a las partículas permiten la entrada de enzimas lisosomales y también ocurre

acidificación de estas (7). La consecuencia de este ataque por medio de estas enzimas es la liberación de los constituyentes de las partículas LDL, en donde el principal es el colesterol. El colesterol es esterificado y/o transportado a las membranas celulares, como son la membrana plasmática, la membrana nuclear y las membranas del retículo endoplásmico (17).

## **2.2 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL**

Existen mecanismos reguladores que tratan de equilibrar la cantidad de colesterol que el organismo consume en la dieta. Estos son como arriba se menciona la síntesis endógena de colesterol y la excreción de éste en la bilis como tal ó como sales biliares, por lo que un equilibrio adecuado facilita el control del nivel de colesterol plasmático. Cuando estos mecanismos de control no actúan adecuadamente pueden dar lugar a una elevación del colesterol plasmático y por lo tanto a un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (18).

Un aspecto central de la homeostasis lipídica en vertebrados es el control de los mecanismos de adquisición, síntesis y metabolismo del colesterol. Este control se lleva a cabo por medio de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la captura, síntesis y eliminación del colesterol. Los factores de transcripción son proteínas que se unen a segmentos específicos del ADN denominados elementos de respuesta los cuales estimulan que la enzima ARN polimerasa II sintetice la hebra del ARN utilizando como templado el ADN. Estos elementos de respuesta son regiones de 6 a 12 nucleótidos que se encuentran localizados en la región promotora de genes específicos (19).

Para el caso de la regulación del metabolismo del colesterol interviene un grupo de factores de transcripción que pertenecen a los receptores nucleares huérfanos como son los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los receptores LXR (Liver X receptors), FXR (Farnesoid X receptors) entre otros, así como también un grupo de factores de transcripción denominados proteínas que se enlazan a elementos de respuesta a esteroides (SREBPs por sus siglas en ingles de

Sterol Regulatory Element Binding Proteins). Es fundamental un balance entre estos factores para que exista un correcto equilibrio de los lípidos, particularmente de colesterol y triglicéridos (20).

## **2.3 ACIDOS BILIARES**

### **2.3.1 SÍNTESIS DE ÁCIDOS BILIARES.**

El hígado es el órgano central donde ocurre la regulación de la homeostasis del colesterol a través de la integración de las rutas de síntesis y eliminación. El principal mecanismo de eliminación del colesterol, es la de convertir a este en ácidos biliares a través de una compleja vía de reacciones acopladas (21, 22). La conversión de colesterol a ácidos biliares ocurre exclusivamente en los hepatocitos a través de una serie de 12 reacciones catalizadas por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico, mitocondria, citosol y peroxisomas. Existen dos principales vías para la biosíntesis de ácidos biliares (**Figura 3**) (23).

La principal vía biosintética de ácidos biliares, denominada clásica o neutra, inicia a través de la enzima CYP7A1, la cual únicamente se expresa en el hígado, mientras que la otra vía, denominada alterna o ácida inicia con la enzima 27 hidroxilasa (CYP27A1), la cual se expresa en varios tejidos. Los principales ácidos biliares primarios sintetizados por estas vías son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico.

La ruta clásica, que también se le conoce como neutra fue la que primero se identificó y se le conoce de esta manera porque los principales intermediarios de su ruta son esteroides neutros. En humanos se producen a través de esta vía cantidades iguales tanto de ácido cólico como ácido quenodesoxicólico. La enzima CYP7A1, es la enzima paso limitante de esta vía y pertenece al grupo de enzimas microsomales que contienen al citocromo P450 (24). Los dos ácidos biliares primarios producidos por esta vía se conjugan con la taurina o la glicina antes de que sean excretados a la

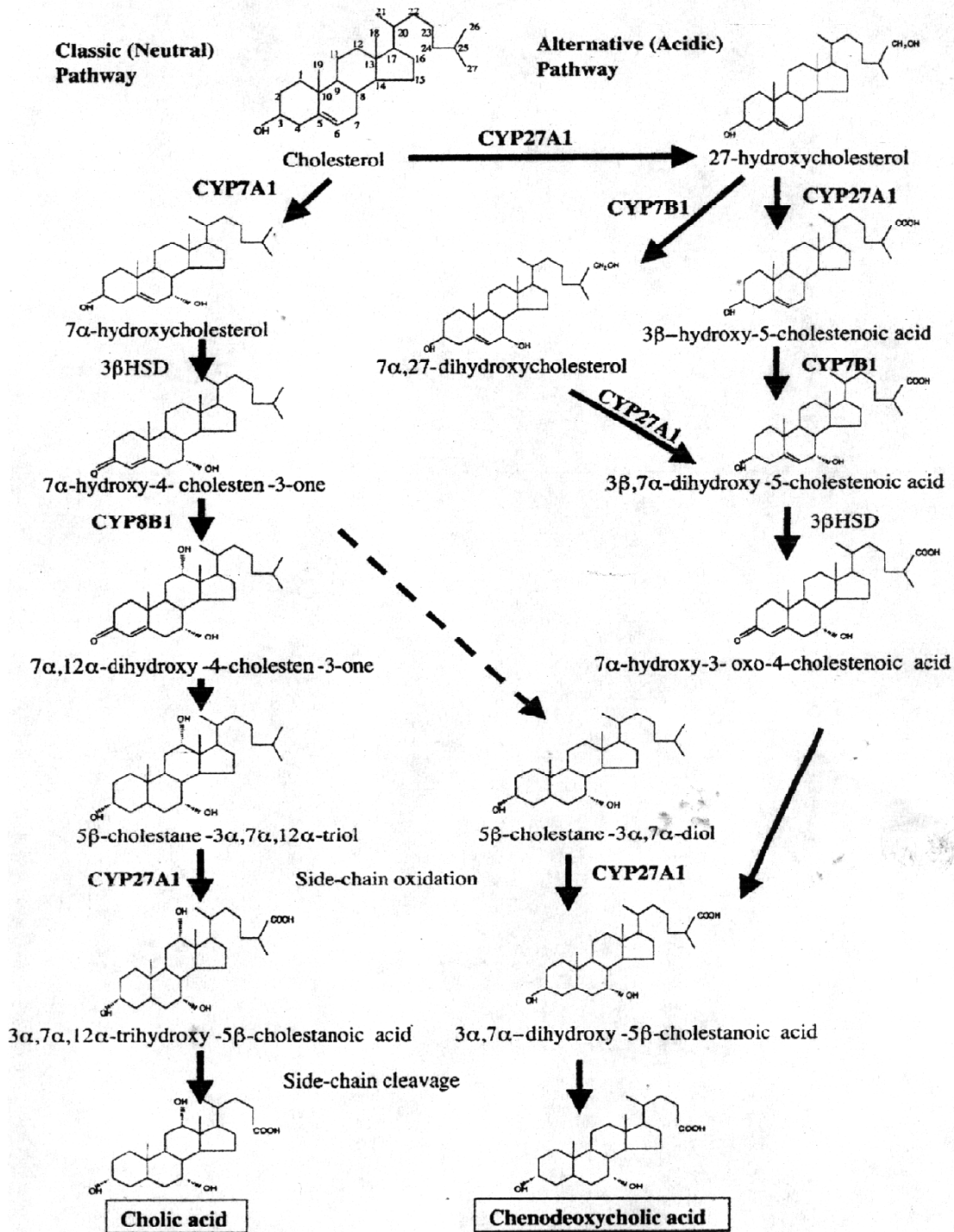
bilis. Al pH fisiológico, los ácidos biliares se encuentran como sales de sodio, y por esa razón se les denominan sales biliares (21).

La ruta alterna o ácida se identificó varios años después. A través de esta ruta se produce principalmente ácido quenodesoxicólico. La enzima paso limitante de esta vía es la CYP27A1 la cual hidroxila al colesterol en la posición 27. Esta enzima se encuentra localizada en la mitocondria. Se ha descrito que esta ruta utiliza posteriormente los mismos pasos que la vía clásica. Se ha determinado que la ruta alterna contribuye con menos del 18% de la síntesis total de ácidos biliares en humanos. Algunos estudios muestran que la vía neutra por ser la más importante está más regulada que la vía ácida (25-32).

Los ácidos biliares sintetizados en el hígado, son excretados en la bilis. La bilis está compuesta por una mezcla de sales biliares, colesterol y fosfolípidos. Se ha considerado que la mayor solubilidad de esta mezcla se obtiene cuando tiene un 60% de sales biliares, un 20% de colesterol y un 20% de fosfolípidos. Cuando estos porcentajes, en especial del colesterol se incrementan, producen la formación de cálculos biliares.

La bilis se almacena en la vesícula biliar, y su secreción al intestino la estimula la presencia de grasas en la dieta por medio de la hormona colecistocinina.



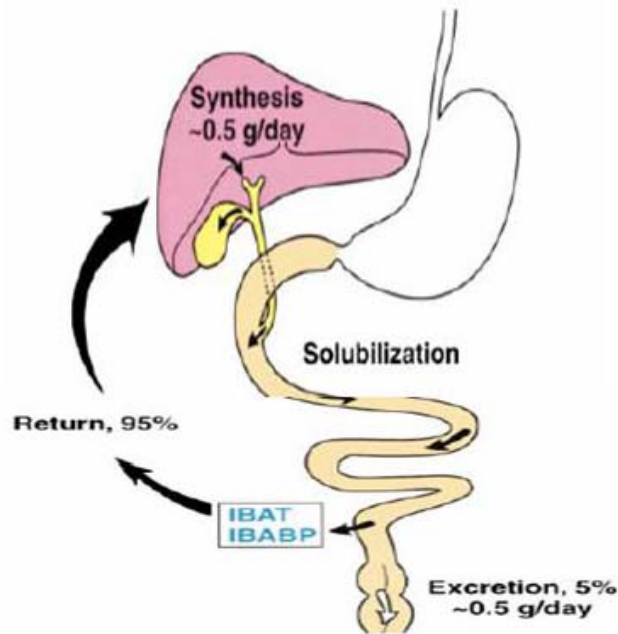


**Figura 3.** Principales rutas biosintéticas de ácidos biliares.  
Tomado de John Y.L. Chiang (1998).

Los ácidos biliares en el intestino tienen como función principal la de ser detergentes fisiológicos que facilitan la absorción, el transporte y la distribución de las grasas dietarias así como también de las vitaminas liposolubles (33-38). La bilis se secreta junto con enzimas denominadas lipasas. Esta permite la emulsificación de las grasas formando micelas, las cuales permiten que las enzimas pancreáticas como las lipasas y las colesterol esterasas entre otras, actúen sobre los triacilglicéridos y los esteres de colesterol para producir ácidos grasos y colesterol que pueden ser posteriormente absorbidos en el intestino por medio de proteínas que enlazan a estos lípidos (39). Las células que absorben a los lípidos son los enterocitos. En estas células el colesterol es convertido a oxiesteroles (Ox), y estos a su vez activan al factor de transcripción LXR, el cual activa la transcripción del gen de la proteína ABCA1 que es un transportador que permite el flujo de colesterol al lumen intestinal (40).

Los ácidos biliares del intestino son reabsorbidos, principalmente a nivel del íleon y transportados de regreso al hígado por un proceso denominado circulación enterohepática biliar (39). Es importante mencionar que los ácidos cólico y quenodesoxicólico se convierten a ácidos biliares secundarios por medio de la enzima 7  $\alpha$ -deshidroxilasa formando ácido desoxicólico y litocólico. Todos los ácidos biliares son rápidamente reabsorbidos en el íleon con excepción del ácido litocólico.

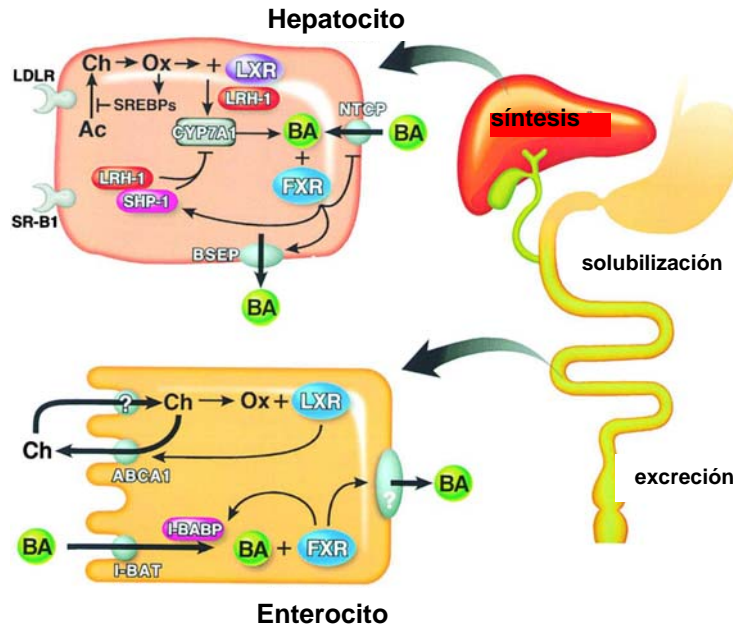
El proceso de excreción de ácidos biliares después de cada comida se repite continuamente y se ha determinado que el 95% de los ácidos biliares se reabsorben. El restante 5% se pierde en las heces por lo que deben de resintetizarse ácidos biliares en el hígado (32), (**Figura 4** (41) ).



**Figura 4.** Fisiología de los ácidos biliares.

Tomado de David W. Ruussell (1999).

En los hepatocitos los ácidos biliares son extraídos de la sangre portal por el transportador basolateral denominado NTCP (Sodium taurocholate cotransport peptide). El aumento de las concentraciones de ácidos biliares dentro del hepatocito activa al factor FXR. El FXR induce la expresión de SHP (small heterodimer partner), que es un receptor nuclear que suprime la síntesis de ácidos biliares antagonizando la función de LRH-1 (mouse liver-related homolog), un receptor huérfano requerido por la expresión de CYP7A1 (**Figura 5**) (42, 43). Cuando el colesterol se acumula en los hepatocitos, éste se oxida para crear oxisteroles. Los oxisteroles activan LXR a través de los heterodímeros LXR/RXR para activar genes como la enzima CYP7A1 incrementando la eliminación de colesterol (44). Este mecanismo es fundamental ya que se ha observado en animales deficientes en la enzima CYP7A1 que acumulan colesterol en hígado. Así, fármacos específicos para los receptores FXR y LXR en un futuro podrían jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis del colesterol y por lo tanto en enfermedades del corazón.



**Figura 5.** Las cascadas de receptores nucleares regulan la absorción y degradación de Colesterol y Ácidos Biliares. Tomada de Ajay Charla y col. (2000).

### 2.3.2 CYP7A1 (7- $\alpha$ HIDROXILASA DE COLESTEROL).

Esta enzima cataliza la hidroxilación del colesterol en la posición 7. Como arriba se ha mencionado es el paso limitante de la vía clásica de la síntesis de ácidos biliares y su catálisis la lleva el citocromo P450 monooxigenasa el cual requiere al NADPH citocromo P450 reductasa y oxigenomolecular. Esta enzima como también se ha mencionado se regula por las concentraciones de ácidos biliares que regresan al hígado a través de la circulación enterohepática. La actividad de esta enzima se afecta por hormonas tales como la tiroxina, los glucocorticoides, y la insulina. Se ha determinado que la vida media de esta enzima es de 2 a 3h y que puede regularse por un mecanismo de fosforilación-defosforilación. Se ha clonado el ADN complementario y este contiene 3 561 Pb. La secuencia de aminoácidos que se dedujo del marco abierto de lectura mostró que esta enzima tiene 503 aminoácidos, codificado por el gen CYP7A1, el cual contiene 11 Kb.

La expresión de su gen produce un ARN mensajero de alrededor de 4 kb. Se ha demostrado que la disminución de ácidos biliares utilizando resinas como la colestiramina induce las concentraciones del RNAm de la CYP7A1 entre 2 y 3 veces. Se ha aislado la región promotora del gen de la CYP7A1 y se han localizado varios elementos de respuesta que unen algunos receptores nucleares. Se han determinado sitios para los factores de transcripción LRH-1 y LXR- $\alpha$ , así como también del receptor nuclear FXR. Los estudios muestran que el FXR es un regulador negativo de la transcripción de este gen, mientras que el LXR- $\alpha$  es un modulador positivo de su transcripción. Por lo tanto, elevadas concentraciones de colesterol en el hígado podrían estimular la expresión del gen de la CYP7A1 a través de LXR- $\alpha$  (45-47).

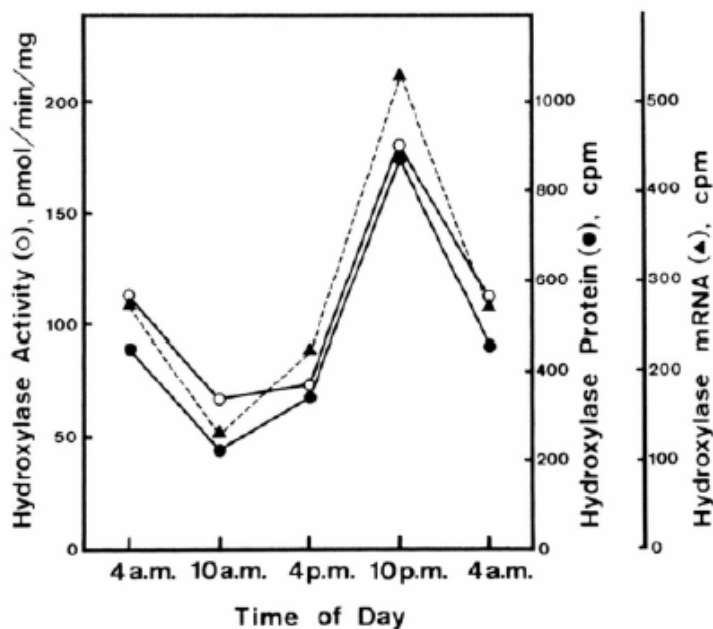
### **2.3.3 CYP27A1 (27- $\alpha$ HIDROXILASA DE COLESTEROL).**

La enzima CYP27A1 es localizada en el interior de la membrana mitocondrial y requiere de la enzima ferredoxina reductasa y NADPH para su actividad. La enzima 27- hidroxilasa mRNAs está presente en niveles altos en hígado, duodeno y glándula adrenal, y en muchos niveles bajos del pulmón, riñón y bazo (48). La transcripción del gen CYP27A1 de la rata se reprime por ácidos biliares (49). El ADNc de la CYP7A1 es de 3000 pb. Este codifica para una proteína que contiene 533 aminoácidos. Análisis de su región promotora muestra que el gen de esta enzima lo regula el factor de transcripción HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 alpha). La deficiencia de esta enzima en humanos produce una reducción marcada de la síntesis de ácidos biliares totales y una acumulación de colestanol en los tejidos. Estos individuos se caracterizan por tener xantomatosis cerebrotendinosa debido a una acelerada aterosclerosis. En ratones knockout para esta enzima tienen una reducción muy importante en la síntesis de ácidos biliares totales.

## 2.4 REGULACIÓN NUTRICIA DE LA CYP7A1 Y CYP27A1

### 2.4.1 RITMO CIRCADIANO DE LA $7\alpha$ - HIDROXILASA DE COLESTEROL.

Estudios realizados en ratas alimentadas ad-libitum por 24 horas presentan una mayor expresión de la CYP7A1 una vez que han consumido el alimento, por lo que es probable que la dieta influya en la expresión de estas enzimas (50). Las ratas presentan una máxima actividad a las 10 p.m. la cual es de 3 a 4 veces más elevada que la actividad a las 10 a.m. (51, 52). Estos cambios se ha visto que están acompañados por un cambio en la misma proporción de su ARNm, lo que indica que el ritmo circadiano de la actividad de la  $7\alpha$  - Hidroxilasa, depende del aumento en la producción de la enzima y no en una modificación de la enzima existente, como pudiera ser una fosforilación (**Figura 6**) (53).



**Figura 6.** Comparación cuantitativa de la actividad de  $7\alpha$  - hidroxilasa, niveles de proteína hidroxilasa y niveles de RNAm de ratas machos a diferentes tiempos del día.

Tomado de Mitsuhide y col, 1990 (53).

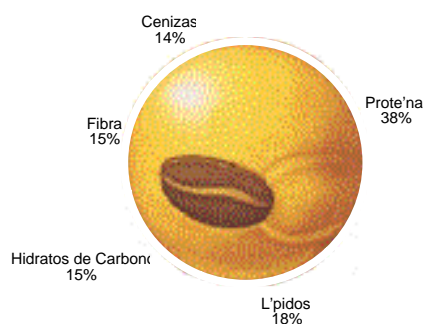
## 2.5 SOYA

El frijol de soya, hoy en día se conoce y se consume en todo el mundo y ha llegado a ser considerado no sólo como una alternativa para la alimentación mundial, sino como una ayuda para la prevención y tratamiento de muchas enfermedades crónicas (55).

El frijol de **soya** (*Glycine max*) es una leguminosa cultivada originalmente en China donde por más de 4000 años constituyó un alimento fundamental en la dieta. La proteína de soya ha llegado a ser considerada como una alternativa para el tratamiento de muchas enfermedades crónicas (56-60).

### 2.5.1 COMPOSICION DE LA SOYA

La proteína de soya es una proteína de origen vegetal con un perfil de aminoácidos que cumple con los requerimientos en humanos y en ratas. La soya contiene por cada 100 g: 38 gramos de proteína, 18 gramos de lípidos, 15 gramos de hidratos de carbono, 15 gramos de fibra, 14 gramos de ceniza, 1.00-1.47 gramos de ác. Fítico, 0.22 –0.33 gramos de saponinas, 1200- 4200 µg de isoflavonas (**Figura 7**) (61).



**Figura 7.** Composición de la soya

La proteína de soya, una proteína de origen vegetal de alto valor biológico, contiene todos los aminoácidos indispensables en una combinación también

favorable, es considerablemente más alta en proteínas que cualquier otra leguminosa (62). El tofu, el queso o requesón de soya se hace cada vez más popular y existe en muchos sabores. La leche de soya ha cobrado relevancia en la alimentación infantil (63, 64). En la **Tabla 1**, se describen los nutrimentos específicos que contiene el aislado de proteína de soya.

**Tabla 1.** Contenido nutrimental del aislado de proteína de soya por cada 100g.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Humedad	5.0 g	Cu	1.6 mg
Energía	321 kcal	Mn	1.5 mg
Proteína	88.3 g	Vit. C	0.0 mg
Lípidos	0.5 g	Tiamina	0.18 mg
Carbohidratos	2.6 g	Riboflavina	0.10 mg
Fibra dietaria	2.0 g	Niacina	1.44 mg
Ceniza	3.6 g	Ác. Pantoténico	0.06 mg
Ca	178.0 mg	Vit. B6	0.10 mg
Fe	14.5 mg	Folatos	176.1 mcg
Mg	39.0 mg	Vit. B12	0.0 mcg
P	776.0 mg	Vit. A IU	0 IU
K	1590.0 mg	Vit. A RE	0.0 RE
Na	50.0 mg	Vit. E	n/a ATE
Zn	4.0 mg		

Tomado de Soya & Oilseed Bluebook, 2000.

Componentes de la soya implicados en la regulación de los niveles de colesterol.

Entre los componentes de la soya implicados en la reducción de los niveles de colesterol se encuentran:



a) La composición de aminoácidos. Se ha postulado que ciertos aminoácidos como la lisina, incrementan los niveles de colesterol sanguíneo, mientras que la arginina contrarresta este efecto. Se ha propuesto que la cantidad de arginina presente en la soya, ayuda a que se disminuyan los niveles de colesterol (**Tabla 2**) (65). Sin embargo no se produce el mismo efecto cuando se ingiere una mezcla de aminoácidos que cuando ingiere la proteína completa, por lo tanto se sugiere que puede haber otros factores involucrados.

**Tabla 2.** Aislado de proteína de soya

<b>a.a</b>	<b>Unidad (g)</b>	<b>a.a</b>	<b>Unidad (g)</b>
Triptófano	1.12	Valina	4.10
Treonina	3.14	Arginina	6.67
Isoleucina	4.25	Histidina	2.30
Leucina	6.78	Alanina	3.59
Lisina	5.33	Ác. Aspártico	10.20
Metionina	1.13	Ác. Glutámico	17.45
Cistina	1.05	Glicina	3.60
Fenilalanina	4.59	Prolina	4.96
Tirosina	3.22	Serina	4.59

**Nota:** Contenido de aminoácidos (a.a) por 100 g.  
Tomado de Soya & Oilseed Bluebook, 2000.

- b) La fibra de la soya. En individuos con hipercolesterolemia moderada, la ingesta de polisacárido de soya puede disminuir en un 5 a 11% el colesterol total (66).
- c) Las saponinas (moléculas esteroideas con carbohidratos) asociadas a la proteína vegetal, se cree incrementan la excreción de ácidos biliares y por lo tanto disminuyen el colesterol (67).

- d) El ácido fítico. Este ácido, presente en cantidades variables en alimentos de soya, quela metales como el hierro, calcio, magnesio y zinc e impide su absorción intestinal. Las dietas deficientes en cobre o altas en la relación zinc/cobre están asociadas con hipercolesterolemia, sugiriendo que el ácido fítico al quelar el zinc, permite que se absorba más cobre y altere la relación zinc/cobre (68).
- e) Los inhibidores de la tripsina: Se ha sugerido que éstos inhibidores, presentes en la proteína de la soya, incrementan la colescistocinina, que estimula la contracción de la vesícula biliar y por tanto la salida de ácidos biliares (69).
- f) Las isoflavonas: Fitoestrógenos presentes en la soya, varían grandemente en su potencia estrogénica y efectos fisiológicos. Se cree que éstos compuestos, disminuyen los niveles de colesterol e incrementan la actividad del receptor de LDL-colesterol. (63).
- g) Las globulinas: Las principales proteína de la soya, son dos globulinas, 11S y 7S. Se ha encontrado una disminución en los niveles de colesterol, en animales con dieta hipercolesterolémica, alimentados con la globulina 7S.

## **2.6 SOYA E HIPERLIPIDEMIA**

La enfermedad cardiovascular es uno de los principales problemas de salud en todo el mundo, por lo que ha habido un gran enfoque sobre la intervención de la dieta para reducir el riesgo de enfermedades del corazón. Uno de los principales factores de riesgo son concentraciones elevadas de lípidos en sangre. El consumo de proteína vegetal en lugar de proteína animal se ha asociado con un menor riesgo de enfermedades del corazón. Actualmente se recomienda el consumo de ácidos grasos, fibra dietaria, isoflavonas y antioxidantes para reducir las concentraciones de lípidos en sangre. El frijol de soya y los alimentos a base de soya aportan todos estos nutrimentos. Resultados de un meta-análisis de diversos estudios en adultos y niños que han utilizado proteína de soya para disminuir las concentraciones de colesterol han mostrado que el consumo de 25 g de proteína de soya por día reducen las concentraciones de colesterol total por 9.3% y por un 12.9% el colesterol

LDL (colesterol malo) (54). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) juegan un papel importante en el proceso aterosclerótico. Las LDL penetran las paredes de los vasos sanguíneos donde se oxidan por radicales libres y se acumulan como material que bloquea el lumen de los vasos sanguíneos. Estos efectos son mayores en pacientes con hipercolesterolemia severa, reduciendo hasta en un 19.6% los niveles de colesterol total. Estos resultados muestran que individuos con hipercolesterolemia severa muestran una mayor respuesta al consumo de proteína de soya.

El consumo de proteína de soya reduce por un 10.5% las concentraciones de triglicéridos. Aparte de reducir los niveles de colesterol la proteína de soya por tener bajas concentraciones de metionina, aminoácido precursor de la homocisteína, también reduce los niveles de homocisteína total la cual es un factor de riesgo independiente de daño cardiovascular. Todos estos efectos en conjunto reducen el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares al mantener concentraciones favorables de las diversas lipoproteínas, y a la acción antioxidante de las isoflavonas que contiene la soya sobre las lipoproteínas en el endotelio vascular reduciendo su aterogenicidad. La FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos de América emitió la declaración que una dieta baja en grasa saturada junto con 25 g de proteína pueden reducir el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. Actualmente se recomienda el consumo de alimentos que contienen soya en centros de rehabilitación cardíaca.

Ahora bien la pregunta es ¿cómo? se disminuyen los niveles de colesterol. Aunque existen evidencias convincentes de que la proteína de soya disminuye los niveles elevados de colesterol, aún no se ha identificado exactamente como es que se lleva a cabo esta reducción. Las investigaciones se han centrado en el estudio de ciertos componentes de la soya y los mecanismos por los cuales se disminuye la hipercolesterolemia.

## 2.6.1 MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA DISMINUCIÓN DE HIPERCOLESTOROLEMIA POR LA SOYA.

Para responder al “como” la soya reduce la hipercolesterolemia se han propuesto varios mecanismos (63):

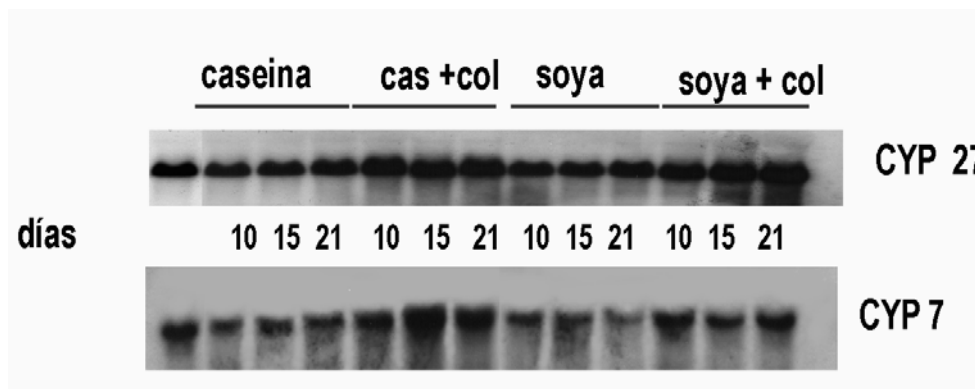
- i. **Cambios en el metabolismo del colesterol.** Se ha revelado un incremento en la remoción de LDL y VLDL-colesterol e incremento en el receptor para las apolipoproteínas B y E.
- ii. **Efectos hormonales.** Se ha aceptado que los estrógenos disminuyen LDL-colesterol e incrementan HDL-colesterol, las isoflavonas de la soya pueden actuar de manera similar a los estrógenos. Por otro lado se ha propuesto que la proteína de soya incrementa los niveles de tiroxina y que al incrementar la tiroxina se disminuyen los niveles de colesterol plasmático, de manera similar a como ocurre en el hipertiroidismo.
- iii. **Regulación de los receptores de LDL-colesterol.** Se ha propuesto que la proteína de la soya incrementa los receptores para LDL-colesterol, dando como resultado un incremento en la remoción de LDL-colesterol de la sangre.
- iv. **Estimulación de la excreción de ácidos biliares.** Se ha revelado que comparado con la caseína, la proteína de soya incrementa la excreción fecal de ácidos biliares. Esto hace que el colesterol sea removido del organismo.

Este último mecanismo es el énfasis de la presente investigación. Estudios en el Depto. de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en animales alimentados con dietas que contienen como fuente de proteína a la proteína de soya han demostrado el efecto hipocolesterolémico de la proteína de soya comparada con una proteína de origen animal como es la caseína. Estudios en ratas con síndrome nefrótico experimental, el cual se caracteriza por una importante elevación de colesterol y triacilglicéridos en suero, el consumo de proteína de soya en estos animales previno la elevación de ambos lípidos en alrededor de un 50% (70-72). Estos cambios se asociaron con una

disminución de la expresión del factor de transcripción SREBP-1 en el hígado de estos animales.

Además, también se ha observado que el consumo de proteína de soya disminuye la acumulación de lípidos en el hígado en comparación de animales alimentados con caseína los cuales desarrollan esteatosis hepática (70). Este efecto se ha observado aún en animales que presentan una gran resistencia a la insulina (73). El análisis de la composición de lípidos en el hígado revela que la alimentación con una dieta cuya fuente de proteína sea la soya disminuye las concentraciones hepáticas tanto de triacilglicéridos como de colesterol. Esto implica que existen mecanismos específicos como se ha indicado arriba que muestran que el consumo de proteína de soya disminuye las concentraciones en especial de colesterol.

Estudios preliminares en nuestro laboratorio han tratado de determinar como la proteína de soya afecta las vías tanto de síntesis como de excreción de ácidos biliares. Los datos muestran que al consumir una dieta con elevado contenido de colesterol y que además contenga proteína de soya elevada significativamente la expresión de la CYP27A1 (**Figura 8**).



**Figura 8.** Efecto de la proteína de soya sobre la expresión de la CYP7A1 y CYP27A1

Tomado de la tesis para maestría de M. en C. Arellano L., 2004.

Sin embargo aún faltan mucho más estudios para determinar con una mayor precisión como el consumo de proteína de soya afecta la expresión de genes del metabolismo de los ácidos biliares.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe gran evidencia de que en la población de nuestro país debido al incremento en el desarrollo de la obesidad, esto ha traído como consecuencia un aumento en el número de persona que están desarrollando enfermedades crónico-degenerativas como son la diabetes, la hipertensión, las hiperlipidemias y las enfermedades cardiovasculares entre otras. El costo económico de esta “epidemia” que esta ocurriendo en México será muy grande, por lo que es muy importante el tratar de buscar alternativas para prevenir que esta situación siga incrementando.

Uno de los grandes conceptos de que se esta presentando en la actualidad en el mundo es que para muchas de estas enfermedades primero se les debe atacar utilizando las herramientas de las modificaciones dietarias antes de iniciar terapias con medicamentos. Por lo que se esta en la búsqueda de alimentos que tengan propiedades funcionales y que prevengan o retrasen el desarrollo de alguna de las enfermedades crónico degenerativas. La evidencia epidemiológica y experimental demuestra que la proteína de soya tiene propiedades específicas para disminuir la concentración de colesterol en sangre. Sin embargo no se conocen claramente los mecanismos a través de los cuales ejerce este efecto.

Se ha propuesto que uno de los mecanismos por los cuales la proteína de soya disminuya el colesterol sea a través de un aumento en la excreción de los ácidos biliares. Sin embargo, se desconoce si es la presencia de la proteína de soya o la presencia del colesterol los responsables de la regulación de los genes de las enzimas paso limitando en las síntesis de ácidos biliares como son la CYP7A1 y la CYP27A1. Por lo que es importante el tener este conocimiento para entender el mecanismo por el cual la proteína de soya ejerce su efecto hipolipemiente. Se ha establecido como se indicó en la introducción que la actividad y la expresión de la CYP7A1 presentan un ritmo circadiano, en donde la máxima actividad se encuentra alrededor de las 10:00 pm y la menor a las 10:00 am. Esto implica que posiblemente el ciclo coincida con el ciclo de alimentación de las ratas las cuales ingieren la

mayoría de su alimento en la fase de oscuridad que normalmente en un laboratorio inicia después de la 7:00 pm. Por lo que al invertir el ciclo de alimentación de las ratas se pueda homogeneizar el lapso en el que los animales consumen su dieta y se pueda observar en un periodo corto de tiempo después del inicio de la ingestión de la dieta las diferencias en la expresión de los genes de la CYP7A1 y la CYP27A1 cuando los animales consumen una dieta con proteína de soya ó con caseína.

#### **4. HIPÓTESIS**

El consumo de proteína de soya estimulará la expresión génica de CYP7A1 y CYP27A1 aumentando la excreción de colesterol y con ello la síntesis de ácidos biliares a un corto plazo en ratas que consuman un exceso de colesterol en comparación de un grupo de ratas alimentadas con una dieta cuya fuente de proteína sea la caseína utilizando horario restringido.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general.**

- Evaluar el efecto del consumo de la proteína de soya a corto plazo sobre la expresión de la CYP7A1 y la CYP27A1 en hígado de rata con un horario restringido en comparación con un grupo de ratas alimentadas con caseína.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto del consumo de proteína de soya sobre la expresión de CYP7A1 y CYP27A1 a diferentes horas del día.
- Determinar las concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero e hígado de ratas alimentadas con proteína de soya.



## **6. METODOLOGIA**

### **6.1 Tipo de estudio**

El estudio es de tipo experimental y longitudinal. Se llevó a cabo con un seguimiento que duró un periodo de 3 días ad-libitum y 20 días de horario restringido.

### **6.2 Población de estudio**

Para el desarrollo de este estudio, se usaron 96 ratas Wistar macho de 4 semanas de vida provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

### **6.3 Diseño del estudio**

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ). Los animales (ratas Wistar) se mantuvieron en el Bioterio localizado en el departamento de Investigación Experimental y Bioterio del mismo Instituto.

Condiciones óptimas:

- Temperatura y humedad controladas 18-21°C, acceso a alimento (horario restringido), acceso a agua (horario ad libitum), ciclo de luz oscuridad de 12 h., sistema de presión negativa de aire en los cuartos, mantener los cuartos limpios, jaulas de metal individuales, el espacio en la jaula debe ser suficiente dependiendo del número y el tamaño de los animales.

El horario restringido se llevó a cabo de la siguiente manera: Los animales fueron pesados así como la dieta consumida a las 6:00 am. A las 7:00 am se les introdujo a su jaula el comedero lleno conteniendo la dieta experimental correspondiente. A las 3:00 pm los comederos se retiraban y de esta manera los animales permanecían en ayuno hasta el siguiente día donde se repetía el mismo proceso. Con la adaptación por 20 días los animales aprendieron a consumir la misma cantidad de dieta que se ha observado cuando estos tienen su dieta a libre demanda. Por otro lado el día que se obtienen los tejidos se observó claramente que todos los animales

tenían llenos los estómagos con lo que se verificó que el efecto que se pueda observar esta relacionado con el consumo de la dieta. Es importante enfatizar que las ratas tuvieron disponible las 24 hrs. del día agua.

### 6.3.1 Tratamientos

Fueron divididos en 4 grupos con base en el tipo de dieta que se les suministró de la siguiente manera:

Grupos con dieta normal:

- Grupo 1 : 12 ratas, Caseína 20 %
- Grupo 2 : 12 ratas, Soya 20%

Grupos con dieta alta en Colesterol:

- Grupo 3 : 12 ratas, Caseína 20%, colesterol 2%
- Grupo 4 : 12 ratas, Soya 20%, colesterol 2%

La concentración de los nutrimentos de cada una de estas dietas se estableció de acuerdo con los requerimientos de animales de laboratorio establecidos por el National Research Council de los Estados Unidos (74). Es importante enfatizar que con el 20% de caseína o proteína de soya se cubre el requerimiento de la rata para mantenerse con un adecuado crecimiento y tener un balance de nitrógeno positivo.

### 6.4 Alimentación

Las dietas están compuestas de la siguiente manera:

Las dietas que contienen caseína ó soya fue de un 20%, a las otras dietas se les adicionó un 2% de colesterol, se prepararon de acuerdo a las proporciones como se indica en la **Tabla 3**. Como fuente de proteína, se utilizó: caseína libre de vitaminas (Harlan) y proteína aislada de Soya; Como fuente de Hidratos de Carbono: Almidón y Dextrosa; Como fuente de lípidos: Aceite de maíz (comercial): Cloruro de colina.

La forma de preparación, se llevó a cabo por la homogenización de ingredientes durante 20 minutos a velocidad 2 y se almacenaron a 4°C.

A los animales se les proporcionó la dieta en polvo en comederos de acero inoxidable.

**Tabla 3.** Contenido de las dietas (g/100 g de dieta)

	<b>Caseína</b>	<b>Soya</b>	<b>Caseína + colesterol</b>	<b>Soya + colesterol</b>
Proteína	22	23	22	23
Aceite de maíz comercial	5	5	5	5
Colesterol	-	-	2	2
Mezcla de minerales	5	5	5	5
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1
Citrato de colina	0.165	0.165	0.165	0.165
Dextrosa anhidra	33.5	33	32.5	31.83
Almidón de maíz	33.335	32.835	32.335	32

Al terminar el tiempo de estudio de 20 días, se decapitaron las ratas en cuatro diferentes tiempos después de que iniciaron el consumo de su dieta. Estos tiempos fueron:

- Tiempo 1: 0 (ayuno)
- Tiempo 2: 60 min.
- Tiempo 3: 90 min.
- Tiempo 4: 120 min.

### **6.5 Extracción de órganos y mediciones fisiológicas**

Se llevó a cabo un registro diario de aumento de peso y consumo de alimentos.

Determinaciones:

- Hígado: Colesterol, triglicéridos y expresión génica de CYP7A1 y CYP27A1.
- Suero: Colesterol y triglicéridos

### **6.6 Selección de la muestra**

#### **6.6.1 Criterios de inclusión.**

- Ratas machos Wistar de 120 a 150 g, sanas.

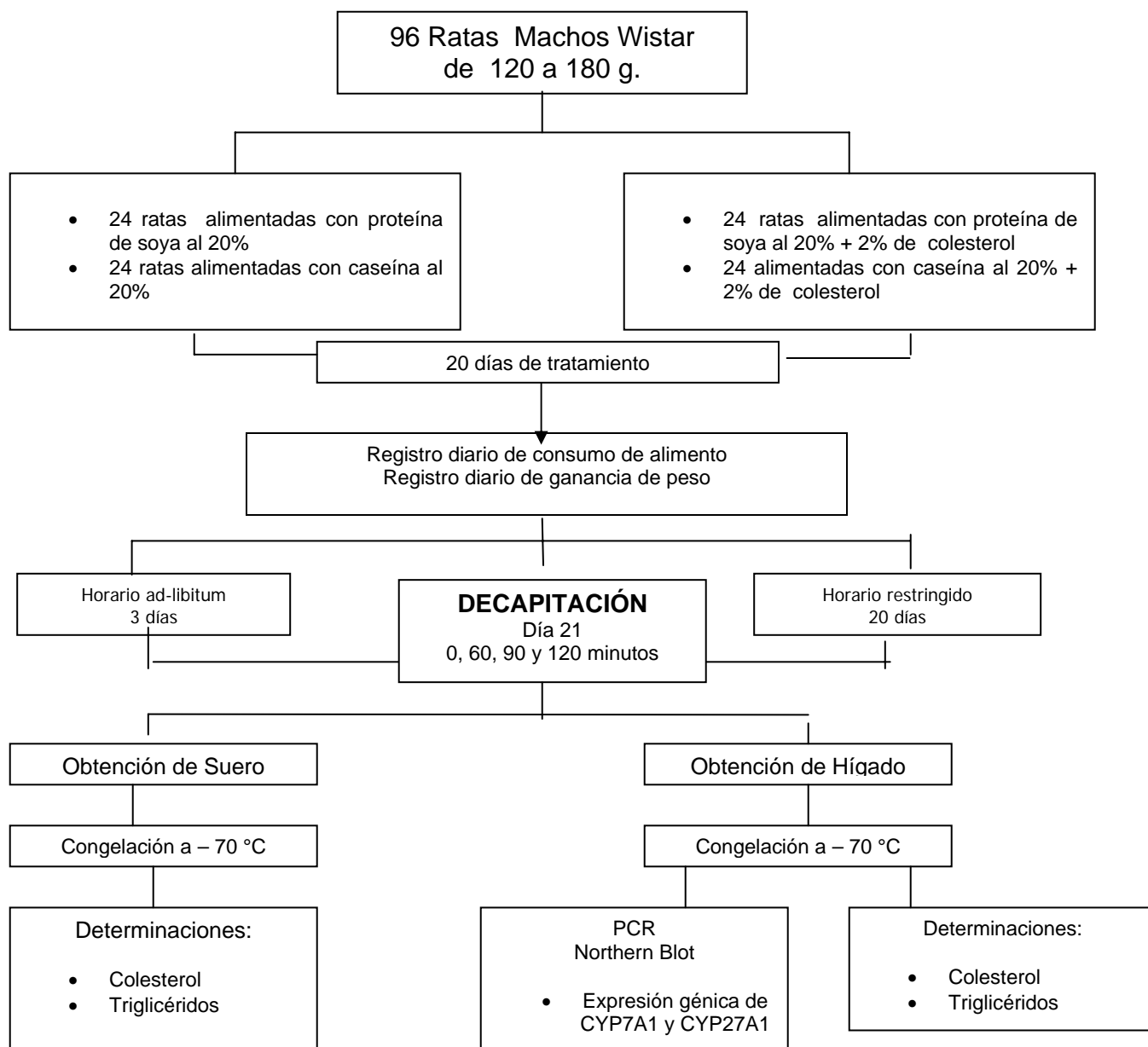
### 6.6.2 Criterios de exclusión.

- Estar enfermas de apariencia.
- Bajar de peso sin explicación alguna, ya que depende de muchas variables, de acuerdo a sus condiciones de vida.

### 6.6.3 Criterios de eliminación.

- Muerte durante el tiempo de investigación.

## 6.7 Diagrama de bloques



## **6.8 Métodos de recolección de datos**

### **6.8.1 Determinación del peso corporal**

Desde el inicio (día 0), se llevó a cabo por las mañanas, un registro diario del peso de las ratas, en báscula. Se tomó la lectura y se registró el peso en g / día.

### **6.8.2 Determinación del consumo de alimento**

Durante la duración del estudio se pesaron los comederos en la mañana y en la tarde después de retirar el comedero. El consumo de alimento fue registrado en g /8 hrs. todos los días.

### **6.8.3 Obtención de muestras y tejidos**

Los tejidos de las ratas fueron obtenidos después de que se anestesiaron con CO<sub>2</sub>. Aquí se obtendrá suero para la determinación de los parámetros bioquímicos, colesterol y triglicéridos. Se tomaron muestras de tejido hepático para extracción de RNA total. El tejido se mantuvo a – 70 °C.

### **6.8.4 Determinación de parámetros bioquímicos**

La concentración de triglicéridos y colesterol se determinó mediante pruebas enzimático-colorimétricas usando estuches de reactivos de diagnóstico *in vitro* (Bayer Corporation).

#### **6.8.4.1 Determinación de colesterol y triglicéridos en tejidos**

Se extrajeron lípidos totales de hígado por el método Folch y col. (75) basado en la separación del contenido lipídico de un tejido al homogenizarse en una solución solvente. Al añadir agua y centrifugar se forman dos fases; en la superior se encuentran los compuestos hidrosolubles y en la inferior los hidrofóbicos en la solución solvente que al evaporarse concentra el contenido total de lípidos en el fondo del tubo.

La pastilla de lípidos se resuspendió en isopropanol / tritón 10% para determinar la concentración de colesterol y triglicéridos (**ANEXO 1**).

## A) Extracción de RNA total

Se determinó la expresión génica de las enzimas CYP7A 1 y CYP27A1 en hígado de rata. El RNA del tejido hepático se aisló por una extracción de Tiocianato de Guanidina y por un gradiente de Cloruro de Cesio (CsCl). (76, 77).

Este método se utilizó para el aislamiento de RNA total de tejido hepatocito (**ANEXO 2**).

El tiocianato de guanidina es un potente desnaturalizante de proteínas (**ANEXO 3**). Todas las soluciones y el material utilizados para la extracción del RNA deben estar libres de RNAsas (Tratamiento con dietilpicrocarbonato 0.1%, DEPC y esterilización a 180 °C / 4 hrs. respectivamente). Los tejidos obtenidos de las ratas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantienen a -70 °C.

## B) Cuantificación de RNA

Se cuantificó la concentración de RNA extraído previamente, con un espectrofotómetro (Beckman DU mod. 640) a 260 / 280nm. Se tomaron 4 µl de Buffer TE, pH 7.5 en un tubo eppendorf, se mezcló y se cuantificó a 260 nm en celdas de cuarzo (**ANEXO 4**).

Cálculos para concentración de RNA:

1 D. O. ----- 40 µg de RNA

D. O. Muestra ----- X µg de RNA

(X µg de RNA) ( Factor de dilución (1:250) = X' µg de RNA / ml)

D. O. = Densidad Óptica

## C) Electroforesis de RNA

- a) Preparación del gel de agarosa al 1%
- b) Preparación de las muestras

Agregar a un eppendorf nuevo:

RNA (Dependiendo de la cantidad deseada), GRB (10X), Formaldehído (FDH), Formamida, Amortiguador de cargado, Bromuro de etidio (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Contenido de reactivos

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
RNA (Dependiendo de la cantidad deseada)	Ver nota
GRB (10X)	1.7 $\mu$ l
Formaldehído (FDH)	2.3 $\mu$ l
Formamida	Ver nota
Amortiguador de cargado	2 $\mu$ l
Bromuro de etidio	2 $\mu$ l

**Nota:** El volumen de RNA y formamida debe ser 11  $\mu$ l para tener un volumen Final de muestra de 19  $\mu$ l.

- c) Cargado y corrimiento del gel.
- d) Fotografía del gel (**ANEXO 5**).

#### **D) Northern Blot**

Se realizó la extracción de RNA total de hígado por el método del Trizol y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. El RNA fue transferido a una membrana de nylon (Hybond N+ de Amersham Pharmacia Biotech), (**ANEXO 6 A-E**).

#### **6.9 Consideraciones éticas**

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética para uso de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

## **6.10 Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, ingestión de alimento, así como los parámetros bioquímicos y enzimáticos, fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , teniendo como variables independientes al tiempo y al tratamiento dietario. El análisis estadístico fue realizado con el programa Statview (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) para Macintosh.



## 7. RESULTADOS

### EFEECTO DE LA PROTEINA DE SOYA

#### 7.1 CONSUMO DE ALIMENTO

Para determinar el efecto de la proteína de soya en el desarrollo de la hipercolesterolemia, se alimentaron ratas Wistar con dietas específicas descritas con anterioridad en la metodología y se formaron 4 grupos; 2 grupos controles y 2 grupos experimentales durante un periodo de 20 días, los cuales se iniciaron con 3 días de dieta ad-libitum y el resto con horario restringido.

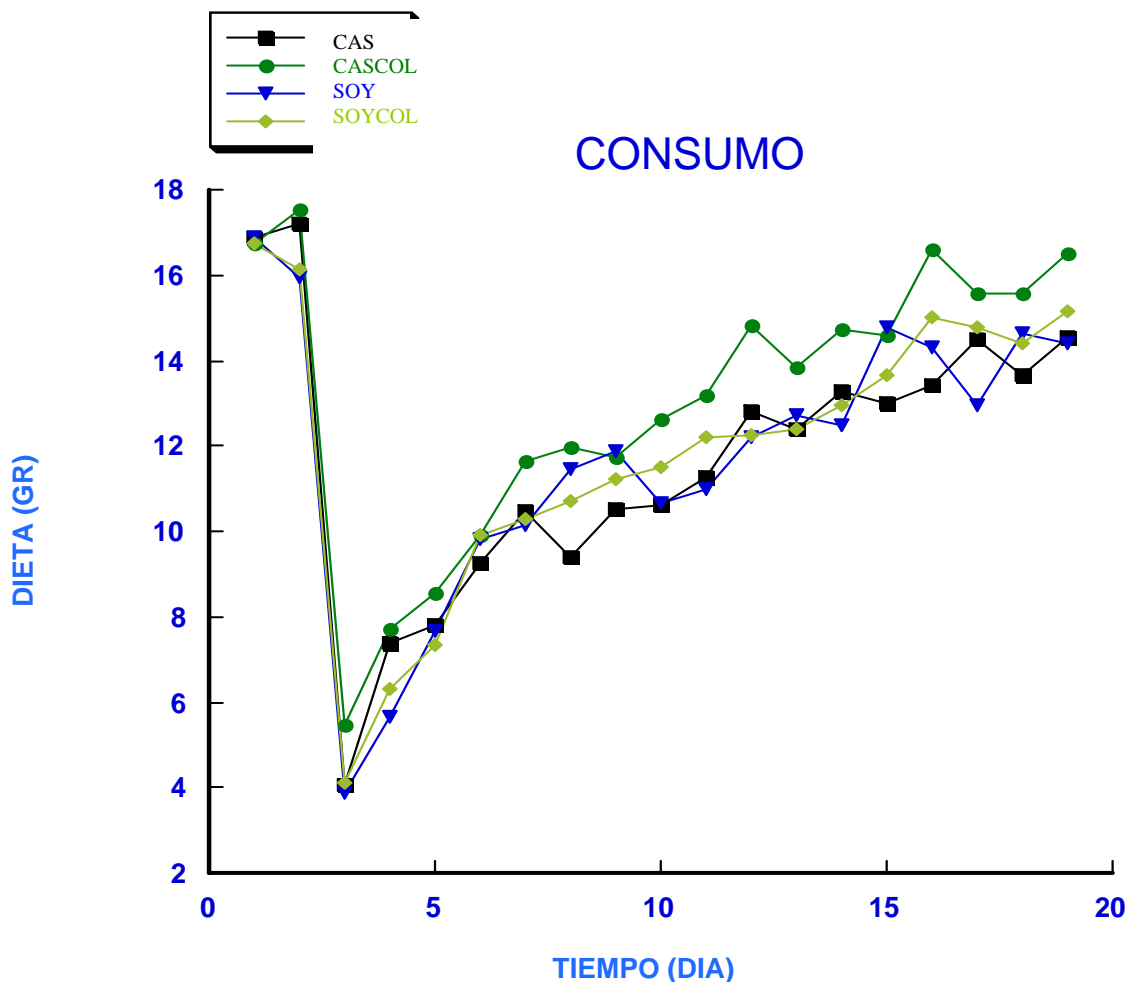
Para establecer si las diferencias encontradas en el peso de cada uno de los grupos no se debía a cambios en el consumo de alimento o ingestión calórica, se llevó a cabo un control diario en cuanto a la ingesta del alimento que fue ingerido por las ratas con el fin de saber su consumo; las que fueron alimentadas con caseína consumieron un promedio de  $14.5 \pm 0.7$  g sin presentar diferencia significativa en relación con el grupo que fue alimentado con soya el cual consumió  $14.5 \pm 0.9$  g.

Los grupos alimentados con caseína y el 2% adicional de colesterol consumieron  $13.8 \pm 1.3$  g, los cuales no hay diferencia significativa con respecto al grupo alimentado con soya y 2 % de colesterol adicional que consumió un promedio de  $13.8 \pm 0.9$  g.

De acuerdo a los diferentes grupos, las ratas no mostraron un aumento significativo en la ingesta del alimento (**Figura 9**).

#### 7.2 PESO CORPORAL

Para determinar el efecto de la dieta, en cuanto al peso, se llevó a cabo un registro diario de cada una de las ratas por grupo, durante los 20 días de estudio, sin tomar en cuenta los primeros 3 días que se les dio la dieta ad-libitum, con la finalidad de que las ratas pudieran adaptarse al horario de comida y al tipo de dieta.



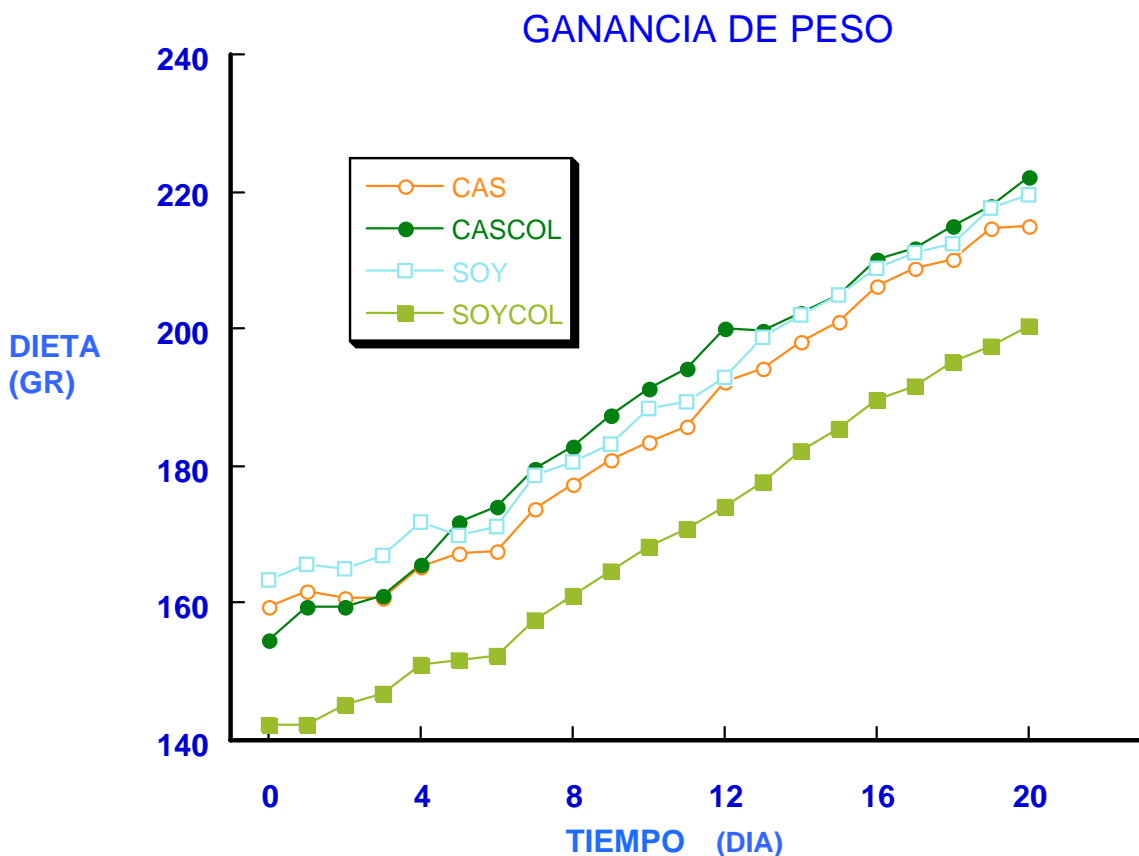
**Figura 9.** Registro del consumo de alimento de los animales experimentales con proteína de origen animal (Caseína) y de origen vegetal (Soya) durante los 20 días de estudio (n=24). CAS = Caseína, CASCOL= Caseína + Colesterol, SOY= Soya, SOYCOL= Soya + Colesterol.

Por lo que se observó que, la adición de colesterol a la dieta no presentó ninguna complicación y no hubo cambios significativos en cuanto a la ganancia de peso de acuerdo al tipo de proteína que contenía la dieta de cada grupo.

El grupo alimentado con caseína alcanzó un peso promedio de  $220.1 \pm 20.42$  g el cual representa el 3.58 % por debajo del peso del grupo alimentado con soya que

alcanzó un peso promedio de  $228.26 \pm 28.90$  g. Por otro lado el grupo experimental de caseína colesterol presentó al término del estudio un peso promedio de  $217.64 \pm 30.31$  g, lo que representa un 7.95 % por arriba del grupo de soya colesterol el cual alcanzó un peso promedio de  $200.340 \pm 25.36$  g.

Observamos que los 4 grupos presentaron una misma fase de crecimiento desde el inicio del estudio hasta el final del mismo (20 días) sin importar el tipo de dieta, ya sea con caseína o con soya (**Figura 10**).

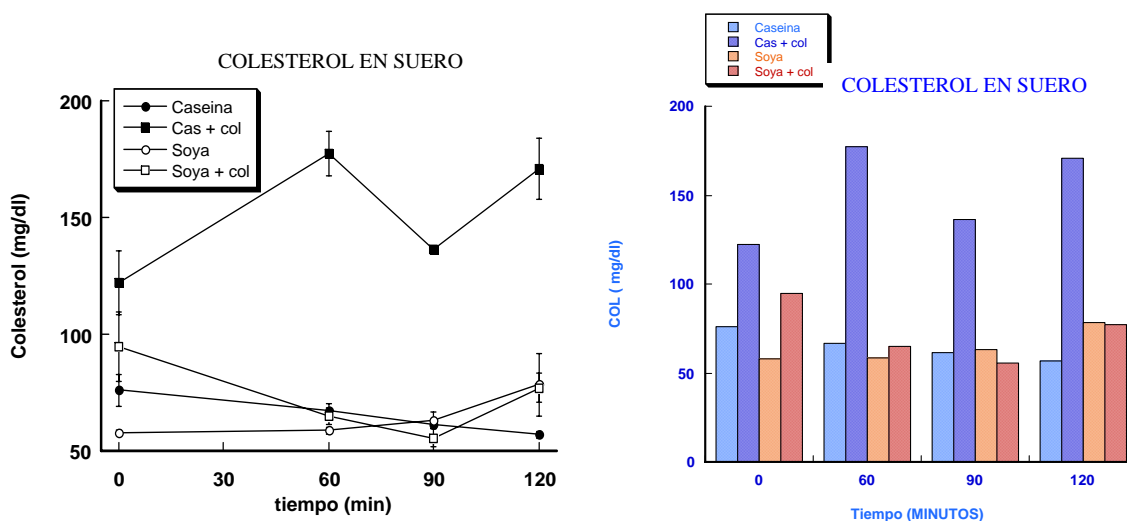


**Figura 10.** Efecto en la ganancia de peso de acuerdo a la alimentación con proteína de soya. Ganancia de peso registrada en gramos durante los 20 días de estudio, especificando cada uno de los grupos de acuerdo al tipo de dieta (n=24). CAS= Caseína, CASCOL= Caseína + Colesterol, SOY= Soya, SOYCOL= Soya + Colesterol.

### 7.3 COLESTEROL EN SUERO.

Se obtuvo suero de los animales a diferentes tiempos (0', 60', 90' y 120') para determinar la concentración de colesterol y ver el efecto de la proteína de Soya. El grupo de ratas alimentadas con caseína presentó una concentración promedio de  $65.33 \pm 9.31$  mg/dL, es decir, 2.5% más que el grupo alimentado con soya el cuál presentó una concentración promedio de  $63.7 \pm 11.94$  mg/dL en suero; a diferencia de los grupos alimentados con dieta adicionada con un 2% de colesterol, como es el caso del grupo de Caseína colesterol que presentó una concentración promedio de  $135.25 \pm 22.59$  mg/dL lo que significa un 50.19% más que el grupo alimentado con Soya colesterol con una concentración promedio de  $67.38 \pm 10.90$  mg/dL.

Se observó que las concentraciones de colesterol sérico fueron significativamente mayores en el grupo alimentado con dieta de caseína en los tiempos 0 y 60 min. con respecto a los alimentados con soya ( $p < 0.05$ ). Al tiempo 90 y 120 no se observaron diferencias (**Figura 11**). El grupo de Caseína Colesterol presentó concentraciones más altas en relación con los otros 3 grupos ( $p < 0.05$ ).

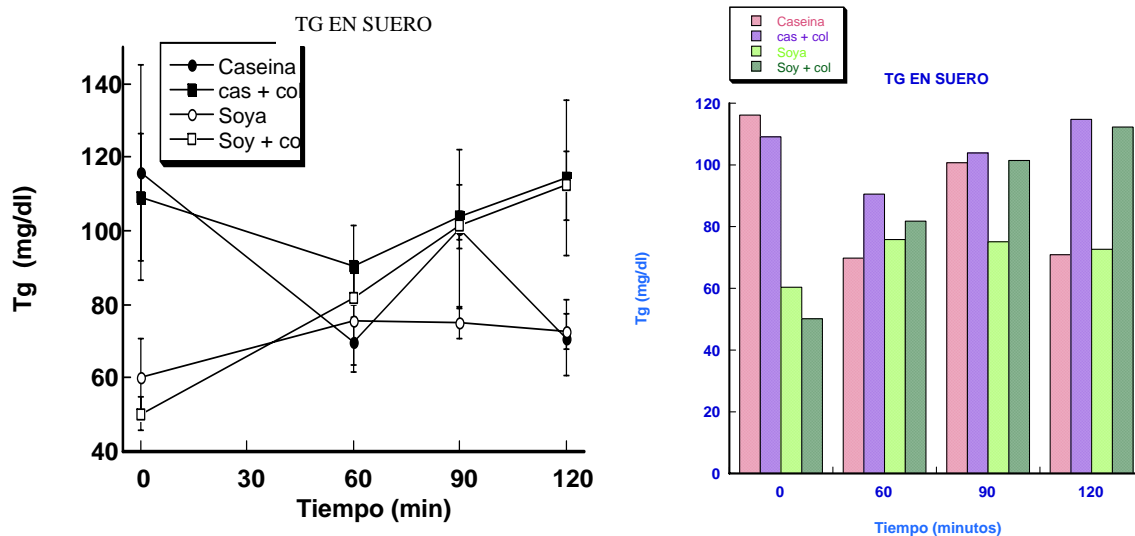


**Figura 11.** Concentración de colesterol en suero en animales experimentales, tomado a diferentes tiempos después de haber consumido las dietas controles o experimentales (0, 60, 90 y 120 min.). Cas= Caseína, Cas + col= Caseína + Colesterol, Soy= Soya, Soy + col= Soya + Colesterol.

#### 7.4 TRIGLICÉRIDOS EN SUERO

Las concentraciones séricas de triglicéridos en ratas control y experimentales se mantuvieron dentro de los límites normales. No se observó un patrón específico entre los 4 grupos experimentales. El grupo de ratas que consumió la dieta con Caseína alcanzó una concentración promedio de  $81 \pm 16.99$  mg/dL lo que representa un 7.8% por arriba que el grupo alimentado con Soya que presentó una concentración promedio de  $74.67 \pm 16.74$  mg/dL. El grupo alimentado con Caseína colesterol presentó una concentración promedio de  $97.89 \pm 22.16$ , es decir, 18.17% por arriba del grupo alimentado con Soya colesterol con una concentración promedio de  $80.1 \pm 19.41$  mg/dl.

Antes de consumir la dieta los animales alimentados con las dietas control o experimental con caseína mostraron mayores concentraciones de triglicéridos con respecto a las que consumieron soya (**Figura 12**). Interesantemente a las 2 horas después del consumo de la dieta aquellos que consumieron las dietas que tenían colesterol presentaron mayores concentraciones de triglicéridos ( $p < 0.05$ ).

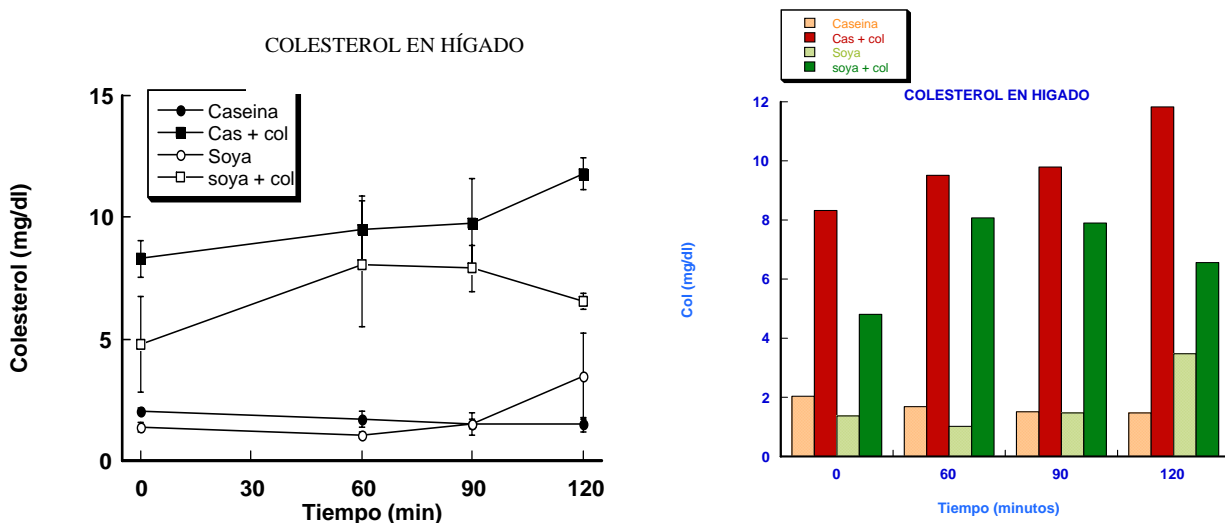


**Figura 12.** Concentraciones de triglicéridos en suero de animales experimentales tomado a diferentes tiempos después de haber consumido las dietas controles o experimentales (0´. 60´. 90´ y 120´). Durante 20 días de estudio (n=24)

### 7.5 COLESTEROL EN HÍGADO

La concentración de colesterol en hígado en el grupo alimentado con Caseína fue de  $1.68 \pm 0.42$  mg/dL, es decir, un 18.07 % más que el grupo alimentado con Soya el cuál presentó  $1.38 \pm 0.48$  mg/dL. Las ratas alimentadas con las dietas altas en colesterol presentaron un comportamiento similar, como lo es el grupo alimentado con Caseína colesterol con una concentración promedio de  $9.86 \pm 2.25$  mg/dL, es decir, un 36.1% más que el grupo alimentado con Soya colesterol con una concentración de  $6.30 \pm 2.29$  mg/dL.

Las concentraciones de colesterol en tejido hepático, se vieron aumentadas en los grupos donde se adicionó 2% de colesterol a las dietas, sin embargo, en el grupo alimentado con soya el incremento fue significativamente menor con respecto al grupo de caseína ( $p < 0.05$ ) (**Figura 13**). Los animales alimentados con las dietas controles mostraron niveles de colesterol significativamente menores ( $p < 0.05$ ).

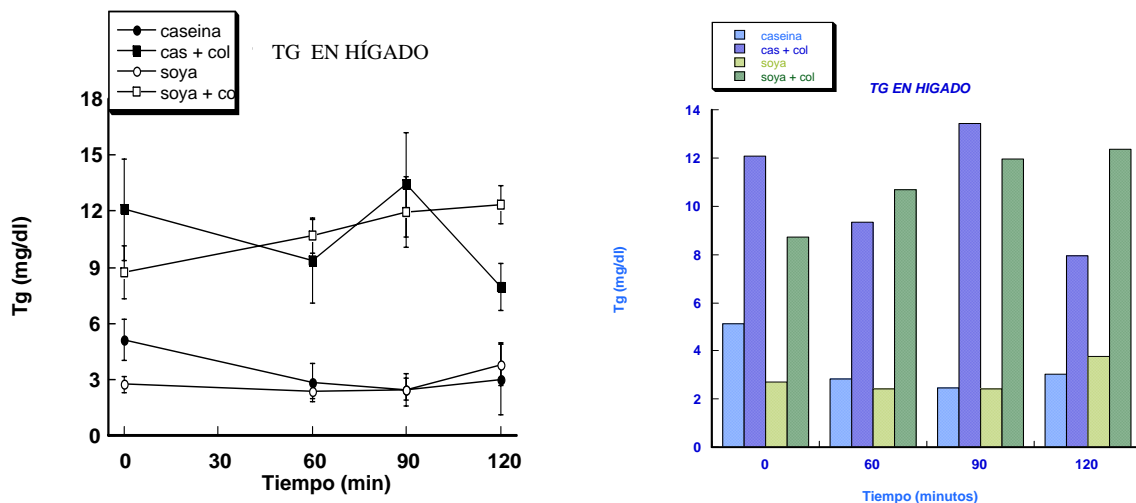


**Figura 13.** Concentración de colesterol en hígado de rata en mg/g de tejido. Tomada la muestra después de haber consumido las dietas controles o experimentales a diferentes tiempos 0, 60, 90 y 120 min. (n=24) Cas= Caseína, Cas + Col= Caseína + Colesterol, Soy= Soya, Soy + Col= Soya + Colesterol.

## 7.6 TRIGLICÉRIDOS EN HÍGADO

El efecto de la dieta con proteína de soya sobre la concentración de triglicéridos en hígado se presenta en la **Figura 14**. El grupo alimentado con Caseína alcanzó  $3.27 \pm 1.86$  mg/dL, es decir, 16.59% más que el grupo alimentado con Soya con una concentración promedio de  $2.73 \pm 0.77$  mg/dL. El grupo alimentado con Caseína colesterol presentó una concentración de  $10.39 \pm 3.21$  mg/dL, es decir, 6.12% menos que el grupo alimentado con Soya colesterol, el cuál presentó una concentración de  $11.07 \pm 1.71$  mg/dL.

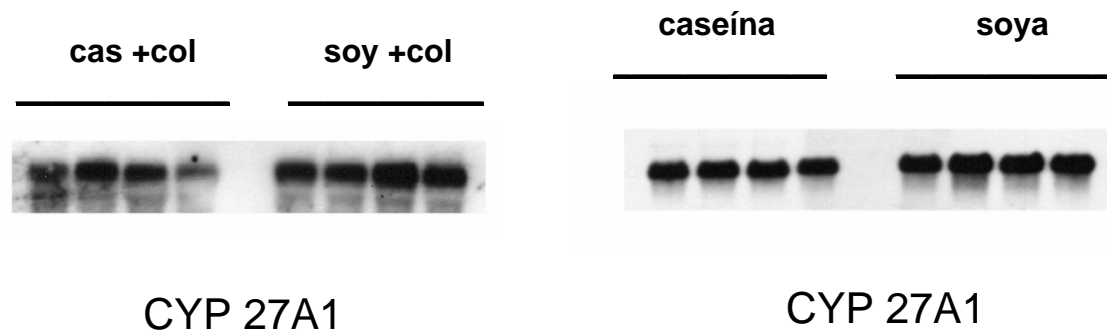
Concentraciones de triglicéridos en tejido hepático en donde se observó también que aquellos animales que se alimentaron con las dietas adicionadas de 2% de colesterol tuvieron una mayor concentración de triglicéridos hepáticos con respecto a sus correspondientes grupos control ( $p < 0.05$ ). Las diferencias significativas encontradas fueron efecto del tipo de proteína ingerida por los animales.



**Figura 14.** Concentración de triglicéridos en tejido hepático en ratas divididas en 4 grupos con diferentes dietas durante 20 días. Muestras extraídas después de haber consumido las dietas controles o experimentales a distintos tiempos 0, 60, 90 y 120 min.

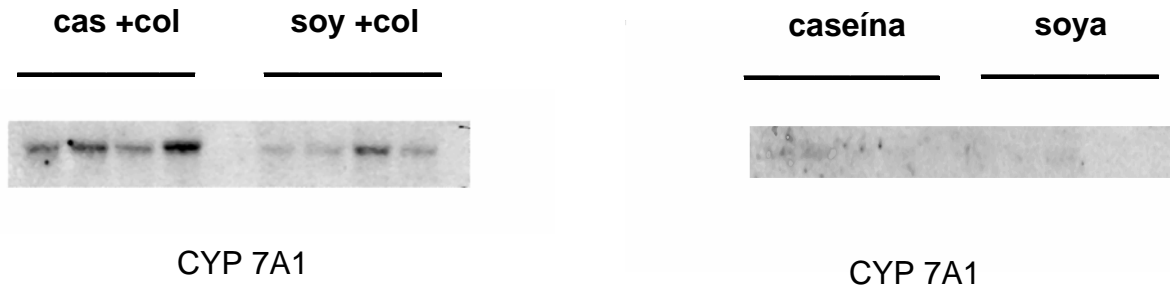
### 7.7 ANÁLISIS POR NORTHERN BLOT DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CYP7A1 Y CYP27A1 EN HÍGADO DE RATA.

Las ratas que consumieron caseína y proteína de soya más colesterol, presentaron mayor expresión de las enzimas CYP7A1 y CYP27A1, siendo significativamente mayor a los 90 y 120 min. Al comparar la expresión de la enzima CYP27A1, que fue la que más se expresó, se observó que el adicionar colesterol, ayudó a aumentar su expresión, diferenciando un grupo de otro ya que aún siendo la enzima con mayor expresión se nota la diferencia con el grupo que consumió proteína de soya, en ambos casos (**Figuras 15 y 16**). En la expresión de CYP7A1, la diferencia es más notoria, se expresó mucho más en los grupos de ratas que fueron alimentadas con Caseína + Colesterol y Soya + Colesterol en los mismos tiempos.



**Figura 15.** Expresión génica de CYP 27A1. Un grupo de ratas alimentadas con Caseína + Colesterol y Soya + Colesterol; Otro grupo de ratas alimentadas con Caseína y Soya. Sacrificadas a diferentes tiempos 0, 60, 90 y 120 min. (n=24).





**Figura 16.** Expresión génica de CYP7A1. Un grupo de ratas alimentadas con Caseína + Colesterol y Soya + Colesterol; Otro grupo de ratas alimentadas con Caseína y Soya. Ejecutadas a diferentes tiempos 0, 60. 90 y 120 min. (n=24).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestra la importancia de la regulación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos biliares, la CYP7A1 y la CYP27A1. Estas dos enzimas que están involucradas tanto en la formación de ácidos biliares por la vía clásica o neutra y por la vía alterna o ácida se regulan de acuerdo a la concentración de colesterol en la dieta. Entre mayor se la concentración de colesterol en la dieta, mayor es la expresión de ambos genes. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores

Debido al tiempo del estudio no fue posible observar claramente las diferencias en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en suero entre los grupos alimentados con caseína o soya. Sin embargo es importante enfatizar que las ratas que consumieron dietas con un alto contenido de colesterol nunca mostraron hipercolesterolemia. Esto es posiblemente debido a que en la rata la actividad de la lipoproteín lipasa es muy alta con respecto a la de humanos, y esto no permite fácilmente que exista una acumulación de lípidos sanguíneos.

Sin embargo donde se observa claramente el efecto del consumo de la proteína de soya fue en las concentraciones de colesterol hepático. Aquellos animales que consumieron caseína y 2% de colesterol tuvieron concentraciones significativamente mayores que aquellos que consumieron soya mas 2% de colesterol. Este efecto en la reducción de las concentraciones de colesterol hepático por el consumo de la proteína de soya ya había sido reportado por este grupo de investigación (72, 73), sin embargo nunca se había demostrado cuando se consumía una dieta alta el colesterol. La reducción en las concentraciones de colesterol hepático fueron semejantes a las observadas previamente (70). Estos resultados demuestran nuevamente que el consumo de proteína de soya reduce la acumulación de lípidos en el hígado. Esto se ha visto asociado con una disminución del proceso de lipotoxicidad que ocurre en este órgano bajo diferentes condiciones, pero en particular durante el desarrollo de obesidad y de resistencia a la insulina (78).

Es también importante el enfatizar que el consumo de colesterol aumento la expresión de tanto la CYP7A1 como de la CYP27A1, lo que indica que esta regulación ocurra de manera sincronizada. Estos resultados están de acuerdo con previos trabajos que han demostrado que los genes de ambas enzimas contienen elementos de respuesta para el factor de transcripción LXR. Esto indica que cuando aumenta la concentración de colesterol hepático, esto aumenta la formación de oxisteroles. Este proceso ocurre por simple cambio en acción de masas, es decir a mayor concentración de colesterol, se formará automáticamente una mayor producción de oxisteroles. Estas formas oxidadas de colesterol son ligandos específicos para el factor de transcripción LXR. De esta manera los oxisteroles estimulan a LXR y este a su vez estimula la expresión de los genes para las enzimas CYP7A1 y CYP27A1. Aunque la principal vía de formación ocurra vía CYP7A1, estos resultados muestran que se activa de manera vigorosa la ruta alterna, estimulando la expresión de la enzima mitocondrial CYP27A1.

Es importante mencionar que por medio de este estudio no fue posible el mostrar el ritmo circadiano de la expresión de la CYP7A1. Posiblemente esto se deba a que el cambio de alimentación a un horario restringido no permite que se observe claramente esta variación. Posiblemente existan otros factores que sean independientes de la dieta que estimulen este ritmo circadiano. Mayores estudios son necesarios para clarificar este punto. Sin embargo otro de los puntos interesantes a estudiar es el correspondiente al de los transportadores de colesterol y ácidos biliares localizados en el intestino. Se ha determinado que dos transportadores de la familia ABC, los denominados ABCG5 y ABCG8 están involucrados en este proceso. Ambos transportadores funcionan como un heterodimero, y se ha visto que su función es la del transporte reverso del colesterol. Esto es, que cuando incrementa la cantidad de colesterol o de ácidos biliares dentro del enterocito, estos transportadores bombean estos compuestos hacia el lumen intestinal para que sean excretados a través de las heces. Este puede ser otro posible mecanismo por el cual el consumo de proteína de soya incrementa la expresión de estos transportadores y de ahí que aumente la excreción fecal de

colesterol y ácidos biliares, con lo cual se disminuiría la circulación enterohepática de ácidos biliares. En consecuencia habría una disminución del colesterol en el hígado al sintetizar más ácidos biliares. Esta hipótesis está siendo estudiada en el laboratorio.

Finalmente, es importante el mencionar que la regulación de la expresión de tanto la enzima CYP7A1 como la de la CYP27A1 son esenciales para la eliminación del exceso de colesterol en el organismo, es necesario el desarrollar más estudios dietarios y farmacológicos para tener nuevas terapias que permitan ayudar a aquellos individuos con hipercolesterolemia. Se ha reportado que algunos polimorfismos en humanos del gen de la CYP7A1 están asociados con incrementos en las concentraciones de colesterol, en especial del colesterol LDL (79, 80), aunque algunos autores muestran hallazgos contradictorios (81). Sin embargo, parece ser que el estudio de estas 2 enzimas puede producir nuevas líneas de tratamiento para pacientes hipercolesterolémicos. Es importante recalcar, como recientemente se ha mencionado que antes de iniciar en estas alteraciones metabólicas una terapia con medicamentos se utilice la dieta como una alternativa para mejorar el estado de salud de los pacientes con estas alteraciones. Posiblemente la proteína de soya sea uno de los componentes de una dieta que asociado con el consumo de una dieta baja en grasas saturadas prevenga de manera importante la elevación del colesterol en la sangre, que es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

## 9. CONCLUSIONES

Después de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- A) La ingesta de Proteína de Soya reduce la concentración de colesterol hepático a pesar de un consumo elevado de colesterol dietario.
- B) La modulación de las concentraciones de colesterol hepático ocurre a través de una inducción en la expresión de los genes de las enzimas CYP7A1 y CYP27A1, y estas a su vez modifican la eliminación de colesterol a través de la formación de ácidos biliares.
- C) El consumo de proteína de Soya en humanos que presenten problemas de Hipercolesterolemia, se beneficiarán, ya que está comprobado el efecto de este; por lo tanto se podrá considerar dentro de su tratamiento.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chavez A, M Muñoz JA, Roldan S, Bermejo R, Avila A. La nutrición en México y la transición epidemiológica. División de Nutrición de Comunidad, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1993.
2. Dietschy J. The origins, genetics and diseases of mexican-americans. University of Texas Southwestern Medical Center. 1992.
3. Aebi H, Berger E. Nutrition and enzyme regulation. Current Problems in Clinical Biochemistry 1980;10: 17.
4. Simopoulos AP. Genetics and Nutrition: Or what your genes can tell you about nutrition. World. Rev. Nutr. Diet 1990; 63:25-34.
5. Clarke S, Abraham S. Gene expresión: nutrient control of pre-and posttranscriptional events. FASEB J. 1992; 6:3146-3152.
6. Girard J. The regulation of gene expresión by nutrients. Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 1998; 1:321-322.
7. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science. 1986; 232: 34-47.
8. Benyon S. Metabolismo y Nutrición. McGraw Hill. España, 1999; 76-90.
9. Basic GP. Basic-helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membrana-bound molecule. Cell. 1994; 77:17-19.

10. Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez AB, Arroyo P. Nutriología Médica. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. Interamericana, 1996; 88-95.
11. Halpen MJ. Lipid metabolism and its pathology. Plenum Press ed. New York, 1995; 120-150.
12. Hemming FW, Hawthorne JN. Lipid análisis. Oxford, 1996; 58-65.
13. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 5ª. Edición ed. México, D. F: Editorial Manual Moderno., 2002.
14. Johno YL, Chiang. Bile acid regulation of gene expresion:Roles of nuclear. Hormone receptors. Endocrine Reviews 2002; 23 (4):443-463.
15. Maurice E. Nutrición en Salud y Enfermedad. McGraw-Hill Interamericana ed, 1999; 77-90.
16. Gasic GP. Basic-helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membranebound molecule. Cell 1994; 77:17-19.
17. Spady DK, Mollet LA, Dietschy JM. Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. Annu. Rev. Nutr. 1993; 13:355-381.
18. Benyon S. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Ediciones Harcourt ed. España, S. A. Londres: United Medical and Dental Schools of Guy`s and St Thomas`s Hospitals (UMDS), 1999.
19. Lewin. B. Content of diets. Genes VII. 2000:232-267.

20. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-340.
21. Bjorkhem I, Danielsson H, Sjovalld J. Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. *Steroid and bile acid. The Netherlands* 1985; 231-277.
22. Danielsson H, Einarsson K, Johansson G. Effect of biliary drainage on individual fractions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid. *Bile acids and steroids* 180. *Eur. J. Biochem* 1967; 2:44-49.
23. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci.* 1998; 3:76-193.
24. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992; 31:4737-4749.
25. Axelson M, Mork B, Sjovalld J. Occurrence of 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid, 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -dihydroxy-5-cholestenoic acid and 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid as normal constituents in human blood. *J Lipid Res* 1988; 29:629-641.
26. Axelson M, Sjovalld J. Potential bile acid precursors in plasma-possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem* 1990; 36:631-640.
27. Bertolotti M, Abate N, Loria P, et al. Regulation of bile acid synthesis in humans: effect of treatment with bile acids, cholestyramine, or simvastatin on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylation rates in vivo. *Hepatology* 1991; 14:830-837.
28. Duane W, Javitt N. 27-Hydroxycholesterol. Production rates in normal human subjects. *J Lipid Res* 1999; 40:1194-1199.



29. Einarsson K, Akerlund J-E, Reihner E, Bjorkhem I. 12 a-Hydroxylase activity in human liver and its relation to cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity. *J Lipid Res* 1992; 33:1591-1595.
30. Einarsson K, Ericsson S, Ewerth S, et al. Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40:S53-S58.
31. Javit N, Pfeffer R, Kok E, Burstein S, Cohen B, Budai K. Bile acid synthesis in cell culture. *J Biol. Chem* 1989; 264:10384-10387.
32. Javitt N. Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB J.* 1994; 8:1308-1311.
33. Chawla A, Saez E, Ronald ME. Don't know much bile-ology. *Cell* 2000; 103:1-4.
34. Chiang JYL, Vlahcevic ZR. The regulation of cholesterol conversion to bile acids. *Adv. Mol. Cell Biol.* 1996; 14:269-316.
35. Myant NB, & K.A. Mitropoulos: Cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase. *J. Lipid Res* 1977; 18:135-153.
36. Vlahcevic ZR, D. M. Heuman PBH. Regulation of Bile Acid Synthesis. *Hepatology* 1991; 13:590-600.
37. Vlahcevic ZR, Hylemon PB, Chiang JYL. Hepatic cholesterol metabolism. *Biology and Pathology.* 1994; 14:379-389.

38. Vlahcevic ZR, Pandak WM, Heuman DM, Hylemon PB. Function and regulation of hydroxylases involved in the bileacid biosynthesis pathways. *Seminars in liver disease* 1992; 12:403-419.
39. Guyton AC, Hall JE. *Human Physiology and Mechanisms of Disease*. New York: Elsevier Science Health Science div, 1996.
40. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ /, and  $\gamma$ . *J. Clin. Invest.* 2004; 114:1564-1576.
41. Russell DW. Nuclear Orphan Receptors. Control cholesterol catabolism. *Cell* 1999; 97:539-542.
42. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acids biosynthesis. *Mol. Cell* 2000; 6:517-526.
43. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acids synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell.* 2000; 6:507-505.
44. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001; 294:1866-70.
45. Einarsson K, Johansson G. Effect of actinomycin D and puromycin on the conversion of cholesterol into bile acids in bile fistula rats. *Bile acids and steroids* 206. *FEBS Lett.* 1968; 1:219-222.
46. Gielen J, Cantfort V, Robaye B, Renson J. Rat-liver cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase. 3 New results about its circadian rythm. *Eur. J. Biochem* 1975; 55:41-48.

47. Myant NB, Mitropoulos KA. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J. Lipid Res* 1977; 18:135-153.
48. Bjorkhem L, Andersson O, Diczfalusy U, et al. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91:8592-8596.
49. Pikuleva IA, Bjorkhem I, Waterman MR. Expression, purification and enzymatic properties of recombinant human cytochrome P450c27 (CTP27). *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 343:123-130.
50. Noshiro M, Nishimoto M, Okuda K. Rat liver cholesterol 7 alfa-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:10036-10041.
51. Emi Y, Omura T. Synthesis of sex-specific forms of cytochrome P-450 in rat liver is transiently suppressed by hepatic monooxygenase inducers. *J. Biochem.* 1988; 104:40-43.
52. Morohashi K, Sogawa K, Omura T, Fujii-Kuriyama Y. Gene structure of human cytochrome P-450 (SCC), cholesterol desmolase. *J Biochem*, 1987; 101:878-887.
53. Noshiro M, Ishida H, Hayashi S, Okuda K. Assays for cholesterol 7 alpha-hydroxylase and 12 alpha-hydroxylase using high performance liquid chromatography. *Steroids* 1985; 5:539-550.
54. Anderson J, B. J. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl. J. Med.* 1995; 333:276-282.

55. Dr. Hoyer H. El frijol de soya, un regalo de la naturaleza. ASA (Asociación Americana de Soya). USB ( United Soybean Board) 2000; 3-7.
56. Carroll KK, Kurowska EM. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *J. Nutr.* 1995; 125:594S-97S.
57. Clarkson T. Soy, Soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 2002; 132:566S-69S.
58. Crouse III J, Morgan T, Terry J, Ellis J, Vitolins M, Burke G. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on the plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159:2070-76.
59. Teixeira S, Potter S, Weigel R, Hannum S, Erdman J, Haster C. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on food lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 71:1077-84.
60. Tonstad S, Smerud K, Hoie L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002; 76:78-84.
61. Anderson R, Wolf W. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 1995; 125:581S-8S.
62. Carrol KK. Review of clinical studies on cholesterol - lowering. Response to soy protein. *J. Am. Diet. Assoc.* 1991; 91:820-827.

63. Potter SM. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.* 1995; 125:606S-611S.
64. Yan Chun L, Wang DP, Chiang JYL. Regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase in the liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265, 20:12012-12019.
65. Sanchez A, Rubano DA, Shavlik GW, Hubbard RW, Horning MC. Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. *Arch. Latinoam. Nutr.* 1988; 38:229- 238.
66. Bakhit RM, ein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW, Potter SM. Intake of 25 g soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J. Nutr.* 1994; 124:213-222.
67. Sidhu GS, Oakenfull DG. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. *Br. J. Nutr.* 1986; 55:643-649.
68. Klevay LM. coronary heart disease: the zinc-copper ratio hypothesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1975; 28:764-774.
69. Roy DM, Schneeman BO. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol bile acids and pancreatic enzymes in mice. *J. Nutr.* 1981; 111:878-885.
70. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R, Tovar AR. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.* 2004; 134:522-529.

71. Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 2002; 283:E1016-E1022.
72. Tovar AR, Murguia F, Cruz C, et al. A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome. *J. Nutr.* 2002; 132:2562-2569.
73. Tovar AR, Torre-Villalvazo I, Ochoa M, et al. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J. Lipid. Res.* 2005.
74. Poos MI, Overton J, Blackwell D. Nutrient requirements of laboratory animals. Fourth Revised Edition. National Research Council. 1995; 80-102.
75. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957;226:497-509.
76. Chirgwin JJ, Przbyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of Biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18:5294-5299.
77. Glisin V, Crkvenjahov R, Byus, C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974; 13:2633-2637.
78. Tovar A, Manzano N, Torres N. Regulación del metabolismo del colesterol y ácidos grasos en el síndrome nefrótico experimental por las Proteínas que se unen a los Elementos Regulatorios de Esteroles (SREBP's): Efecto de la soya. *Gaceta Med Mex* 2005; in press.

79. Tiemann M, Han Z, Soccio R, et al. Cholesterol feeding of mice expressing cholesterol 7 alpha-hydroxylase increases bile acid pool size despite decreased enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:1846-1851.
80. Wang J, Freeman DJ, Grundy SM, Levine DM, Guerra R, Cohen JC. Linkage between cholesterol 7 alpha-hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Clin. Invest.* 1998; 101:1283-1291.
81. Abrahamsson A, Krapivner S, Gustafson U, et al. Common polymorphisms in the CYP7A1 gene do not contribute to variations in rates of bile acid synthesis and plasma LDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis* 2005; 182:37-45.
82. Chomczynski P, Sachi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156-159.

## 11. ANEXOS

### ANEXO I

#### EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POR EL MÉTODO DE FOLCH

\* Todo el material debe estar lavado y esterilizado.

\* Material:

- 8 tubos esmerilados, 9 tubos corex
- 24 tubos Eppendorf (3 por muestra)
- Solución cloroformo metanol
- Solución isopropanol / triton 10%
- 2 pipetas de vidrio de 5 mL
- 1 pipeta de vidrio de 25 mL
- 2 vasos de precipitado chicos de plástico
- 4 embudos
- Papel filtro (1 por muestra)
- Pistilo y taladro
- Parafilm
- Frasco de vidrio
- Bote para material sucio

\* Preparación de solución cloroformo metanol:

- a. 101 mL para 8 muestras
  - b. 86 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
  - c. 14 mL  $\text{CH}_3\text{OH}$
  - d. 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- 
- Cloroformo: pipeta de vidrio 25 + 25 + 25 + 11 mL en frasco de vidrio.
  - Metanol: se pasa al vaso chico y de ahí 14 mL con pipeta de vidrio al frasco.
  - Agua destilada: 1 mL con micropipeta en frasco y se agita.
  - Rotular: Mezclar solventes, extracción de lípidos, fecha, nombre.



- Tapar inmediatamente después de cada uso.
  - Si sobra, se almacena en la campana.
- \* Rotular tubos Eppendorf:
- 2 grupos de dilución final ( 100, 200, 300  $\mu$ L ) según cantidad de lípidos.
  - 1 grupo de dilución stock ( 50  $\mu$ L )
- \* Organizar tubos de vidrio:
- Colocar 5 mL de agua en un corex para usarlo como referencia, cubrirlo con parafilm para identificarlo.
  - Organizar en gradilla los tubos corex y esmerilados en parejas, rotularlos 2 veces.
  - Colocar los embudos con papel filtro en los tubos corex.
  - Colocar rotor y camisas delgadas en centrifuga, 2400 rpm, 15 min 20°C.
- \* Preparación de muestras:
- Vaciar 5 mL de solución al tubo esmerilado
  - Pesar 250 – 270 mg de tejido sobre parafilm
  - Vaciar el tejido al tubo y homogenizar
  - Verter en el tubo corex con embudo
  - El tubo esmerilado se conserva
  - Al terminar la operación con la 2da. Muestra, colocar 1 mL de solución al 1er tubo esmerilado, agitar y verter en el embudo, colocar agua en el bote.
  - Al secarse el papel filtro se saca el embudo y se ajusta el volumen del tubo a 5 mL con solución, usando el tubo de referencia.
  - Se añade 1 mL de agua y se tapa con aluminio.
  - Bajar la velocidad del vortex y colocar el tubo.
  - Centrifugar
  - Extraer el agua con punta nueva. Tirar punta.
  - Con otra punta, colocar 1 mL de solución en cada tubo Eppendorf (acercar el tubo a la gradilla para no derramar).
  - Dejar evaporar en la campana (2 días)
  - Ya seca la pastilla resuspender en isopropanol / triton 10% según dilución.

## ANEXO II

### EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA se aísla por una extracción con una mezcla de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo. El tiocianato de guanidina es un potente desnaturizante de proteínas.

#### **Aparatos y Equipo:**

\* Politrón, centrífuga 32-MC, rotor JA-20, vortex y microcentrífuga

#### **Material:**

\* Instrumental de disección, tubos para politrón, tubos corex de 15 mL horneados (4hrs.). 2 por muestra, tubos Eppendorf nuevos estériles libres de RNAsas. 2 por muestra, gradillas (tubos de politrón y corex 15 mL, tubos Eppendorf), pipetas de 2, 10, 20, 100, 200 y 1000mL, puntas nuevas y estériles para las pipetas anteriores (blancas, amarillas y azules), pisetas de agua desionizada y de agua tratada con DEPC, camisas gruesas para el rotor JA-20 de la centrífuga 32-MC, recipiente para desecho, recipiente para "tubos con grasa" y papel absorbente.

#### **Protocolo.**

Notas: Previo a comenzar se prende la centrífuga Beckman 32-MC, se le coloca el rotor JA-20 y las camisas con pared gruesa. Se programa a 9000 r. p. m. y a 4°C.

Lavar el politrón 3 ó 4 veces con agua desionizada, posteriormente con 2 mL de agua-DEPC y finalmente con 2 mL de solución desnaturizante de  $\beta$ -mercaptoetanol antes de iniciar la técnica. Entre cada una de las muestras se repite este mismo procedimiento.

1. Extraer el tejido del animal y homogenizar aproximadamente 20 segundos en un tubo corex de 15 mL con la solución desnaturizante con  $\beta$ -mercaptoetanol (se usaron 2 mL de solución por cada 200 mg de tejido).
2. Colocar en hielo el tubo y agregar 0.2 mL de acetato de sodio 2M pH 4.0 y mezclar completamente por inversión, cubriendo con un pedazo de papel parafilm.

3. Agregar 2 mL de agua saturada con fenol acuoso frío (tomar la muestra del fondo del frasco) y mezclar vigorosamente con el vortex durante 2 min.
4. Agregar 4 mL de la solución alcohol isoamílico-cloroformo (49:1). Mezclar con vortex completamente e incubar la suspensión durante 15 min. (de 0 a 4°C).
5. Centrifugar 20 min. a 9000 r.p.m. a 4°C (centrífuga 32-MC rotor JA-20).
6. Transferir la fase superior (aprox. 2 mL) a un tubo corex estéril de 1 mL y agregar 2 mL de isopropanol al 100%. Mezclar con vortex.
7. Incubar las muestras por 30 min a -20°C (colocarlas en el congelador).
8. Centrifugar durante 10 min. a 9000 r. p. m. y a 4 °C.
9. Prender la microcentrífuga (Eppendorf mod. 5902) y programarla a 4°C.
10. Desechar el sobrenadante. Colocar el tubo boca abajo y escurrir el resto del líquido sobre papel absorbente.
11. Resuspender el pellet de RNA con la punta de la pipeta en 0.6 mL de solución desnaturante con  $\beta$ -mercaptoetanol (homogenizar con la misma punta de la pipeta) y transferir a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
12. Precipitar el RNA con 0.6 mL de isopropanol al 100%, homogenizar con el vortex e incubar por 30 min. a -20°C.
13. Centrifugar 10 min. a 9000 r. p. m. para hígado y a 12000 r. p. m. para el resto de los tejidos a 4°C y desechar el sobrenadante.
14. Adicionar 1 mL de etanol al 75% al pellet de RNA y lavar vigorosamente en el vortex por un tiempo de 10-15 min a temperatura ambiente.
15. Centrifugar 5 min. a 12000 r. p. m. (9000 r.p.m. para hígado) y desechar el sobrenadante por inversión.
16. Secar el pellet del RNA con Speed Vac.
17. Adicionar 0.3 mL de agua-DEPC al pellet de RNA y agitar vigorosamente en el vortex hasta que el pellet esté completamente disuelto.
18. Adicionar 3 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico al RNA. Agitar en el vortex.
19. Centrifugar 10 min. a 12000 r.p.m. a 4°C.
20. Tomar la fase superior y transferirla a un tubo Eppendorf nuevo.
21. Agregar 0.3 mL de alcohol isoamílico-cloroformo y agitar en el vortex.

22. Centrifugar 10min a 12000 r. p. m. a 4 °C.
23. Transferir la fase superior a un tubo Eppendorf nuevo.
24. Agregar 40 mL de acetato de sodio 3M pH 6.0 y 1 mL de etanol absoluto. Agitar en el vortex.
25. Incubar toda la noche a -20°C.
26. Al llegar, prender la microcentrífuga y programarla a 4°C.
27. Centrifugar el RNA a 12000 rpm durante 20 min. a 4°C. Desechar el sobrenadante por inversión.
28. Agregar 1 mL de etanol al 70%.
29. Centrifugar 10 min. a 12000 rpm durante 20 min. a 4°C. Desechar el sobrenadante por inversión.
30. Secar el pellet de RNA en Speed Vac.
31. Resuspender el pellet de RNA con formamida (la cantidad de formamida, dependerá del tamaño del pellet) con ayuda del vortex.
32. Prender el multiblock y ajustarlo a 55 ó a 65 °C.
33. Incubar a 55 °C durante 10 min. ó a 65 °C por 5 min.
34. Se atempera y se procede a su cuantificación. En caso de no utilizarse inmediatamente, se almacena a -70°C hasta su uso. (76, 82).

## ANEXO II - A.

### REACTIVO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

- **Tiocinato de Guanidina 500 ml**

Tiocinato de guanidina	236.32 g
Citrato de Sodio 1M, pH 7.0	12.5 mL
Agua de DEPC	Aforar a 500 mL

**No mezclar.** Calentar en baño maría 30min a 40°C, enfriar en hielo, esterilizar por filtración con membrana de nylon 0.22  $\mu\text{m}$  y guardar a 4 °C.

- **Cloruro de Cesio 250 ml**

Cloruro de Cesio	230 g
Acetato de Sodio 3M, pH 5.2	2 mL
Agua de DEPC	Aforar a 250 mL

Esterilizar por filtración con membrana de nylon 0.22  $\mu\text{m}$  y guardar a temperatura ambiente.

- **Acetato de Sodio 3M 50 ml**

Acetato de Sodio	20.415 g
Agua de DEPC	Aforar a 50 mL

Esterilizar por filtración con membrana de nylon 0.22  $\mu\text{m}$  y guardar a temperatura ambiente.

- **Lauril sarcosil 10 % 100 ml**

N – Laurilsarcosina sal de sodio (fw 293.4)	10 g
Agua de DEPC	Aforar a 100 mL

Mezclar por 1 hora o hasta que se disuelva, se deja reposar por 15min para que desaparezcan las burbujas. Esterilizar por filtración con membrana de nylon 0.22  $\mu\text{m}$  y guardar a temperatura ambiente.

- **Citrato de sodio dihidratado 0.75 M pH 7.0:**

Pesar 22.05 g de citrato de sodio dihidratado, agregar 50 mL de agua-DEPC. Ajustar el pH a 7.0 con HCl 1N. Aforar a 100 mL con agua-DEPC. Almacenar hasta 6 meses a temperatura ambiente.

- **Sarcosil al 10%:**

Pesar 10 g de sarcosil y aforar a 100 mL con agua-DEPC. Almacenar a temperatura ambiente por 6 meses.

- **Solución desnaturizante:**

Pesar 47.35 g de GITC (tiocianato de guanidina), y disolverlos en 55 mL de agua-DEPC, agregar 3.33 mL de citrato de sodio 0.75 M pH 7.0 y 5 mL de sarcosil al 10%. Disolver a 60-65°C, tapar con parafilm y aluminio y posteriormente aforar a 100 mL con agua-DEPC.

- **Solución desnaturizante con  $\beta$ -mercaptoetanol:**

En un tubo Falcon de 50 mL se adicionan 50 mL de la solución desnaturizante y 0.350 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta solución se almacena hasta 3 meses a temperatura ambiente.

- **Acetato de sodio 2 M pH 4.0:**

Pesar 16.42 g de acetato de sodio anhidro y adicionarle 40 mL de agua-DEPC más 40 mL de ácido acético glacial; ajustar el pH a 4.0 con el mismo ácido. Aforar a 100 mL con agua-DEPC. Almacenar hasta 6 meses a temperatura ambiente.

- **Agua saturada con fenol (fenol acuoso):**

Disolver 100 g de cristales de fenol en baño de agua a una temperatura de 60-65 °C. Una vez disuelto añadir 100 mL de agua-DEPC. Aspirar la fase superior acuosa y desechar. Almacenar por 1 mes a 4 °C.

- **Cloroformo/alcohol isoamílico 49:1 (vol/vol):**

Guardar en congelación.

- **Isopropanol al 100%:**

Guardar en congelación.

- **Etanol al 75%:**

Colocar 75 mL de etanol absoluto y añadir 25 mL de agua-DEPC. Guardar en congelación.

- **Etanol al 70%:**

A 70 mL de etanol absoluto añadir 30 mL de agua-DEPC.

- **Acetato de sodio 3 M pH 6.0:**

Pesar 102.06 g de acetato de sodio, añadir 200 mL de agua-DEPC. Ajustar el pH a 6.0 con ácido acético. Aforar a 250 mL con agua-DEPC. Almacenar hasta 6 meses a temperatura ambiente.

- **Fenol amortiguado pH 8.0 / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1):**

Guardar en refrigeración por 6 meses.

- **Agua DEPC:**

3 mL de dietilpirocarbonato se llevan a 3000 mL de agua desionizada. Se coloca en agitación durante 4 hrs. Condiciones de autoclave 15min/15 lg/plg2. Condiciones del horno 180 °C por 4 hrs.

**Nota:** *Todas las soluciones deberán ser preparadas con agua tratada con DEPC y el material de vidrio debe estar libre de RNAsas, lo cual se logra horneándolo a 180°C durante 4 hrs.*

## ANEXO III

### CUANTIFICACIÓN DE RNA

- El RNA se cuantifica midiendo su absorbancia a 260 nanómetro por espectrofotometría.
- Se incuba la muestra de RNA a 65°C por 5 min. En un tubo Eppendorf nuevo libre de DNAasas y RNAasas agregar 4 µl de la muestra de RNA. Se agregan 996 µl buffer TE pH 7.5. Se mezcla ligeramente en vortex y leer a 260 nm en celdas de cuarzo.
- Para corroborar la pureza del RNA se toma lectura a 260 y 280 nm para obtener la relación 260/280 que debe ser de 1.9 – 2.2. Si el valor de la lectura no se encontrara en este intervalo, se puede decir que el RNA se encuentra contaminado con proteínas. Posteriormente se hace un barrido de la muestra de 230 a 290 nm.
- Finalmente, se ajusta el RNA a la cantidad deseada para el corrimiento de la electroforesis.



## ANEXO IV

# ELECTROFORESIS DE RNA

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

Se coloca el peine en la cámara de electroforesis, previamente enjuagada con agua DEPC y equilibrar. Pesar 1 g de agarosa libre de DNAsas y RNAsas (sin espátula) y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Añadir 74.5 ml de agua DEPC. Calentar hasta disolver la agarosa completamente.

Añadir 10 ml de GRB (10X) y 16.49 mL de formaldehído al 40%. Mezclar bien y vaciar en la base del molde de la cámara de electroforesis, evitando que se formen burbujas. Se deja solidificar.

Agregar un poco de GRB (1X) frío sobre la superficie del gel para evitar que se seque.

### b) Preparación de las muestras

- Calentar el RNA a 65°C por 5 min.
- Agregar a un Eppendorf nuevo:

RNA (Dependiendo de la cantidad deseada) , GRB (10X), Formaldehído (FDH), Formamida, Amortiguador de cargado, Bromuro de etilo.

- Se mezcla el contenido del tubo en vortex y dar un spin y se incuba nuevamente a 65°C por 5 minutos.

### c) Cargado y corrimiento del gel

- Se remueve el peine de la base del molde sin romper los pozos y colocar el molde con el extremo de los pozos del lado izquierdo de la cámara.
- Añadir suficiente GRB previamente frío para cubrir el gel. Colocar el contenido del eppendorf en cada pozo con cuidado de no hacer burbujas. Correr el gel a 10V/cm (100 volts) hasta que el colorante de azul de bromofenol migre a 2/3 del gel (por 2.5 horas aprox.).

### d) Fotografía del gel

- Se prende la cámara. Colocar el gel en el transluminador que se encuentra cubierto por la cámara fotográfica. Se toma la fotografía en el programa Kodak en la computadora.

## **ANEXO V**

### **NORTHERN BLOT**

#### **CUANTIFICACIÓN DE RNA**

##### **Aparatos y Equipos:**

\* Espectrofotómetro Beckman mod. DU-640 y Multiblock

##### **Material:**

\* Celdas de cuarzo, gradilla, tubos eppendorf nuevos (libres de DNAsas y RNAsas) y micropipetas de 1000 y de 10 mL

##### **Protocolo**

1. Prender el espectrofotómetro y la luz UV por lo menos 15 min. antes de hacer las lecturas.
2. Prender el multiblock y ajustar a 55 °C ó a 65 °C.
3. Lavar las celdas de cuarzo perfectamente bien con jabón neutro. Posteriormente dar una enjuagada con agua desionizada y con agua-DEPC. Dejar escurrir.
4. Sacar las muestras del ultracongelador, dejar que se descongelen y posteriormente incubar por 10 min. a 55°C ó 5 min. a 65 °C en el multiblock.
5. Agregar 996 mL de buffer TE a un tubo Eppendorf nuevo.
6. Transcurridos los 5 ó 10 min. tomar 4 mL de RNA o de formamida (para el blanco) y agregarlos en el tubo que contiene el bufferTE (se tendrá una dilución 1:250 nm)
7. Mezclar con un ligero vortex y poner el contenido del tubo en la celda de cuarzo.
8. Introducir las celdas al espectrofotómetro, después de secarlas perfectamente bien con un pañuelo desechable, cuidando de no dejarle pelusas.

9. Entrar al programa de ácidos nucleicos y programar el número de celdas que se va a leer.

10. Leer primero el blanco (que solamente contiene formamida) y posteriormente leer las muestras a 260 y a 280 nm.

11. La relación 260/280 debe estar comprendida entre 1.9 y 2.2. Imprimir la hoja.

12. Posteriormente, salirse del programa de ácidos nucleicos y acceder al de "Wavelength Scan" y ajustar las lecturas del barrido a 230 y 290 nm. Ajustar el número de muestras e indicar que se empalmen las curvas.

13. Leer el blanco y luego leer las muestras. Imprimir la hoja.

Cálculos:

**Sabiendo que: 1 D. O.                    ===== 40 g RNA**  
**D. O. del problema            ===== X D. O.= Densidad óptica**

El resultado se multiplica por el factor de dilución (250) para obtener la concentración en g/mL. Conociendo la concentración se ajusta a la cantidad de g deseados que se requiera para la electroforesis.

En caso de que no se utilicen las muestras inmediatamente, se guardan a -70°C.

## ANEXO V - A

### REACTIVOS PARA CUANTIFICACIÓN DE RNA

- **Buffer TE:**

Pesar 4.576 g de tris-HCL, llevarlo a 900 mL con agua desionizada. Agregar 2.5 mL de EDTA .4 M pH 8.0. Llevar la solución hasta un pH de 7.5 con NaOH y aforar a 1000 mL. La concentración final será de 1 mM.

- **Agua desionizada**

- **Agua-DEPC:**

Ver preparación en la extracción de RNA.

## ANEXO V – B

# TRANSFERENCIA DE RNA DEL GEL A LA MEMBRANA

### Aparatos y Equipos

- \* Crosslinker y Campana de extracción

### Material

- \* Platón rectangular, vidrio, pipeta Pasteur, papel de alimentos para envolver, 1 tira de papel filtro Whatman 3MM de 15x28 cm, 3 cuadros de papel filtro Whatman 3MM de 15x30 cm, 5 cuadros de papel filtro Whatman 3MM de 12x14cm, membrana de nylon para transferencia de ácidos nucleicos Hybond N+ de 12x14cm y aprox. 7 cm de toallas de papel absorbente de 12x14 cm.

### Protocolo

1. Una vez que se tomó la fotografía del gel, cambiar el agua desionizada por nueva y darle 10min de lavado.
2. Desechar el agua y agregar aprox. 300 mL de solución 20X SSC. Dejar equilibrar por aprox. 20-30 min.
3. Colocar en un platón rectangular un vidrio. Equilibrar con la ayuda de una burbuja. Agregar aprox. 400 mL de solución SSC 20X, en el fondo del platón.
4. Mojar la tira de papel filtro de 15x28cm con la solución SSC 20X del mismo platón y colocarla sobre la superficie del vidrio que está sobre el platón, dejando los extremos en contacto con la solución. Se forma un puente.
5. Eliminar las burbujas rotando una pipeta Pasteur a lo largo de la superficie de la tira.
6. Colocar 3 cuadros de papel filtro de 13x15cm sobre el puente y remojarlos con solución SSC 20X. Eliminar las burbujas rotando una pipeta Pasteur.
7. Colocar el gel boca abajo sobre los 3 cuadros de papel. Eliminar las burbujas rotando una pipeta Pasteur.

8. Colocar la membrana de transferencia de 12x14cm sobre el gel. Eliminar las burbujas rotando una pipeta Pasteur. Es importante que una vez que la membrana toca el gel, ésta no se vuelva a mover.
9. Colocar 5 papeles filtro de 12x14 cm. sobre la membrana. Remojarlos con solución SSC 20X. Eliminar las burbujas rotando una pipeta Pasteur.
10. Cortar 4 tiras de papel de plástico para alimentos y ponerlas sobre los bordes del gel y los filtros.
11. Colocar las toallas de papel absorbente de 12x14 cm. sobre los papeles filtro y apilarlas hasta alcanzar una altura aproximada de 7 cm.
12. Cubrir todo el platón con papel de envoltura de alimentos y sobre éste a su vez un peso de aprox. 1 Kg. Incubar durante 24 hrs. o hasta que todo el papel absorbente se encuentre perfectamente bien mojado.
13. Transcurrido este tiempo, quitar las toallas y los papeles filtro y recuperar la membrana de nylon y el gel aplanado. Marcar la orientación de las muestras en la membrana.
14. Lavar la membrana con aprox. 100 mL de solución SSC 2X durante 10 min.
15. Mientras transcurre este tiempo, verificar que no queden rastros de muestras en el gel, con ayuda de un transiluminador con luz UV. Esto nos asegura que se tuvo una transferencia completa.
16. Fijas el RNA en la membrana con UV a 700 nm (Crosslinker). Cubrir con papel de plástico y guardar en refrigeración hasta su uso.

## ANEXO V - C

# REACTIVOS PARA TRANSFERENCIA DE GEL A LA MEMBRANA

- **Solución 20X SSC:**

Disolver en 1,800 mL de agua desionizada 350.6 g de cloruro de sodio y 176.8 g de citrato de sodio dihidratado. Aforar a 2,000 mL.

- **Solución 2X SSC:**

Llevar 5 mL de la solución 20X SSC a 100 mL con agua desionizada.

## ANEXO V – D

### MARCAJE CON SONDAS (REDIPRIME II)

#### Aparatos y Equipos:

\* Horno de hibridación, baño de incubación (37 °C y 65 °C) y plataforma agitadora

#### Material

\* Pro pipeta, pipeta de 25 mL, micropipetas de 20, 100 y 1000 mL con puntas, tubos eppendorf nuevos, gradilla, tubos de hibridación, pinzas, vaso de precipitados de 250 mL con perlas de ebullición, mechero, probeta de 100 mL y 2 Recipientes de vidrio.

#### Protocolo

1. Encender el horno de hibridación y ajustarlo a 65 °C.
2. Encender el baño a 37 °C.
3. Poner agua a hervir.
4. Prehibridización.
  - a.) Se introduce la membrana en el tubo de hibridación con la cara brillante hacia adentro.
  - b.) Se agregan 15 mL de buffer de prehibridización (Rapid-Hyb Buffer) al fondo del tubo (sin tocar la membrana).
  - c.) Se cierra el tubo y se moja totalmente la membrana con movimientos rotatorios.
  - d.) Se eliminan las burbujas formadas con ayuda de la pipeta de 25 mL, cuidando de no maltratar la membrana.
  - e.) Se introduce el tubo al horno de hibridación. El tiempo mínimo de prehibridización es de 30 min. a velocidad 5.
5. Marcaje de la sonda con 32P.
  - a.) En un tubo Eppendorf nuevo, diluir la sonda con buffer TE de tal suerte que se tenga una concentración de 2.5-25 ng en 45 mL de volumen final.
  - b.) Desnaturalizar la sonda calentándola a ebullición por 5 min.



- c.) Pasar al hielo por otros 5 min.
  - d.) Centrifugar brevemente para bajar el contenido del tubo al fondo.
  - e.) Añadir toda la sonda al tubo de reacción REDIPRIME II sin mezclar.
  - f.) Agregar 5 mL de redivue (32P) dCTP y mezclar por pipeteo cuidando de no hacer burbujas. Esto se hará hasta que de tener un color azul, vire hasta uno violeta.
  - g.) Incubar a 37 °C por 10 min. Nota: Se obtiene un mejor rendimiento si la incubación se prolonga de 20 a 60 min.
  - h.) Transcurrido este tiempo detener la reacción añadiendo 25 mL de EDTA 0.2 M.
  - i.) Calentar el tubo de reacción a ebullición por 5 min.
  - j.) Colocar el tubo en hielo por otros 5 min.
  - k.) Sacar el tubo de hibridación del horno y quitarle aprox. 5 mL de buffer de hibridación. Posteriormente tomar aprox. 50 mL del mismo buffer y añadirlos al tubo de reacción.
  - l.) Mezclar bien el contenido del tubo de reacción y añadirlos al fondo del tubo de hibridación.
  - m.) Cerrar el tubo y rotarlo para mojar bien la membrana.
  - n.) Incubar en el horno a 65 °C por espacio de 2.5 hrs. a velocidad 5.
6. Lavados de la membrana.
- a.) Colocar 100 mL de solución 2X SSC/1SDS en un recipiente de vidrio.
  - b.) Sacar la membrana del tubo de hibridación, escurrirla lo mejor posible y colocarla en el recipiente con la solución.
  - c.) Colocar el recipiente de vidrio en rodillos o en una plataforma de agitación a temperatura ambiente por 20 min.
  - d.) Mientras tanto, en una probeta colocar 100 mL de solución 0.1X SSC/0.1X SDS e incubar a 65 °C en el horno de hibridación hasta lograr la temperatura.
  - e.) Sacar la membrana del recipiente y colocarla en otro que contiene la solución 0.1X SSC/0.1X SDS.
  - f.) Incubar con agitación a 65 °C por 15 min.
  - g.) Repetir una vez más el último paso de lavado.

7. Autorradiografía electrónica (Instant Imager)

a.) Envolver la membrana en papel plástico para alimentos, cuidando de no dejar burbujas ni demasiado líquido en el interior.

b.) Leer las cuentas por minuto de radiactividad en el Instant Imager.

8. Autorradiografía en cassette.

a.) Colocar la membrana en cassette de Autorradiografía e incubar por aprox. 14-18 hrs. en el ultracongelador (-70 °C).

b.) Revelar.

## ANEXO V - E

### REACTIVOS PARA EL MARCAJE CON SONDA

- **EDTA 0.2 M:**

Pesar 0.7444 g de EDTA y añadirlos a 9 mL de agua desionizada. Llevar a pH de 8.0 y posteriormente aforar a 10 mL.

- **Buffer TE:**

Pesar 1.576 g de tris-HCL, llevarlo a 900 mL con agua desionizada y agregar 2.5 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar a pH 8.0 con NaOH y llevar a 1 L.

- **Buffer de hibridización:**

RAPID-HYB BUFFER de Amersham Pharmacia (cat. RPN 1636)

- **Sistema de marcaje:**

REDIPRIME II de Amersham Pharmacia (cat. RPN 1633)

- **Redivue (32P):**

dCTP 25 Ci.

- **Solución 2X SSC/ 0.1X SDS:**

Tomar 50 mL de la solución SSC 20X y añadirlos a 450 mL de agua desionizada. Agregar 0.5g de SDS. Mezclar con agitación y aforar a 500 mL.

- **Solución 0.1X SSC/0.1XSDS:**

Tomar 0.5 mL de solución SSC 20X y 0.5 g de SDS. Añadirlos a 450 mL de agua desionizada y mezclar con agitación. Aforar a 500 mL.