

Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata

**COMPONENTES BIOACTIVOS DE SOJA**  
Francisco José Speroni Aguirre

Tesis Doctoral  
2005

TESIS  
Nº 1125

Directora  
Prof. Dra. María Cristina Añón

Co-Directora  
Prof. Dra. Verónica Milesi

Este trabajo está dedicado a mis padres María Elisa y Edgardo.

Vencerse a sí mismo es la mayor victoria.

Francesco Silvani

El presente trabajo, para optar por el grado académico  
de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas,  
fue realizado en la  
Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Exactas  
y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos.

## Agradecimientos.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la solidaridad de muchas personas, algunas ayudaron directamente en el trabajo, otras estuvieron involucradas en otros aspectos por lo que también deseo mencionarlas.

A la Dra. María Cristina Añón, por haber confiado en mí y ofrecerme su tiempo e inteligencia para hacerme menos torpe. Por enseñarme a ver más allá.

A la Dra. Verónica Milesi, por guiar con su capacidad y creatividad mi trabajo. Por fomentar en mí la libertad de pensamiento e impulsar con optimismo la labor.

A ambas por haber desplegado un operativo maratónico en los últimos días para terminar la escritura de esta tesis.

A Aldo Campana por su ayuda indispensable con el HPLC, por adaptarse a mi forma de trabajo y por enseñarme la suya. Por su amistad, compañía a la mañana y buena voluntad.

A Silvia Salemme, por su ayuda con los experimentos de *patch* y por hacerme feliz.

A Silvana Petruccelli, por su talento, su apoyo, pero sobre todo por su amistad.

A Ángela Grassi, por su sabiduría, su afecto y por haber creado *de novo* uno de los lugares de trabajo en los que se realizó esta tesis.

A Eugenio Micucci y Nicolás Guerello por la confianza y la paciencia que me tuvieron.

A Sara Molina por todo lo que me enseñó en el laboratorio y por entenderme tanto.

A Juan Carlos y Cachito por el apoyo y el afecto que me brindan.

A Alejandro, Valeria S., Valeria M., Alicia, Florencia, Mariana por compartir el trabajo en un clima familiar.

A Alejandra, Paula, Isabel, Nora, Lilly, Gabriela, Victoria, Cristina F., Cecilia, Ariana, Renata, Pablo S., Jorge, Adriana M., Adriana S., Pato, Pablo M. Fabricio, Leo S., Bruno y Pani por compartir las horas del CIDCA - y hacerlas divertidas -, por el aliento y el intercambio de ideas enriquecedor.

A Gustavo Rinaldi por su buena voluntad para colaborar con los ensayos y el equipamiento.

A Alberto Fossati por su estímulo.

A Leticia Musacchio por su buena voluntad y sentido del humor.

A Natalia Bourdet, Ayelén Hugo, Lucy Brandi y Fernando Trejo por ser excelentes compañeros.

A Eduardo Escudero, Sara Coronel y Liliana Santos, por mantener en condiciones el CIDCA, su buena disposición y compañerismo.

A Diana por su buena disposición en la búsqueda de bibliografía.

A Sara R., Coca, Liliana, Nelly y Ana Laura por hacer más fáciles tantas cosas.

A Alicia Chaves y Alicia Califano por las soluciones a mis frecuentes consultas de estadística.

A Pablo, Nicolás, Néstor, Eduardo D., José Luis, Luis, Tortu, Vicente y Mario por el sostén tecnológico y el buen humor.

A mis alumnos por alegrar el trabajo en la facultad (y justificarlo).

A Franco Tanzi y Abdul Raqeeb por hacerme uno más en su laboratorio y los momentos compartidos.

A los muchachos del *Club de Hombres* del CIDCA.

A Graciela, Alejandra, Valeria L., Silvina L., Silvia G., Mariana P., Federico D., Federico S., Matías, al Cometa, Rosli, Juan Ignacio C., Telmo P. Juan Pablo, Adrián y Gustavo M. por quererme.

A Edgardo, María Elisa, Mariana, María, Enrique, Pichi, Gabriel, Ana, Celia, Clara, Lucio, Bessie y Abel por ser mi familia.

Al CONICET y ANPCYT por haber financiado el trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata que, siendo pública y gratuita, me brindó la posibilidad de acceder a una excelente formación.

# Índice

<b>I. Introducción</b>	1
I.1. La soja como alimento funcional	1
I.2. Proteínas de soja	2
I.3. Isoflavonas de soja	3
I.4. Variación de la composición de isoflavonas con el procesamiento de alimentos	5
I.5. Interacción isoflavonas – proteínas	6
I.6. Soja y salud humana	7
I.6.1. Efectos biológicos beneficiosos	7
I.6.2. Efectos de los componentes de soja sobre el aparato cardiovascular	8
I.6.2.1 Efectos en los niveles de colesterol	8
I.6.2.2. Efectos sobre la presión arterial	9
I.7. Músculo liso vascular	10
I.8. Efectos biológicos de las isoflavonas de soja sobre el músculo liso vascular	14
<b>II. Objetivos</b>	17
<b>III. Materiales y Métodos</b>	19
III.1. Isoflavonas y proteínas de soja	19
III.1.1 Materia prima	19
III.1.2. Preparación de aislados proteicos de soja	19
III.1.2.1. Procedimiento básico	21
III.1.2.2. Modificaciones del procedimiento básico	
III.1.2.3. Preparación de las globulinas de soja $\beta$ -conglucina y glicinina parcialmente purificadas	23
III.1.3. Extracción y determinación del contenido de isoflavonas en harina y productos derivados de soja.	25
III.1.3.1. Extracción y cuantificación	25
III.1.3.1. Modificaciones en las condiciones de extracción de isoflavonas de productos derivados de soja	26
III.1.4. Determinación de actividad beta-glucosidasa en harina de soja	27
III.1.5. Macerado de harina de soja en agua a distintos pHs	27
III.1.6. Ensayo de precipitación y solubilización de proteínas	27
III.1.7. Evaluación de la liberación de isoflavonas de $\beta$ -conglucina y glicinina	28
III.1.8. Determinación del contenido proteico de los distintos productos analizados	28
III.1.9. Análisis de la composición polipeptídica de aislados proteicos	29
III.1.10 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido	29
III.2. Actividad biológica de isoflavonas	30
III.2.1. Muestras biológicas	30
III.2.1.1. Arteria umbilical humana	30
III.2.1.2. Aorta de Rata	31
III.2.2. Determinación de fuerza isométrica en anillos vasculares	31
III.2.3. Determinaciones electrofisiológicas mediante la técnica de <i>patch clamp</i>	33
III.2.4. Determinación de concentración de $Ca^{2+}$ intracelular en segmentos vasculares	38
III.3. Drogas y reactivos utilizados	41
III.4. Análisis estadístico de los resultados	41

<b>IV. Isoflavonas y proteínas de soja</b>	42
IV.1. Procedimiento de cuantificación de isoflavonas	42
IV.2. Isoflavonas en harinas desgrasadas de soja	44
IV.2.1. Contenido de isoflavonas en harinas desgrasadas de soja	44
IV.2.2. Efecto del macerado de harinas a distintos pHs sobre el patrón de conjugación	45
IV.2.3. Determinación de actividad $\beta$ -glucosidasa en harinas de soja	46
IV.3. Isoflavonas en aislados proteicos y subproductos	48
IV.3.1. Modificación de variables de proceso correspondientes a la etapa de extracción de proteínas en la preparación de aislados.	48
IV.3.1.1. Cambios en el pH	48
IV.3.1.2. Cambios en el pH y la temperatura	50
IV.3.2. Modificación de variables de proceso correspondientes a la etapa de precipitación de proteínas en la preparación de aislados.	51
IV.3.2.1. Cambios en el pH	51
IV.3.2.2. Cambios en el tiempo y el pH	53
IV.3.2.3. Cambio en la temperatura y el pH	54
IV.3.3. Modificaciones combinadas de variables de proceso de la preparación de aislados proteicos	57
IV.3.3.1. Extracción a pH 8,0 u 11,0, precipitación a pH 3,5 o 4,5 de proteínas	57
IV.3.3.2. Cambio en la temperatura y el pH de precipitación proteica con macerado previo de harina a pH 6,5 durante 8 horas	58
IV. 4. Isoflavonas en $\beta$ -conglucina y glicinina	60
IV.4.1. Contenido de isoflavonas en $\beta$ -conglucina y glicinina	60
IV.4.2. Disociación isoflavonas - $\beta$ -conglucina e isoflavonas - glicinina	63
IV.5. Caracterización de la interacción isoflavonas - proteínas	64
IV.5.1. Cambios en las condiciones de extracción de isoflavonas de productos derivados de soja	64
IV.5.1.1. Cambios en el pH durante la extracción hidroalcohólica de isoflavonas	64
IV.5.1.2. Cambios en la composición del solvente y en el tiempo de exposición durante la extracción hidroalcohólica	67
IV.5.1.2.1. Efectos sobre el aislado proteico	68
IV.5.1.2.2. Efectos sobre el suero y los productos de composición intermedia	69
IV.5.2. Precipitación y solubilización de proteínas	71
IV.6. Preparación de aislados proteicos de soja con alto contenido de isoflavonas bioactivas	74



<b>V. Efectos biológicos de las isoflavonas de soja sobre el músculo liso vascular</b>	77
V.1. En aorta de rata	77
V.1.1. Efectos vasorrelajantes de Genisteína y Daidzeína.	77
V.1.2. Efectos de Genisteína sobre la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en células de músculo liso de aorta de rata in situ.	78
V.2. En arteria umbilical humana (AUH)	84
V.2.1. Efectos vasorrelajantes de Genisteína y Daidzeína	84
V.2.2 Efectos de Genisteína sobre la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en células de músculo liso de la AUH in situ.	87
V.2.3. Efectos sobre canales iónicos presentes en la membrana celular de las células de músculo liso de la AUH	94
V.2.3.1. Efecto de Genisteína y Daizeína sobre las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$	95
V.2.3.2. Efecto de Genisteína y Daizeína sobre la corriente catiónica no selectiva (CNS)	97
V.2.3.3. Efecto de Genisteína y Daizeína sobre las corrientes de $\text{K}^+$	98
<b>VI. Conclusiones</b>	101
<b>Referencias bibliográficas</b>	104

# Introducción

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. La soja como alimento funcional

En los últimos años los alimentos funcionales han adquirido una gran importancia en la industria de alimentos. El término “alimento funcional” se refiere a alimentos o ingredientes que proveen beneficios fisiológicos adicionales además de los requerimientos nutricionales que satisfacen. Actualmente se tiende a desarrollar este tipo de productos dado que existen evidencias acerca de su participación en la prevención y tratamiento de varias enfermedades como cáncer, diabetes o patología cardiovascular. En este sentido, la soja (*Glycine max* L) despierta gran interés ya que su consumo ha sido asociado con la prevención de dos de las patologías con mayor incidencia en la población mundial, como son distintos tipos de cáncer y las enfermedades cardiovasculares, entre otros efectos como reducir la sintomatología posmenopáusica y la osteoporosis (Messina, 2003; Desroches y col., 2004; Vis y col., 2005).

La mayor parte de los alimentos está representada por sistemas complejos formados por numerosos componentes que interactúan entre sí, por lo que es difícil identificar a las sustancias responsables de un determinado efecto fisiológico, aunque esto es una meta importante para catalogar a un producto como “alimento funcional”.

Entre las sustancias aportadas por los alimentos que podrían ser benéficas para la salud se encuentran las proteínas (animales o vegetales), péptidos provenientes de la hidrólisis de proteínas en el tracto digestivo, sustancias probióticas y prebióticas, fibra dietaria y los fitoquímicos, (Milner, 1999; Berry, 2002). En el caso particular de la soja tanto macro como microcomponentes han sido asociados con distintas acciones biológicas (Platt 2000; Barnes 2004; Gibbs y col., 2004).

El grano de soja contiene 40 % de proteínas, 21 % de lípidos, 34 % de hidratos de carbono y un 4,9 % de cenizas (valores expresados en base seca) (Erickson y col., 1995). Las proteínas de soja son altamente digeribles y de alto valor biológico, excepto para los infantes, cuyo requerimiento de algunos aminoácidos esenciales es mayor que en el adulto. (Fukushima, 1991). Los lípidos están representados básicamente por triglicéridos y fosfolípidos, en tanto que los principales hidratos de carbono son azúcares de bajo peso molecular como estaquiosa, rafinosa y sacarosa, y carbohidratos de alto peso molecular que constituyen la fibra dietaria. Además, el grano de soja posee, en menor proporción, isoflavonas también denominadas fitoestrógenos, saponinas y lisofosfolípidos (Fang y col., 2004) los cuales podrían poseer actividad biológica.

## I.2. Proteínas de soja

Las proteínas de soja se utilizan como suplementos en la preparación de muchos alimentos procesados debido a su alto valor nutricional - dado que sólo son deficientes en aminoácidos azufrados - y sus buenas propiedades fisicoquímicas y funcionales -por ejemplo su capacidad de emulsificación y formación de geles y espumas - (Utsumi, 1992; Utsumi y col., 1997). Las proteínas de soja se clasifican sobre la base de su solubilidad en albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas). Estas últimas son las responsables de las propiedades funcionales anteriormente mencionadas representando el 80% de las proteínas totales. La fracción globulinas está compuesta por las denominadas globulinas 7S y 11S según sus coeficientes de sedimentación de Svedberg (Utsumi, 1992; Utsumi y col., 1997). La globulina 7S o  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína trimérica formada por tres subunidades mayores:  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$  (PM 68; 72 y 52 kDa, respectivamente) que se caracterizan por poseer determinantes antigénicos comunes (Thanh y Shibasaki, 1976 y 1978). En tanto que la glicina o globulina 11S es hexamérica estando formada por cinco clases de subunidades AB (PM 58 - 69 kDa), que en condiciones reductoras dan origen a polipéptidos ácidos (A) y básicos (B) (Nielsen, 1985). Estas dos proteínas están relacionadas evolutivamente, estando sus subunidades constituidas por los dominios formados por un barril de hojas betas conectado por tres alfa hélices (motivo conocido como *jelly-roll* o *swiss-roll*, término de la lengua inglesa) (Adachi y col., 2001; Adachi y col., 2003; Maruyama y col., 2004). Este tipo de estructura es muy compacta por lo que también se la conoce como cupina - barril pequeño - y es compartida con proteínas que intervienen en procesos de deshidratación por ejemplo las proteínas que forman parte de esporas bacterianas, encontrándose también en la mayor parte de semillas de leguminosas.

Las albúminas están formadas por proteínas con actividad biológica entre las que se encuentran los inhibidores de tripsina como el inhibidor de Bowman-Birk (PM 7,8 kDa, y el de Kunitz (PM 21,5 kDa). Estas proteínas presentan alta solubilidad a pH 4,5 (Utsumi y col., 1997).

Las proteínas de soja son ampliamente utilizadas en alimentos por sus características fisico-químicas tales como su solubilidad y propiedades de superficie, involucradas en la viscosidad, capacidad de emulsificación, espumado y gelificación. En muchos casos estas proteínas se agregan a los alimentos bajo la forma de aislados proteicos de soja, productos refinados, constituidos principalmente por glicina y  $\beta$ -

conglucina, que poseen propiedades funcionales específicas. (Utsumi, 1992; Utsumi y col., 1997; Tsumura y col., 2005).

### I.3. Isoflavonas de soja

Las leguminosas contienen un grupo distintivo de componentes denominados colectivamente isoflavonoides. Este grupo incluye las isoflavonas Daidzeína, Genisteína y Gliciteína (figura I.1) y pterocarpanos como medicarpina y gluceolínes. Los isoflavonoides son esenciales en las interacciones entre las bacterias simbióticas - como *Rhizobium spp* - y las leguminosas funcionando como quimiotácticos y moléculas señal (Hungria y col., 1992). También se utilizan como precursores de fitoalexinas que cumplen un rol en procesos de defensa contra patógenos bacterianos y fúngicos (Dixon y Ferreira, 2002).

Las isoflavonas presentes en la soja son Genisteína, Daidzeína y Gliciteína, estas tres especies pueden encontrarse libres (agluconas) o conjugadas a una molécula de glucosa mediante un enlace beta establecido con su carbono 7, denominándose  $\beta$ -glucósidos. A su vez esta molécula de glucosa puede estar esterificada en su carbono 6'' con ácido malónico o con ácido acético, formando el malonil-éster o el acetil-éster correspondiente. En la planta las isoflavonas son sintetizadas bajo la forma de malonil-ésteres que son solubles y se distribuyen en los distintos tejidos constituyendo los precursores para las otras formas. En el poroto de soja, en la harina o en cualquier producto derivado de ellos se encontrará una proporción determinada de aglucona,  $\beta$ -glucósido, malonato de  $\beta$ -glucósido o acetato de  $\beta$ -glucósido debido a las transformaciones que sufren los malonil-glucósidos. La variabilidad en las proporciones con que se presentan estas sustancias genera diferentes patrones de conjugación. En la figuras I.1 se muestran las diferentes isoflavonas de la soja.

El patrón de conjugación con que se presentan las isoflavonas depende de la variedad de la soja y de las condiciones de desarrollo, cultivo, almacenamiento y procesamiento del grano hasta el producto final (Franke y col., 1999). De este patrón de conjugación depende el valor del grano o producto derivado como alimento funcional, dado que la forma que se absorbe mayoritariamente en el tracto gastrointestinal es la aglucona, que puede formarse a partir del  $\beta$ -glucósido por acción de las enzimas presentes en la luz del intestino como florizina-lactosa hidrolasa (Zafar y col., 2004). La aglucona no puede formarse a partir de los ésteres ya que éstos no son utilizados como sustrato por las enzimas intestinales (Ismail y col., 2005). Kawakami y col., (2005)

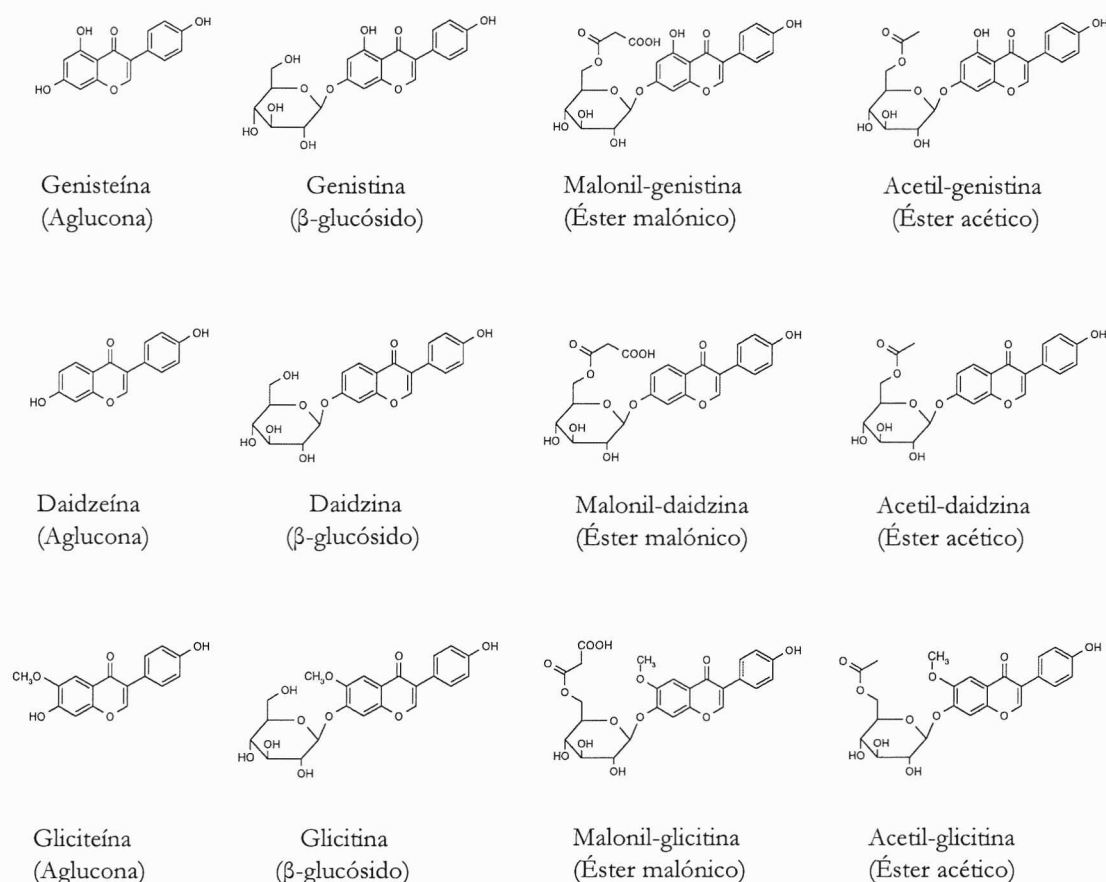


Figura I.1. Series de Genisteína, Daidzeína y Gliciteína, isoflavonas presentes en el grano de soja

compararon el efecto de suplementar la dieta de ratas con isoflavonas conjugadas o agluconas y hallaron que el efecto de las agluconas en los niveles de colesterol y triglicéridos era mucho más importante que el de las formas conjugadas. También del patrón de conjugación depende el sabor del producto final, existen evidencias que indican que el sabor astringente de ciertos alimentos derivados de soja, en parte, es función del contenido de agluconas, (Matsuura y col., 1989, Drewnowski y Gomez-Carneros, 2000). Por otra parte, la actividad antioxidante de las isoflavonas es función del número de hidroxilos libres por lo tanto la conjugación a glucosa disminuye esta propiedad (Naim y col., 1976).

La soja es la principal fuente de isoflavonas para el hombre ya que su contenido oscila entre 100 y 400 mg/100 g de grano (Wang y Murphy, 1994). Otros tipos de poroto contienen como máximo entre 3 y 4 mg/100 g (Mazur y col., 1998; Nakamura y col., 2001). En trébol pueden determinarse valores de hasta 800 mg de isoflavonas por cada 100 g de materia seca de tejidos aéreos (Sivesind y Seguin, 2005), teniendo importancia en la dieta de ciertos animales que utilizan este vegetal como forraje. Por otra parte, existe

información bibliográfica que indica que las isoflavonas del trébol podrían ser consumidas por el hombre en forma de suplementos dietarios (Heinonen y col., 2004).

#### I.4. Variación de la composición de isoflavonas con el procesamiento de alimentos.

El contenido de isoflavonas libres y conjugadas se modifica durante el procesamiento del grano por acción de la  $\beta$ -glucosidasa endógena y / o por determinadas condiciones de temperatura, actividad acuosa y pH que favorecen la hidrólisis no enzimática de las isoflavonas conjugadas. La  $\beta$ -glucosidasa endógena cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -glucosídico entre el oxígeno unido al carbono 1" de la glucosa y el carbono 7 de la isoflavona, convirtiendo las gluconas en agluconas (figura I.2). Esta enzima, habitualmente está presente en el grano de soja pero también puede ser aportada por microorganismos utilizados en la preparación de ciertos alimentos fermentados como salsa de soja, el miso -producto obtenido por fermentación con *Aspergillus oryzae*-, el tempeh -elaborado con *Rhizopus oligosporus*-. La actividad de esta enzima, al igual que la de otras enzimas, es dependiente del pH y de la temperatura del medio siendo su pH y temperatura óptimos de 6,0 y 50 °C, respectivamente (Matsuura y col., 1989). Dado que estas condiciones son habituales en la elaboración de distintos productos derivados de soja, las isoflavonas conjugadas pueden ser transformadas en isoflavonas libres durante el

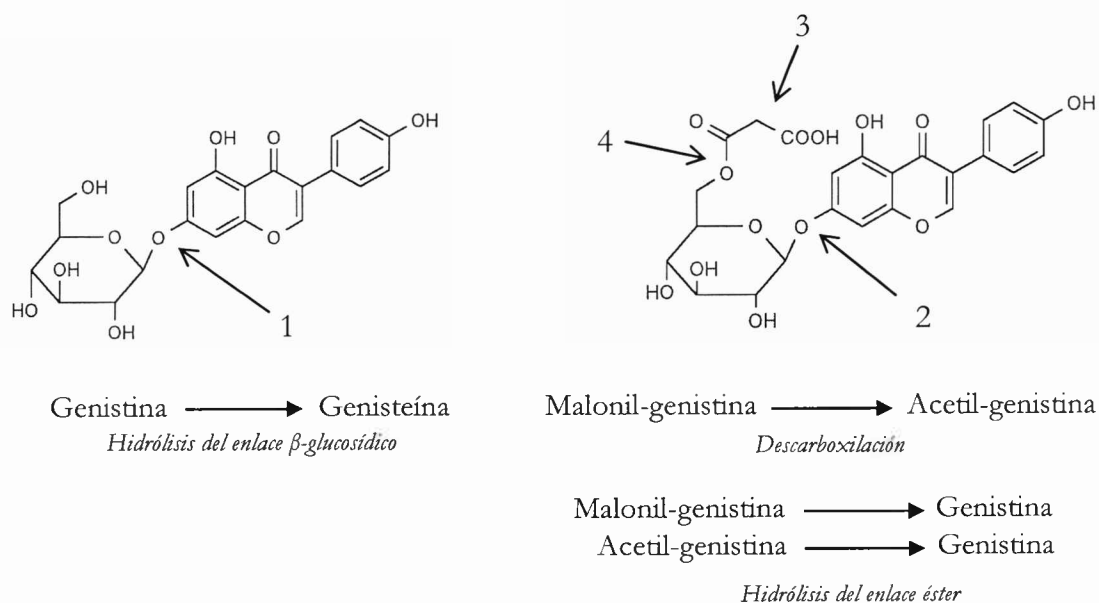


Figura I.2. Enlaces que pueden romperse durante el procesamiento de la soja - esquematizados para Genistina y Malonil-genistina - 1: enlace  $\beta$ -glucosídico que en Genistina puede hidrolizarse por  $H^+$  o en forma enzimática 2: enlace  $\beta$ -glucosídico que en Malonil-genistina puede hidrolizarse sólo por  $H^+$  3: descarboxilación 4: desesterificación.

procesamiento. Sin embargo esta transformación no siempre ocurre ya que la primera etapa en la producción de varios derivados de soja es el desgrasado con solventes orgánicos que luego se eliminan por un tratamiento a 100 - 105 °C - durante 15 o 30 minutos - lo que generalmente provoca un importante grado de desnaturalización proteica y la consecuente inactivación de enzimas, incluida la  $\beta$ -glucosidasa.

La temperatura también puede afectar el patrón de conjugación, ya sea por efecto sobre la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa (Matsuura y col., 1989) como por favorecer la descarboxilación de los malonil-ésteres, generando los acetil-ésteres correspondientes. Esta reacción de descarboxilación se favorece por temperaturas cercanas a los 100 °C en condiciones de baja actividad acuosa (Coward y col., 1998). Igual aumento de temperatura, pero a mayor actividad acuosa, promueve la transformación de malonil-ésteres en  $\beta$ -glucósidos (Franke y col., 1999).

Algunos estudios utilizan previamente a la determinación de isoflavonas en harina de sojas y productos derivados una hidrólisis química; lo cual permite reducir el número de patrones necesarios para la identificación de los distintos componentes. Si la misma se produce en medio ácido (Nakamura y col., 2001) se hidroliza la unión glucosídica obteniéndose las agluconas correspondientes - y se informa el contenido expresado como aglucona -. En cambio en medio alcalino (Klump y col., 2001), se produce la ruptura de la unión éster obteniéndose los  $\beta$ -glucósidos; en este último caso se informan los contenidos de  $\beta$ -glucósidos y agluconas. Sin embargo es importante tener en cuenta que este proceso de hidrólisis produce una destrucción parcial de las isoflavonas e impide contar con información relevante para estimar su biodisponibilidad (Ismail y col., 2005). El medir individualmente la concentración de cada forma de las isoflavonas permite valorar un producto como alimento funcional y conocer la distribución o las interacciones entre las isoflavonas y el resto de componentes del grano de soja. El proceso de hidrólisis antes mencionado podría conducir a una estimación errónea de los efectos que estas sustancias puedan producir cuando se administran a humanos u otros animales con el objetivo de valorar su efecto funcional.

### **I.5. Interacción isoflavonas - proteínas**

Las isoflavonas son moléculas que contienen anillos aromáticos y grupos hidroxilo, por este motivo pueden asociarse de distintas formas a las proteínas. Las posibles interacciones podrían ser estabilizadas por fuerzas de van der Waals, interacción hidrofóbica, unión electrostática y puente de hidrógeno. Por otra parte, los malonil-



conjugados pueden disociarse adquiriendo carga negativa ya que son ácidos débiles, en cuyo caso es más probable una interacción de tipo electrostática. Las formas conjugadas también podrían formar puentes de hidrógeno con distintas regiones de la superficie proteica mediante los hidroxilos de la glucosa. Coward y col., (1993) sugieren la existencia de una fuerte unión entre isoflavonas y proteínas de soja. Kao y col., (2004) proponen que las agluconas establecerían interacciones hidrofóbicas con las proteínas de soja mientras que plantean una interacción de naturaleza hidrofílica entre los  $\beta$ -glucósidos y globulinas de reserva de soja.

Las proteínas de soja sufren modificaciones cuando la materia prima es procesada para formar un alimento, en estos procesamientos están incluidos cambios de pH y de temperatura que podrían afectar, por lo discutido anteriormente, la asociación entre proteínas e isoflavonas.

Conocer las variables que afectan este tipo de interacciones es relevante ya que los conocimientos alcanzados contribuirían a controlar la distribución, retención y contenido de las isoflavonas en los productos de soja y por ende su acción biológica en el hombre.

## **I.6. Soja y salud humana**

### **I.6.1. Efectos biológicos beneficiosos**

En numerosos trabajos se ha planteado que el consumo de soja ejercería efectos beneficiosos para la salud humana y preventivos con respecto al desarrollo de enfermedades como distintos tipos de cáncer (Franke y col., 1999; Vis y col., 2005), osteoporosis (Uenishi, 2005) y sintomatología posmenopáusica, (Mazur y col., 1998; Messina, 2003).

Estudios epidemiológicos muestran una asociación significativa entre el consumo de alimentos que contienen soja en su formulación y la disminución de incidencia de patología cardiovascular (Hasler, 2002; Gardner y col., 2003). Entre las actividades que serían de beneficio para la salud del hombre se han postulado las antioxidantes, hormonales y prebióticas entre otras. La patología cardiovascular es causa de mortalidad importante en Occidente. La Organización Mundial de la Salud (2004) cataloga a los alimentos que contienen soja como posibles factores de disminución de riesgos de esta patología. De estos hallazgos surge la importancia de estudiar en forma aislada los distintos componentes de dichos alimentos con el fin de identificar cuáles son las

sustancias activas y mediante qué posibles mecanismos de acción logran ejercer efectos beneficiosos sobre el aparato cardiovascular y finalmente sobre la salud humana.

## **I.6.2. Efectos de sus componentes sobre el aparato cardiovascular**

### **I.6.2.1. *Efectos sobre los niveles de colesterol***

El consumo de soja ejercería un efecto sobre el aparato cardiovascular a través de la acción de algunos componentes presentes en el grano sobre el metabolismo de lípidos como el colesterol y los triglicéridos. En un trabajo con 1033 mujeres pre y pos menopáusicas, Rossel y col., (2004) analizaron la relación entre el consumo de alimentos que contenían soja y la concentración de colesterol en sangre. Ellos encontraron que un consumo moderado de estos productos se asociaba a una disminución de la concentración de colesterol plasmática. Con el fin de estudiar estos efectos, Tachibana y col., (2005), compararon la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos en hígado de rata. Los resultados obtenidos mostraron que los animales alimentados con una dieta basada en proteínas de soja presentaban un patrón diferente de expresión de genes involucrados en funciones antioxidantes, energéticas y en el metabolismo de lípidos, y tenían en plasma menores niveles de triglicéridos y colesterol.

Los componentes de la soja responsables de estos efectos no están totalmente identificados, algunos trabajos sugieren que son las proteínas las que provocan el descenso en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos encontrado en las poblaciones que consumen soja con cierta frecuencia. Así por ejemplo, Moriyama y col., (2004) demostraron que  $\beta$ -conglucina, una de las principales proteínas de reserva de soja, tendría efectos sobre la absorción y regulación del metabolismo de los triglicéridos. Lovati y col., (1992) mostraron también que la subunidad  $\alpha'$  de  $\beta$ -conglucina aumentaba la actividad del receptor de LDL de hepatocitos de rata en cultivo, en tanto que Duranti y col., (2004) encontraron que la misma subunidad activaba al receptor de las lipoproteínas de muy baja densidad  $\beta$  ( $\beta$ -VLDL) en la misma especie animal en condiciones de dieta hipercolesterolémica. Por su parte, Fukui y col., (2002) mostraron que el consumo de proteínas de soja libres de isoflavonas disminuía el nivel de colesterol en sangre de ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol.

Algunos investigadores han mostrado evidencias a favor de las isoflavonas como causantes de la disminución de la concentración plasmática de colesterol, por ejemplo Song y col., (2003) administrando por separado distintos compuestos presentes en el grano de soja observaron que Daidzeína provocaba, en hamsters, una disminución del

colesterol plasmático total, fundamentalmente de la fracción LDL. Estos investigadores no lograron esclarecer el mecanismo de acción de Daidzeína. Gudbrandsen y col., (2005) ensayaron en ratas dietas con proteínas animales e isoflavonas y concluyeron que las isoflavonas afectaban el metabolismo del colesterol – disminuyendo sus niveles plasmáticos - y que los mecanismos verificados eran entre otros el aumento de la expresión del gen del receptor hepático de LDL.

Las isoflavonas tienen también actividad antioxidante, al igual que otros componentes de bajo peso molecular presentes en el grano de soja. Se ha planteado que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad es uno de los prerequisites para que éstas sean reconocidas por los macrófagos de la pared arterial y desencadenar la formación de ateromas (Steinberg, 1997). La administración de Genisteína y Daidzeína a humanos incrementó la resistencia a la oxidación - ensayada *in vitro*- de sus LDL (Tikkanen y col., 1998). La prevención de la oxidación de las lipoproteínas y otras moléculas plasmáticas llevada a cabo por estos fitoquímicos contribuiría, entre otros mecanismos, a disminuir el estrés oxidativo (Vega-López y col., 2005).

Finalmente también se postula que las acciones antiaterogénicas ejercidas por la soja son debidas al sinergismo entre isoflavonas y proteínas de soja. El uso conjunto de isoflavonas y proteínas en ensayos *in vivo* producía una disminución en los niveles de LDL plasmático (Anthony y col., 1996; Kerckhoffs y col., 2002) y un efecto antioxidante (Liu y col., 2005) mayores que la administración individual de dichos compuestos. Por su parte Lichtenstein, (2000) sugiere que el efecto de las isoflavonas sobre el colesterol puede ser indirecto y que puede estar asociado a su administración con proteínas de soja. A su vez, en el trabajo de Wagner y col., (2003), en monos, se halló que el efecto sobre el nivel del colesterol de las isoflavonas dependía de la interacción con las proteínas de soja y no se evidenciaba con dietas que incluían las isoflavonas acompañadas por caseínas y lactoalbúminas.

Lo antedicho sugiere que las interacciones entre proteínas e isoflavonas de soja pueden ser determinantes de los efectos que muestren estos compuestos sobre los individuos que las consumen. El estudio de estas asociaciones puede aportar al conocimiento de estos mecanismos de acción.

### ***1.6.2.2. Efectos sobre la presión arterial***

La presión arterial – diastólica y sistólica - en sus valores normales permite la normal irrigación de todos los tejidos para satisfacer sus requerimientos metabólicos. La

presión arterial está determinada por el volumen sanguíneo, la elasticidad del sistema arterial, la frecuencia cardíaca, el volumen de eyección sistólico y la resistencia periférica. Esta última depende inversamente de la cuarta potencia del radio del vaso (ecuación de Poiseuille) el cual es función del nivel de contracción de las células musculares lisas que forman su pared.

Además de los efectos hipocolesterolémicos discutidos previamente que pueden mejorar el estado del sistema vascular, se han encontrado péptidos - originados por hidrólisis secuencial de proteínas de soja con pepsina y pancreatina - que poseen acción inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina I (Lo y Li-Chan, 2005). Por su parte, Gibbs y col., (2004) detectaron acciones inhibitorias de la enzima convertora de angiotensinógeno, antitrombóticas, tensioactivas y antioxidantes en péptidos originados por hidrólisis enzimática de natto y tempeh.

Se han descrito también efectos directos de las isoflavonas sobre la función contráctil de distintos lechos vasculares, observándose en la mayoría de los casos que en diferentes especies objeto de estudio, Genisteína favorece la relajación de distintos tipos de vasos sanguíneos (Walker y col., 2001; Nevala y col., 2002)

Estos datos permiten postular que la ingesta de alimentos derivados de soja podría inducir efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular mediante efectos reguladores de la presión arterial.

En un trabajo realizado en humanos, Jenkins y col., (2002) encontraron que el consumo de 10 o 73 mg de isoflavonas por día durante un mes acompañadas de 50 g de proteínas de soja provocaban una disminución de la presión sistólica en varones hipercolesterolémicos.

La presión arterial puede modularse a través de distintos factores: hormonas, neurotransmisores, enzimas, función endotelial y función contráctil del músculo liso vascular.

## **I.7. Músculo liso vascular.**

Las células de músculo liso se encuentran en la túnica media de arterias y venas, dispuestas en forma helicoidal. Estas células son fusiformes y se caracterizan por acortarse ya que cuentan en su estructura con proteínas contráctiles y regulatorias como actina, miosina, tropomiosina, calponina y caldesmona. Al contraerse regulan el diámetro de los vasos sanguíneos. El músculo liso de los vasos sanguíneos se denomina “unitario” porque funciona como un sincitio eléctrico debido a presencia de uniones de hendidura

(*gap junctions* en la lengua inglesa) (Fanchaouy y col., 2005). Éstas se encuentran constituidas por proteínas denominadas conexinas que forman uniones intercelulares de baja resistencia eléctrica que permiten el flujo de iones entre células y por lo tanto la transmisión de los estímulos de una a otra. Como consecuencia de este mecanismo las células de músculo liso vecinas muestran un acoplamiento eléctrico y contráctil.

Como factores centrales, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  rigen el nivel de contracción de las células de músculo liso. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es variable en el tiempo y en el espacio, de forma que en distintos compartimentos citoplasmáticos se encontrarán diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiendo del estado fisiológico de la célula.

La contracción del músculo liso puede desencadenarse por la acción de agonistas que mediante la unión a su receptor específico desencadena una cascada de eventos que produce un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y contracción. También se logra la contracción cuando el potencial de membrana se despolariza – asume valores menos negativos desde un potencial de reposo de aproximadamente  $-40$  mV en el músculo liso vascular – debido a la acción de diferentes tipos de estímulos que puedan modificar la actividad de canales iónicos presentes en la membrana. Así, la despolarización induce un aumento en la probabilidad de apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a los cambios de potencial, produciendo un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  que, elevando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lleva a la contracción celular.

Entre los factores que determinan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se encuentra la actividad de distintas proteínas presentes en la membrana plasmática, del retículo sarcoplásmico y de la mitocondria que permiten el pasaje de iones entre los distintos compartimentos. Entre ellas, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje presentes en la membrana plasmática, mencionados en el párrafo anterior, constituyen una de las vías más importantes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula contribuyendo así al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  necesario para el desarrollo de fuerza en el músculo liso vascular. En los últimos años se han caracterizado las propiedades moleculares y electrofisiológicas de otra familia de canales iónicos que pueden mediar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, los que se denominan canales catiónicos no selectivos ya que presentan permeabilidades variables (según el subtipo) al  $\text{Ca}^{2+}$  y a otros cationes monovalentes presentes en los medios intra y extracelular como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ . La activación de estos canales puede contribuir directa o indirectamente a un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la fuerza contráctil. Estos canales pertenecen a la familia de proteínas de tipo TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) (Inoue y col., 2001). Las propiedades moleculares y electrofisiológicas de esta familia de canales iónicos son amplias y es

necesario establecer en cada tipo celular el subtipo, la permeabilidad iónica y sus mecanismos de regulación. Estos canales iónicos se activarían por distintos estímulos como el vaciamiento de los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares o segundos mensajeros de las cascadas desencadenadas por agonistas (Barrit, 1999; Parekh y Penner, 1997).

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  presente en el plasmalema de muchos tipos de células de músculo liso vascular es capaz de generar un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula mientras elimina  $\text{Na}^+$  del citoplasma o actuar en el sentido opuesto, dependiendo de las condiciones de potencial de membrana y gradientes químicos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . De esta manera, este intercambiador podría estar involucrado en mecanismos de contracción así como de vasorrelajación según el estado en que se encuentre la célula.

Por otro lado, cuando aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se activa en la membrana plasmática una  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa que extruye  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular en contra de gradiente y utilizando la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) como fuente de energía para este movimiento. Este mecanismo contribuye a restablecer la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de reposo relajando el músculo liso.

El retículo sarcoplásmico es un organoide que puede alcanzar en su lumen grandes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la presencia de proteínas como calsecuestrina, calreticulina y calnexina, que presentan afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  iónico. (Tjoelker y col., 1994; Michalak y col., 1999). El  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser liberado del retículo hacia el citosol a través de dos tipos de canales, uno sensible al inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), denominado “receptor de  $\text{IP}_3$ ” y otro que aumenta su probabilidad de apertura cuando se une a  $\text{Ca}^{2+}$ , conocido como “receptor de Rianodina”, ya que esta sustancia exógena puede activarlo. De esta manera agonistas que mediante la activación de fosfolipasas de membrana aumenten los niveles de  $\text{IP}_3$  pueden aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y producir contracción del músculo liso, así como el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  puede producir la activación de los receptores de rianodina a través del mecanismo conocido como “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ” contribuyendo también a los fenómenos contráctiles.

La estructura responsable de ingresar el  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo es una bomba que se denomina  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico y endoplásmico y se conoce también por una sigla proveniente del idioma inglés “SERCA”.

Otra estructura importante en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es la mitocondria, que cuenta en su membrana externa con un canal iónico denominado “canal aniónico dependiente del voltaje” (Mannella, 1997). Este canal es permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  y a otras sustancias (Gincel y col., 2004) y está involucrado en la formación de un poro

inespecífico que al formarse destruye los gradientes de la mitocondria y termina desencadenando la muerte celular (*permeability transition pore*, en el idioma inglés). En la membrana interna se encuentra el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  (sobre el que aún se discute si es un canal o un transportador) pero que es muy selectivo para el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Kirichok y col., 2004) y es responsable de la captura de una fracción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático por parte de la mitocondria. En las membranas mitocondriales también se encuentra un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que funcionaría removiendo  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria hacia el citoplasma.

En la membrana plasmática de las células de músculo liso también se encuentran canales de  $\text{K}^+$  que contribuyen al establecimiento del potencial de membrana y consecuentemente a la regulación del estado contráctil de estas células. Los canales selectivos al  $\text{K}^+$  del músculo liso arterial se pueden separar en cuatro clases: dependientes del voltaje (que se activan por la despolarización de la membrana), activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (su permeabilidad aumenta con el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y con la despolarización), sensibles al ATP (responden a cambios en el metabolismo celular, se inhiben cuando aumenta la concentración citoplasmática de ATP) y rectificadores anómalos (activados por hiperpolarización y sensibles a pequeñas variaciones en la concentración extracelular de  $\text{K}^+$ ) (Nelson y Quayle, 1995).

El aumento del eflujo de  $\text{K}^+$  a través de sus canales produce una hiperpolarización de la membrana celular que disminuye el nivel de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje por lo cual se reduce la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Canales como el de alta conductancia (conocido como  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) se activan por aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y por despolarización, generando un flujo de iones  $\text{K}^+$  que produce hiperpolarización y lleva a la relajación celular (Otsuka y col., 2002).

Las células de músculo liso vascular también expresan en su membrana canales permeables al  $\text{Cl}^-$  los cuales pueden contribuir a la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y por lo tanto al estado contráctil de la célula de músculo liso. Se han descrito dos tipos importantes de canales de  $\text{Cl}^-$ , los activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , que incrementan su actividad por aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y los regulados por volumen, cuya permeabilidad aumenta frente a soluciones hipotónicas y también son activados por deformaciones mecánicas de la membrana celular (Kitamura y Yamazaki, 2001). En general en el músculo liso se ha descrito un potencial de inversión para el  $\text{Cl}^-$  de aproximadamente -30 mV por lo cual un aumento en la probabilidad de apertura lleva a la despolarización celular, produciendo aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y contracción.

La figura I.3 resume en forma esquemática la localización de las estructuras de membranas descritas anteriormente y sus posibles interacciones.

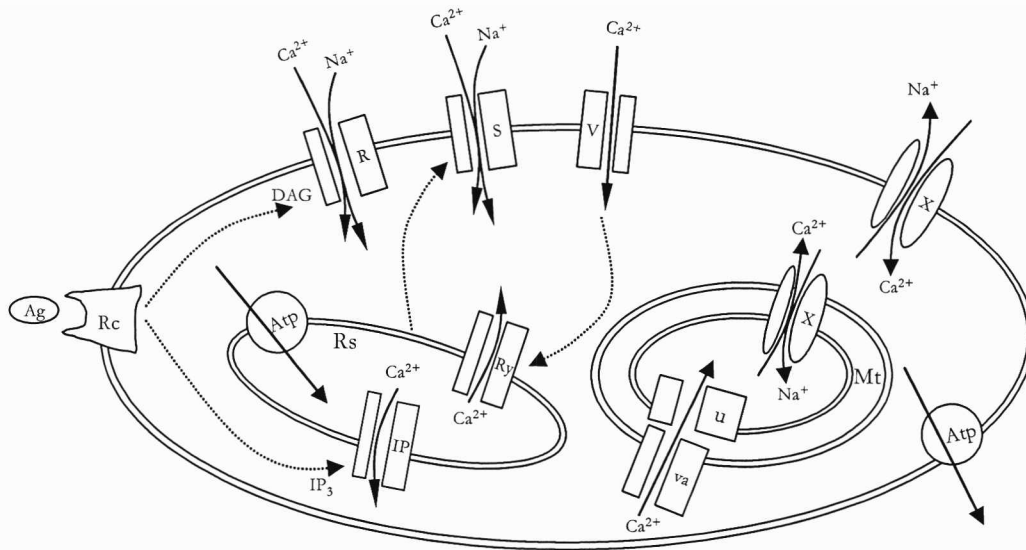


Figura I.3. Estructuras involucradas en los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en células musculares lisas. Ag: agonista, Rc: receptor, DAG: diacilglicerol,  $\text{IP}_3$ : inositol-1,4,5-trifosfato, IP: receptor de  $\text{IP}_3$ , Ry: receptor de rianodina, Atp:  $\text{Ca}^{2+}$ -atpeasa, R: canal catiónico no selectivo activado por ligando, S: canal catiónico no selectivo activado por depleción de reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , V: canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por voltaje, X: intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , Mt: mitocondria, Va: canal aniónico dependiente del voltaje, U: uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### I.8. Efectos biológicos de las isoflavonas de soja sobre el músculo liso vascular

Genisteína, la más abundante isoflavona de soja, es una sustancia que posee propiedades inhibitorias sobre las enzimas quinasas que producen fosforilación en residuos de tirosina (tirosina-quinasas) (Akiyama y col., 1987) ya que se une al sitio activo destinado al ATP y compite con él (Akiyama y Ogawara, 1991). Por lo tanto, los mecanismos de regulación de la contracción vascular que involucran activación de dichas quinasas, como la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de las proteínas contráctiles del músculo liso (Steusloff y col., 1995), la respuesta a agonistas por parte de estas células (Piiper y Zeuzem, 2004), y la actividad de ciertos canales iónicos presentes en su membrana plasmática podrían modificarse en presencia de Genisteína. De esta forma Genisteína afectando el grado de contracción de estas células contribuiría a la determinación del diámetro luminal de los vasos. Se ha descrito que Genisteína modifica la actividad de algunos tipos de canales iónicos regulados por tirosina-quinasas. (Liu y Sperelakis, 1997).

Las isoflavonas también presentan efectos biológicos independientes de la inhibición de las tirosina-quinasas, pertenecen al grupo de los moduladores selectivos de



los receptores de estrógenos (Setchell, 2001), porque son compuestos difenólicos que pueden comportarse como agonistas o antagonistas de estos receptores dependiendo de la concentración, del tejido y de la condición fisiológica de las células donde actúen (Kris-Etherton y col., 2002).

El canal de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$  posee una subunidad  $\beta$  regulatoria a la que se puede unir el  $\beta$ -estradiol o el tamoxifeno activándolo (Valverde y col., 1999; Dick y col., 2001). Este canal podría ser blanco de la acción de las isoflavonas debido a sus similitudes estructurales con los estrógenos. Nevala y col., (2001) encontraron que Genisteína y Daidzeína provocaban relajaciones de anillos arteriales de arteria mesentérica superior de rata. Este efecto era disminuído si se aplicaba en forma conjunta a las isoflavonas bloqueadores específicos de canales de  $K^+$  indicando que las isoflavonas en esta arteria tendrían un efecto activador de estos canales.

Por otra parte se han descrito efectos de las isoflavonas sobre el uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial en células HeLa (Montero y col., 2004) cuyos mecanismos de acción no son mediados por los receptores de estrógenos ni por la inhibición de las tirosina-quinazas. La actividad de este uniportador es aumentada por isoflavonas como Genisteína, Genistina y Daidzeína por mecanismos independientes del ATP y de la inhibición de tirosina-quinazas (Montero y col., 2004).

Por último, también se han informado efectos de las isoflavonas sobre las propiedades estructurales de la pared de los vasos así como sobre sus mecanismos de contracción y relajación, que se traducen en una disminución de la tensión arterial. Nestel y col., (1997) observaron que las isoflavonas producen mejoras en la elasticidad arterial (*compliance*, en la lengua inglesa) de mujeres menopaúsicas. Honoré y col., (1997) encontraron en mono rhesus que Genisteína aumentaba la vasorrelajación producida por acetilcolina en la arteria coronaria circunfleja por un mecanismo que sería similar al de los estrógenos. Squadrito y col., (2002) informaron que en mujeres posmenopáusicas la administración crónica de Genisteína producía aumento de la producción de óxido nítrico y el flujo como respuesta a la reperusión de la arteria humeral, sugiriendo un efecto sobre el endotelio.

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos que regulan la contractilidad del músculo liso vascular contribuye a la comprensión de aquellos que se encuentran alterados en ciertas patologías que afectan al sistema cardiovascular, como por ejemplo la hipertensión arterial. Valores sostenidos de presión diastólica mayores a 90 mmHg y de presión sistólica mayores a 140 mmHg constituyen hipertensión arterial (Cotran y col.,

2000). La hipertensión arterial es un factor de riesgo importante para la aterosclerosis, la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares. La hipertensión afecta al funcionamiento y a la estructura de las arterias musculares y arteriolas. En el 90 – 95 % de los casos es idiopática y se conoce como “hipertensión esencial”. Se sostienen dos mecanismos primarios para esta afección: retención excesiva de sodio por el riñón (con un consecuente aumento del volumen sanguíneo) y vasoconstricción e hipertrofia vascular (incremento de la resistencia periférica) (Cotran y col., 2000).

# Objetivos

## II. OBJETIVOS

Día a día el hombre es más consciente de la incidencia de la dieta en la preservación de su salud, de ahí la necesidad de un mayor conocimiento de los efectos biológicos de los componentes alimentarios y de disponer de productos e ingredientes con propiedades funcionales y acción biológica.

Como ya se mencionara, la soja es una fuente muy importante de sustancias nutraceuticas pero aun no se han estudiado la mayoría de los efectos biológicos que podrían ejercer sus componentes; en particular el de las isoflavonas las cuales aparentemente ejercen su acción a través de múltiples mecanismos.

Por otra parte, existe información muy limitada referente a las modificaciones que pueden sufrir las isoflavonas tanto en lo que se refiere a su contenido como a la distribución de las distintas formas moleculares en los ingredientes y alimentos derivados de soja, así como referente a sus propiedades químicas y biológicas, en particular, aquellos efectos que las isoflavonas podrían producir sobre el músculo liso vascular.

En este marco nos proponemos para el presente trabajo los siguientes objetivos:

### Objetivos generales

- 1- Analizar la interacción entre proteínas de soja e isoflavonas de la serie Genisteína y su distribución durante el proceso de preparación de aislados proteicos.
- 2- Evaluar los efectos biológicos de Genisteína y Daidzeína sobre el músculo liso como efector importante en los mecanismos de regulación de la presión arterial.

### Objetivos específicos

- 1.1. Desarrollar métodos de extracción y cuantificación de isoflavonas.
- 1.2. Estudiar el efecto de las variables de proceso de obtención de aislados proteicos de soja sobre el contenido y composición de isoflavonas conjugadas y libre de la serie Genisteína.
- 1.3. Estudiar los factores que afectan las interacciones entre las globulinas de reserva de soja y las isoflavonas de la serie Genisteína.
- 1.4. Desarrollar un procedimiento de preparación de aislados ricos en Genisteína biodisponible.
- 2.1. Estudiar el efecto de Genisteína y Daidzeína sobre la fuerza isométrica desarrollada por anillos vasculares de aorta de rata y de arteria umbilical humana.

2.2. Analizar el efecto de Genisteína y Daidzeína sobre la actividad de canales iónicos de células de músculo liso vascular humano.

2.3. Estudiar el efecto de Genisteína y Daidzeína sobre la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  en células de músculo liso vascular in situ.

# Materialles y Métodos

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. PROTEÍNAS DE SOJA E ISOFLAVONAS

##### III.1.1. Materia prima

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron tres partidas (2001, 2002 y 2004) de harina desgrasada de soja provista por la firma Solae S.A. de Brasil. Esta harina no sufrió un tratamiento térmico drástico durante su elaboración, en particular en la etapa de desolventizado, lo que permite la existencia de las proteínas en estado nativo. El contenido de proteínas promedio determinado por el método de Kjeldhal fue de  $45,35 \pm 0,13$  % en base húmeda (factor de conversión N - proteínas = 5,8), el índice de dispersibilidad de proteínas del  $83,82 \pm 0,14$  % (determinado por el método especificado por AOCS, 1996) y el contenido de humedad del  $8,53 \pm 0,61$  %.

##### III.1.2. Preparación de aislados proteicos de soja

Los aislados proteicos se obtuvieron por solubilización alcalina de las proteínas y posterior precipitación isoelectrica. Se emplearon distintas modificaciones del procedimiento básico detallado a continuación:

###### III.1.2.1. Procedimiento básico:

Con el fin de extraer las proteínas, se dispersó harina en agua en una proporción 1:10 (p/v), el pH se ajustó a 8,0 con NaOH 2 M y se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente con control periódico del pH. Luego de este tiempo se obtuvo un residuo alcalino insoluble, RI, que se separó por centrifugación a 10.000 xg durante 30 minutos a 4 °C, a este residuo se le agregó agua y se ajustó el pH a 7,4 por agregado de HCl 2 M. El sobrenadante obtenido en el paso anterior se acidificó hasta pH 4,5 con HCl 2 M y se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos obteniéndose un precipitado que fue separado por centrifugación a 3.750 xg durante 15 minutos a 4 °C, APS, el mismo se lavó con agua destilada y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Los sobrenadantes de las dos últimas centrifugaciones se juntaron y formaron el suero, S, cuyo pH se ajustó a 7,4 por agregado de NaOH 2 M. El precipitado APS, se resuspendió a pH 7,4 por agregado de NaOH 2 M. Los tres productos se congelaron y liofilizaron (liofilizador Heto FD4 conectado a una bomba de vacío

Vacuubrand RZ 5). En la figura III.1 se muestra un esquema del procedimiento descrito.

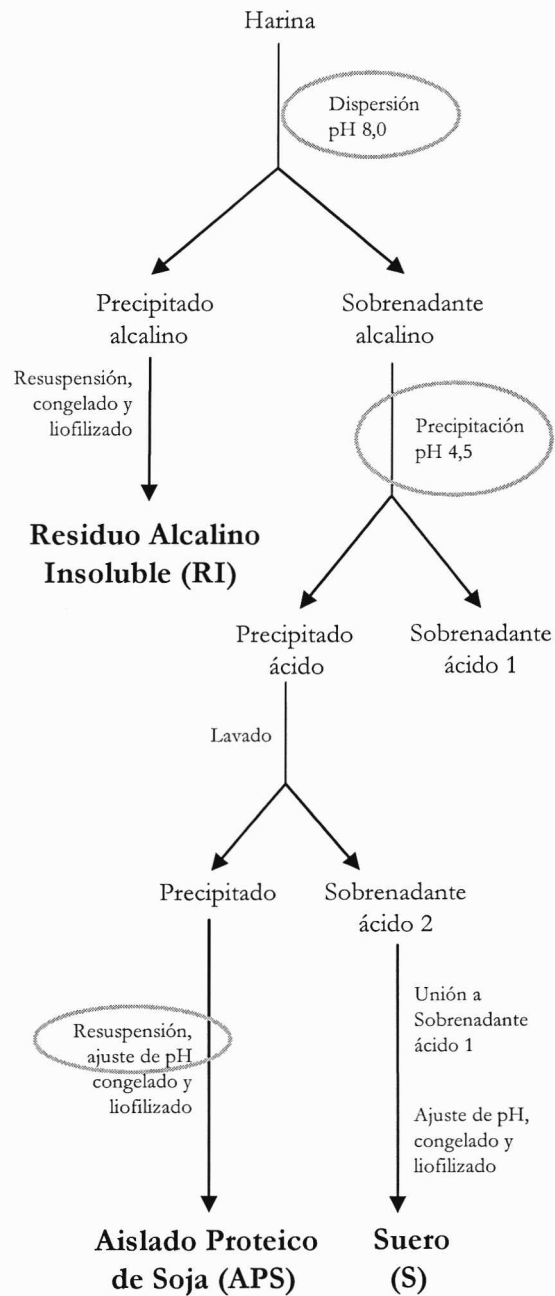


Figura III.1. Procedimiento básico utilizado para la preparación de aislados proteicos de soja. Se resaltaron las etapas que fueron modificadas en este trabajo.



### III.1.2.2. *Modificaciones del procedimiento básico:*

A partir de la técnica descrita en el punto anterior se realizaron modificaciones en distintas etapas del proceso (figura III.1):

- Modificación en el **pH de extracción proteica a temperatura ambiente**, se ensayaron los pHs 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 y 11,0.
- Modificación en el **pH de extracción proteica a 50 °C**, se ensayaron los pHs 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 y 11,0.
- Modificación en el **pH de precipitación proteica**, se ensayaron los pHs 3,0, 3,5, 3,75; 4,0; 4,5; 5,0; 5,6 y 6,0.
- Modificación en el **pH de extracción y de precipitación proteica**, se prepararon los aislados proteicos combinando dos pHs de extracción (8,0 y 11,0) con dos pHs de precipitación (3,5 y 4,5), de la siguiente forma:  
extracción a pH 8,0, precipitación a pH 3,5  
extracción a pH 8,0, precipitación a pH 4,5  
extracción a pH 11,0, precipitación a pH 3,5  
extracción a pH 11,0, precipitación a pH 4,5.
- Modificación en el **tiempo y el pH de precipitación proteica**, la precipitación a pHs 3,5 y 5,6 se llevó a cabo durante 15 minutos, 210 minutos o 23 horas.
- Modificación en la **temperatura y el pH de precipitación proteica**, se ensayó una temperatura de 4 °C, durante 18 horas para pH 3,5; 4,5 y 5,6.
- Modificación en la **temperatura y el pH de precipitación proteica** con macerado **previo de harina a pH 6,5** durante 8 horas. Se preparó una dispersión de harina en agua que se mantuvo en agitación durante 8 horas a pH 6,5, posteriormente el pH se aumentó a 8,0 por agregado de NaOH 2 M por 90 minutos, luego se centrifugó en las condiciones habituales para separar el residuo insoluble. El pH del sobrenadante se ajustó a 3,5; 4,5 y 5,6 con HCl 2 M y se procedió a realizar la precipitación proteica durante 18 horas a 4 °C.
- Modificación en el **pH de resuspensión** del aislado proteico, el precipitado isoelectrico se resuspendió a distintos pHs: 1,9; 2,5; 3,0; 3,25; 3,5; 4,0; 5,6; 7,4 y 8,4.
- Modificación en el **tiempo y el pH de extracción proteica**, el pH de la dispersión de harina en agua se ajustó a 11,0 con NaOH 2 M durante una hora, posteriormente se acidificó con HCl 2 M hasta pH 6,5 y se agregó una cantidad de harina equivalente al 20 % de la masa inicial, luego se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado este tiempo el pH se ajustó a 8,0 y se separó el sobrenadante alcalino del residuo insoluble por centrifugación en las condiciones indicadas previamente.

En la tabla III.1 se detallan las condiciones de ensayo resaltando las modificaciones efectuadas al procedimiento básico.

En los casos en que la preparación de aislados requería de tiempos prolongados

Tabla III.1 Detalle del procedimiento básico y sus modificaciones (en negrita).

Variante	Etapas del procedimiento							
	Macerado previo	Extracción			Precipitación proteica			Resuspensión
		pH	T (°C)	Tiempo (h)	pH	T (°C)	Tiempo (h)	
Básico		8,0	TA	1,5	4,5	TA	0,25	7,4
Modificación en el pH de extracción proteica (TA)		<b>7,0</b> <b>9,0</b> <b>10,0</b> <b>11,0</b>	TA	1,5	4,5	TA	0,25	7,4
Modificación en el pH de extracción proteica (50°C)		<b>7,0</b> <b>8,0</b> <b>9,0</b> <b>10,0</b> <b>11,0</b>	<b>50</b> <b>50</b> <b>50</b> <b>50</b> <b>50</b>	1,5	4,5	TA	0,25	7,4
Modificación en el pH de precipitación proteica		8,0	TA	1,5	<b>3,0</b> <b>3,5</b> <b>3,75</b> <b>4,0</b> <b>4,5</b> <b>5,0</b> <b>5,6</b> <b>6,0</b>	TA	0,25	7,4
Modificación en el pH de extracción y precipitación proteica		<b>8,0</b> <b>8,0</b> <b>11,0</b> <b>11,0</b>	TA	1,5	<b>3,5</b> <b>4,5</b> <b>3,5</b> <b>4,5</b>	TA	0,25	7,4
Modificación en el tiempo de precipitación proteica		8,0	TA	1,5	<b>3,5</b> <b>3,5</b> <b>3,5</b> <b>5,6</b> <b>5,6</b> <b>5,6</b>	TA	<b>0,25</b> <b>3,50</b> <b>23,0</b> <b>0,25</b> <b>3,50</b> <b>23,0</b>	7,4
Modificación en el pH y la temperatura precipitación proteica		8,0	TA	1,5	<b>3,5</b> <b>4,5</b> <b>5,6</b>	<b>4</b> <b>4</b> <b>4</b>	<b>18</b> <b>18</b> <b>18</b>	7,4
Modificación en la temperatura precipitación proteica con macerado previo	<b>pH 6,5</b> <b>pH 6,5</b> <b>pH 6,5</b>	8,0	TA	1,5	<b>3,5</b> <b>4,5</b> <b>5,6</b>	<b>4</b> <b>4</b> <b>4</b>	<b>18</b> <b>18</b> <b>18</b>	7,4
Modificación en el pH y el tiempo de extracción proteica	<b>pH 11,0 - 6,5</b>	<b>8,0</b>	TA	<b>12</b>	4,5	TA	0,25	7,4
Modificación en el pH de resuspensión		8,0	TA	1,5	4,5	4	0,25	<b>1,9</b> <b>2,5</b> <b>3,0</b> <b>3,25</b> <b>3,5</b> <b>4,0</b> <b>5,6</b> <b>8,4</b>

se adicionó a las dispersiones azida de sodio al 0,02 % p/v para evitar la proliferación de microorganismos.

El rendimiento de los productos obtenidos APS, S o RI, fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento}_i = g_i / g \text{ harina inicial} \times 100$$

donde  $i = \text{APS, S o RI}$

### III.1.2.3. Preparación de las globulinas de soja $\beta$ -conglucina y glicinina parcialmente purificadas

La purificación de las principales globulinas de almacenamiento de soja fue realizada de acuerdo al método de Nagano y col., (1992), esquematizado en la figura III.2. Las proteínas se extrajeron a partir de una dispersión de harina en agua en relación 1:15 (p/v), ajustando el pH a 7,5 por agregado de NaOH 2 M y agitando durante 60 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se separó la dispersión de proteínas del residuo insoluble por centrifugación a 10.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. El residuo, P<sub>1</sub>, se descartó y se agregó al sobrenadante, S<sub>1</sub>, bisulfito de sodio hasta alcanzar una concentración de 0,98 g/l, seguidamente se ajustó el pH hasta 6,4 por agregado de HCl 2 M. Esta dispersión se agitó durante 12 horas a 4 °C para precipitar glicinina. Pasado este tiempo se separó la proteína insoluble por centrifugación a 6.500 xg durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido, P<sub>2</sub>, se dispersó en agua y alcalinizó con NaOH 2 M hasta pH 7,8. Esta dispersión fue dializada contra agua en una membrana de celulosa que retiene moléculas de más de 12 kDa durante 10 horas a 4 °C, posteriormente, se congeló y liofilizó obteniéndose glicinina. Al sobrenadante S<sub>2</sub> se agregó NaCl hasta alcanzar una concentración 0,25 M, se ajustó el pH a 5,0 con HCl 2 M y se mantuvo en agitación para lograr la precipitación de una mezcla de glicinina y  $\beta$ -conglucina. El precipitado obtenido, P<sub>3</sub>, se separó del sobrenadante, S<sub>3</sub>, centrifugando a 9.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante S<sub>3</sub> se diluyó a la mitad con agua y se acidificó hasta 4,8 por agregado de HCl 2 M a fin de precipitar  $\beta$ -conglucina. Luego de 60 minutos se centrifugó a 6.500 xg durante 20 minutos a 4 °C, el precipitado así obtenido, P<sub>4</sub>, se lavó con agua y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente  $\beta$ -conglucina se resuspendió a pH 7,8 con NaOH 2 M y se dializó en las condiciones especificadas para glicinina.

Luego de la diálisis las globulinas se congelaron y liofilizaron.

En el transcurso del trabajo se realizaron dos modificaciones a esta técnica:

- en la primera se aseguró que las dos subunidades a purificar se encontraran durante todo el proceso enfrentadas al mismo volumen de solución acuosa y por el mismo tiempo.

- en la segunda modificación se realizó la precipitación inicial (en la que se obtiene

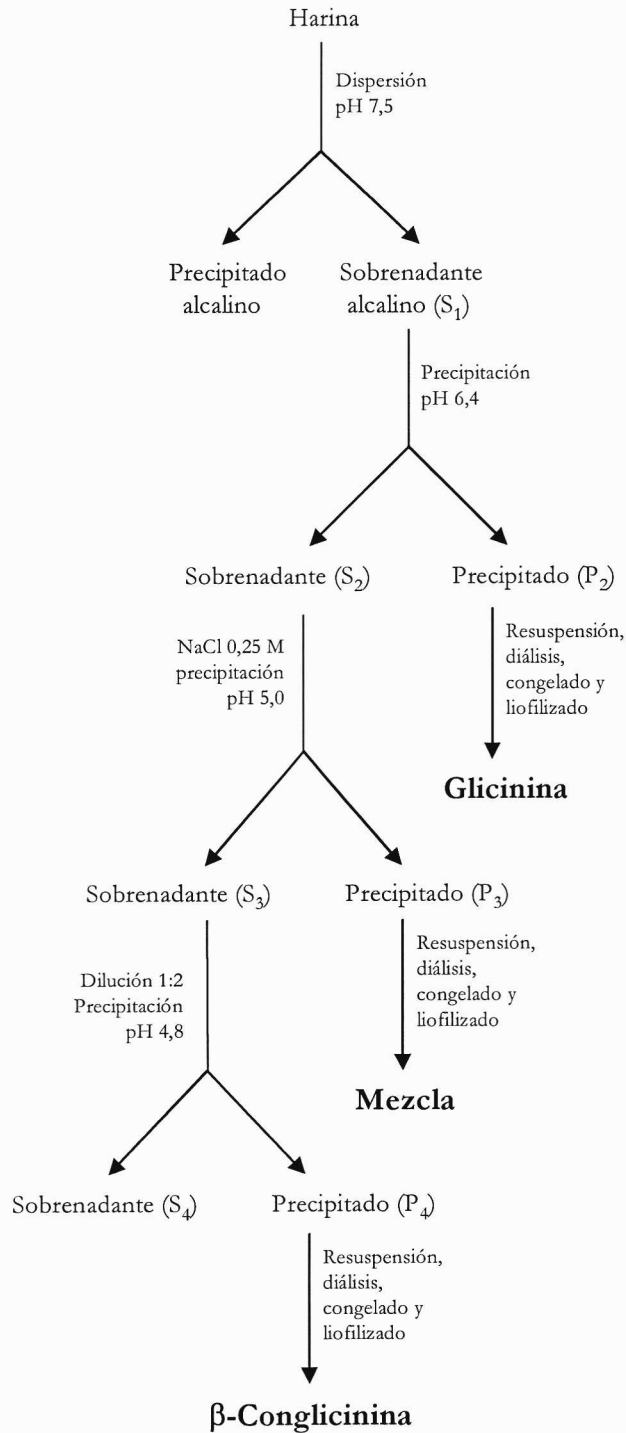


Figura III.2. Procedimiento utilizado para la purificación de las globulinas de reserva de soja glicinina y β-conglicinina.

glicinina) a temperatura ambiente, en lugar de a 4 °C y se conservó para su análisis el precipitado P<sub>3</sub>, ajustando su pH a 8,0, dializándolo, congelándolo y liofilizando de la misma forma que las fracciones glicinina y β-conglicinina, denominándolo “mezcla”.

### **III.1.3. Extracción y determinación del contenido de isoflavonas en harina y productos derivados de soja.**

#### **III.1.3.1. Extracción y cuantificación**

El análisis de las isoflavonas presentes en harina y productos derivados de soja fue llevado a cabo de acuerdo a una modificación de la técnica descrita por Barnes y col., (1994). Se utilizó un sistema de HPLC en fase reversa con gradiente no lineal generado con dos solventes (ácido acético al 0,1 % en agua y ácido acético al 0,1 % en acetonitrilo:agua 50:50). Luego de inyectar 20 – 30 µL de muestra, se aumentó el porcentaje del segundo solvente orgánico desde 0 a 75 % en 40 minutos. El flujo del solvente fue de 1,5 mL por minuto. El sistema de HPLC incluyó una bomba y un sistema de distribución de solventes (Waters 600 E Multisolvent Delivery System) con un sistema de inyección automático (Waters 717 plus Autosampler). La detección de los analitos se llevó a cabo con un detector de arreglo de diodos (Waters 996 Photodiode Array Detector) leyendo la absorbancia del efluente a 262 nm. La columna utilizada fue una Sephasil Peptide C8 12µ ST4.6/250.

Los patrones de las isoflavonas fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU) o Nakalai Tesque (Kyoto, Japón). Con ellos se prepararon soluciones disolviéndolos en etanol:agua 80:20. Se inyectaron en el equipo de HPLC distintos volúmenes y se determinaron las correspondientes curvas de calibración.

Para la extracción de las isoflavonas de las distintas muestras a analizar se partió de 45 - 55 mg de producto liofilizado al que se le agregó 1 ml de un solvente formado por 60 % (v/v) de etanol absoluto y 40 % (v/v) de agua bidestilada. Esta dispersión se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas, luego se centrifugó a 14.000 xg durante 20 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante. Este sobrenadante se centrifugó nuevamente en las condiciones antes descritas y finalmente se inyectaron 20 – 30 µl del segundo sobrenadante en el HPLC.

En algunos casos los valores de concentración de Genisteína y sus formas conjugadas se expresaron en forma individual, mientras que en otros se expresó el valor

de Genisteína (o Daidzeína) total. Este último valor está representado por la suma de las cantidades de las distintas formas determinadas expresadas en  $\mu\text{g}$ , ponderadas con factores (PM Genisteína o Daidzeína/PM de cada forma) que rinden el equivalente de su masa en masa de Genisteína (o Daidzeína) aglucona:

$$\text{Genisteína total} = \text{Genisteína} + \text{Genistina} \times 270/432 + \text{Malonil-genistina} \times 270/518 + \text{Acetil genistina} \times 270/474$$
$$\text{Daidzeína total} = \text{Daidzeína} + \text{Daidzina} \times 254/416 + \text{Malonil-daidzina} \times 254/502$$

La concentración de las mismas fue expresada como  $\mu\text{g}$  de Genisteína o Daidzeína (total o individual) por g de producto o  $\mu\text{g}$  de Genisteína o Daidzeína (total o individual) por g de harina inicial, considerando el valor del rendimiento de cada producto.

### **III.1.3.2. Modificaciones en las condiciones de extracción de isoflavonas de productos derivados de soja.**

-En el presente trabajo se obtuvieron aislados modificando el pH en varias etapas de su preparación. Esto hizo que el contenido final de NaCl - formado por la neutralización del HCl y el NaOH agregados - fuera diferente en algunos aislados. Para estudiar el efecto de la concentración de esta sal en la extracción de las isoflavonas, se realizaron extracciones a partir de un aislado proteico de soja previamente dializado y de harina de soja, utilizando como solventes mezclas de etanol:agua 60:40 o etanol:solución acuosa de NaCl 60:40. Las concentraciones de NaCl ensayadas fueron: 0,125; 0,250 o 0,500 M.

- Modificación en la composición del solvente y en el tiempo de exposición. Se utilizaron mezclas de etanol:agua de tres proporciones (40:60; 60:40 y 80:20). En estos casos también se ensayaron dos tiempos de exposición: 30 minutos y 12 horas. Se utilizaron como muestras un APS, un S y dos productos de composición proteica intermedia obtenidos en el ensayo que se describe en la página 27. Luego de estos plazos las dispersiones se centrifugaron en las condiciones descriptas previamente y se inyectaron las soluciones en el aparato de HPLC.

- Modificación en el pH durante la extracción de isoflavonas. Se utilizaron los APS obtenidos resuspendiendo las proteínas a pHs 1,9; 2,5; 3,0; 3,25; 3,5; 4,0; 5,6; 7,4 y 8,4, (página 21). Las isoflavonas se extrajeron con el solvente de 60 % de etanol, durante 12 horas y se procedió de la misma forma descripta en los párrafos anteriores para medir la concentración de isoflavonas en estas soluciones.

#### **III.1.4. Determinación de actividad beta-glucosidasa en harina de soja**

Se preparó una dispersión de harina en agua a pH 6,5 en una relación sólido:líquido de 1:10. Una alícuota de esta dispersión se trató a 90 °C durante 15 minutos para inactivar cualquier enzima presente (control sin actividad enzimática). El resto de la dispersión no fue sometida a ningún tratamiento térmico (muestra con posible actividad enzimática). Ambas fracciones, tratada y no tratada térmicamente se mantuvieron durante 12 horas a temperatura ambiente. Luego, a fin de extraer las isoflavonas se agregó etanol hasta alcanzar una relación de etanol:agua 60:40 y se homogeneizó durante 2 horas con agitación. Posteriormente se centrifugó a 14.000 xg durante 20 minutos a 4 °C. A fin de asegurar homegeneidad, el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se analizó por HPLC tal como se indicó en la página 25.

#### **III.1.5. Macerado de harina de soja en agua a distintos pHs**

Se prepararon dispersiones de harina en una relación de masa a volumen de 1 a 10. El pH de estas suspensiones se ajustó con HCl 2 M o con NaOH 2 M a 1,5; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 u 11,0 respectivamente y se mantuvieron con agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente. A porciones de estas dispersiones se les agregó etanol absoluto hasta alcanzar una proporción de etanol:agua 60:40. Las dispersiones se centrifugaron a 14.000 xg durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se separó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para inyectar en el equipo de HPLC una alícuota del segundo sobrenadante obtenido.

#### **III.1.6. Ensayo de precipitación y solubilización de proteínas**

Se preparó una dispersión de harina en agua, relación sólido:líquido de 1:10, cuyo pH se ajustó a 8,0, se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos y luego se centrifugó a 10.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Después de descartar el residuo

insoluble generado en la extracción de proteínas, el sobrenadante se acidificó a pH 3,5 con el fin de precipitar las proteínas de reserva e inducir así la posible asociación con las isoflavonas. Pasados 20 minutos el pH se aumentó a 5,6; 6,0 o 6,3 por otros 20 minutos con el objeto de solubilizar parte de las proteínas precipitadas, concluido este tiempo se centrifugó a 9.000 xg durante 15 minutos a 4 °C para separar el sólido, AP, del soluble, AS. Los pHs del AP y del AS se ajustaron a 7,4 por adición de NaOH 2 M; posteriormente estos productos se congelaron y liofilizaron. El contenido de isoflavonas y de proteínas fue determinado por HPLC - como se indicó previamente - y por el método de Kjeldahl respectivamente.

### **III.1.7. Evaluación de la liberación de isoflavonas de $\beta$ -conglucina y glicina**

Para verificar la existencia de una asociación reversible en la interacción entre las globulinas de almacenamiento y Genisteína se realizaron experimentos en los que se prepararon dispersiones de  $\beta$ -conglucina y glicina en una concentración de 6,25 mg/ml, (pHs 3,5; 4,5 y 8,0). Las mismas se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se ultrafiltraron en un equipo AMICON 8010 (Beverly, EEUU) utilizando una membrana filtro de 3.000 Da. La filtración se aceleró con presión de  $N_2$  a 40 psi y el filtrado se inyectó en el equipo HPLC para determinar la concentración de las isoflavonas presentes en la fase acuosa permeada.

### **III.1.8. Determinación del contenido proteico de los distintos productos analizados**

El contenido de proteínas de harina, APS, S, AP, AS fue determinado por el método de Kjeldahl. Las muestras fueron digeridas en caliente (digestor Buchi 425) en  $H_2SO_4$  concentrado con agregado de  $Na_2SO_4$  y  $Cu_2SO_4$  en una relación de masas de 10 a 1. La solución obtenida en la digestión fue alcalinizada con solución acuosa de NaOH al 30 % y luego fue destilada. El  $NH_3$  liberado fue recogido en un volumen conocido de HCl de concentración 0,1 N en una unidad de destilación Buchi 320. El exceso de ácido no neutralizado por el  $NH_3$  fue titulado con NaOH 0,1 N, valorado previamente con Biftalato de Sodio. El valor de proteínas totales fue calculado multiplicando el contenido de N por el factor 5,8.



### III.1.9. Análisis de la composición polipeptídica de aislados proteicos

Esta técnica se utilizó para analizar la composición polipeptídica de aislados y fracciones proteicas. Se realizaron electroforesis disociantes, utilizando geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (*SDS PAGE*) y el sistema de buffers de Laemmli, (1970). Los aislados o fracciones proteicas se disolvieron en buffer de muestra, compuesto por un 50 % de glicerol, 0,2 % de dodecil sulfato de sodio, Tris-base 0,25 M, azul de bromofenol, cuyo pH se ajustó a 6,8 (Laemmli, 1970) y se centrifugaron a 14.000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente, los sobrenadantes obtenidos se sembraron a razón de 30 – 40 µg de proteína por calle. Las electroforesis se llevaron a cabo en miniplacas con el equipo BioRad, modelo Mini Protean II a voltaje constante (200 V) por un período aproximado de una hora. Se utilizaron geles con gradiente de concentración 5 - 15 % (p/v) de la solución de acrilamida-bisacrilamida. Para la determinación de las masas moleculares de los polipéptidos se utilizaron patrones de peso molecular de la marca Pharmacia: fosforilasa b (94.000 Da); seroalbúmina bovina (67.000 Da); ovoalbúmina (43.000 Da); anhidrasa carbónica (30.000 Da); inhibidor de tripsina (20.100 Da) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.400 Da), que fueron solubilizados en el buffer de muestra. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192 % p/v en agua:metanol:ácido acético (10:10:4) durante 12 horas y desteñidos con una solución de etanol 25 % p/v y ácido acético 10 % p/v en agua a temperatura ambiente. Las imágenes de las electroforesis fueron adquiridas mediante un equipo BIO-RAD (Gel Doc 1000)

### III.1.10 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que permite conocer las temperaturas a las que ocurren procesos químicos o físicos y el calor o entalpía puesto en juego en estos procesos. Mide la diferencia entre la energía que se debe suministrar a una muestra y la que se entrega a una referencia cuando se somete a ambas al mismo programa de temperatura. Para llevar a cabo los análisis calorimétricos se utilizó un DSC Polymer Laboratories (Rheometric Scientific) controlado por el programa PL-V5.41. Este calorímetro posee una celda con un disco de constantán (aleación cobre y níquel) que permite alojar a las cápsulas que contienen la muestra y la referencia y es uno de los elementos de la unión termoeléctrica necesarios para medir la temperatura. El calor se transfiere desde el disco hasta la muestra a través de la cápsula de aluminio que la

contiene, la que se encuentra cerrada herméticamente. El flujo diferencial de calor es monitoreado por una termocupla constituida por alambres de cromel - alumel unidos a las partes más profundas del disco donde se encuentran las cápsulas. Como referencia se usó un material inerte en el rango de temperatura analizado. Para calibrar el equipo se realizaron análisis con patrones de alta pureza (indio, ácido esteárico y ácido láurico).

Por DSC se analizaron los aislados obtenidos en condiciones extremas de extracción y precipitación proteicas (extracción a pH 11,0 y precipitación a pH 3,5) y los aislados obtenidos por extracción a pH 8,0 y precipitación a pH 4,5 (procedimiento básico).

Preparación de las muestras: 10 - 12 mg de dispersiones proteicas de muestras de aislados liofilizadas (15 – 20 % p/v) preparadas en agua, se colocaron en cápsulas de aluminio prepesadas que se cerraron herméticamente. Como referencia se utilizó una cápsula del mismo material de mayor peso que contenía aire. Las cápsulas se colocaron en la celda del calorímetro y fueron calentadas a 10 °C/min desde 20 hasta 120 °C. Una vez terminado el programa de calentamiento las cápsulas se perforaron y se llevaron a una estufa a 105 °C hasta peso constante para calcular la cantidad de materia seca (diferencia de peso entre la cápsula luego de su permanencia en la estufa y la misma cápsula vacía), con este valor se calculó la entalpía por unidad de masa de aislado.

## III.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ISOFLAVONAS

### III.2.1. Muestras biológicas

#### III.2.1.1. *Arteria umbilical humana*

El cordón umbilical contiene dos arterias y una vena. La sangre que transportan las arterias es proveniente de la aorta fetal y se dirige a la placenta para modificar su composición en sus vellosidades coriónicas y regresar al feto por la vena. La arteria umbilical humana es un vaso que no está inervado por el sistema nervioso autónomo, (Spivak 1946, Fox y Khong 1990) de modo que su tensión está regulada por factores locales liberados por células del propio vaso como las endoteliales o que llegan disueltos en la sangre y difunden hasta la túnica media donde se encuentran las células musculares.

Se utilizaron segmentos de arterias umbilicales humanas de cordones umbilicales provistos por los servicios de Obstetricia del Sanatorio Argentino de La Plata, del Instituto Médico Platense, del Instituto Central de Medicina de La Plata y del Policlínico

San Matteo de Pavia (Italia). Los nacimientos fueron a término y por parto vaginal o cesárea. Los cordones umbilicales fueron procesados en el curso de las 24 – 36 horas posteriores al nacimiento. Éstos fueron mantenidos hasta su uso en la solución control a 4 °C.

Previo a la realización de los protocolos experimentales se disecaron segmentos de arteria umbilical del cordón removiendo el tejido conectivo circundante (gelatina de Wharton).

Para la realización de los experimentos de determinación de fuerza isométrica el endotelio se removió mecánicamente en los anillos ya preparados. En los experimentos de determinación de concentración de  $Ca^{2+}$  citoplasmático el endotelio se removió mecánicamente en segmentos de la arteria de 2 – 3 cm abiertos longitudinalmente. Posteriormente se prepararon para los ensayos correspondientes segmentos de 2 – 3 mm de longitud por cortes transversales.

### **III.2.1.2. Aorta de Rata**

Esta arteria de conducción es utilizada como modelo experimental en numerosos estudios de reactividad vascular. Se origina en el ventrículo izquierdo y luego del cayado tiene una porción torácica que fue la utilizada en este trabajo. Se emplearon segmentos de aortas de ratas Wistar de 250 – 300 g. Las aortas fueron utilizadas inmediatamente después de su disección.

### **III.2.2. Determinación de fuerza isométrica en anillos vasculares**

A partir de segmentos vasculares aislados de aorta de rata o arteria umbilical humana se prepararon anillos de 3 a 4 mm de ancho. Los anillos se colocaron en cámaras de 20 ml de capacidad termostalizadas a 37 °C, sujetos por dos alambres rígidos, uno fijo y el otro de posición variable. Esta combinación permitió regular la extensión inicial del tejido y registrar la fuerza isométrica que se desarrolló durante el ensayo. El transductor de fuerza utilizado fue un Letica TRI 201 (Letica Scientific Instruments, Barcelona, España). (figura III.3)

Los anillos, bañados por la solución salina control de cada experimento, fueron estirados inicialmente hasta que se observó una fuerza de 2 g, dejándolos durante al menos 60 minutos para estabilizar la tensión. Una vez finalizados los protocolos, los anillos fueron desmontados, se les retiró el exceso de líquido y se pesaron. Conociendo los pesos de los anillos se calculó la fuerza de contracción por unidad de masa de tejido,

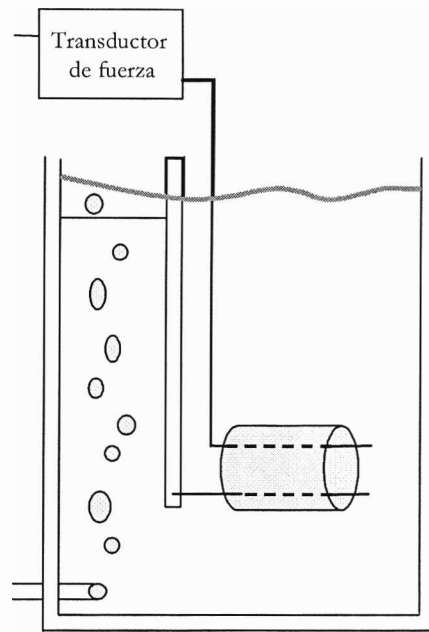


Figura III.3. Preparado empleado para la determinación de desarrollo de fuerza isométrica en anillos de aorta de rata y arteria umbilical humana.

para disminuir la variabilidad proveniente de las diferencias en las dimensiones de los anillos.

Las soluciones fueron burbujeadas con  $O_2$  o con una mezcla compuesta por 95 % de  $CO_2$  y 5 % de  $O_2$  (carbógeno), según el sistema regulador de pH utilizado.

Para evaluar los efectos de las isoflavonas sobre la fuerza desarrollada por los anillos se llevaron a cabo los ensayos detallados a continuación:

*Aorta de rata:* se agregó Genisteína 20  $\mu M$  o Daidzeína 20  $\mu M$  sobre preparados precontraídos con serotonina 2  $\mu M$  o solución despolarizante de  $K^+$  80 mM.

*Arteria Umbilical Humana:* se agregó Genisteína o Daidzeína sobre preparados precontraídos con serotonina 1  $\mu M$  o solución despolarizante de  $K^+$  80 mM.

Genisteína fue agregada en forma previa (preincubación de 20 minutos) a un estímulo con serotonina 1  $\mu M$ .

### Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de medida de fuerza isométrica:

#### *Experimentos en aorta de rata:*

Solución Control: NaCl 150 mM, KCl 6 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $CaCl_2$  1,5 mM, Glucosa 10 mM, HEPES 10 mM. Burbujeada con  $O_2$ .

Solución Despolarizante: NaCl 76 mM, KCl 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM. Burbujeada con O<sub>2</sub>.

*Experimentos en arteria umbilical humana:*

Solución Control: NaCl 150 mM, KCl 4,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, Glucosa 10 mM, burbujeada con carbógeno.

### III.2.3. Determinaciones electrofisiológicas mediante la técnica de *patch clamp*

*Disociación de células de músculo liso de arteria umbilical humana*

Las arterias fueron aisladas del tejido conectivo circundante (gelatina de Wharton) y cortadas en pequeñas porciones. Éstas se colocaron en la solución de disociación a la que se le adicionaron 3 mg/ml de colagenasa Tipo I aislada de *Clostridium histolyticum*. Sigma (St. Louis, EEUU) que contenía aproximadamente 300 unidades/mg. La suspensión se agitó suavemente durante 30 minutos a 30 °C. Luego se separó el tejido del medio de disociación y el último se centrifugó a 800 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente para concentrar las células, éstas fueron resuspendidas en la solución de disociación sin enzima y se colocaron en placas de Petri.

*Registro de corrientes iónicas en células aisladas.*

Mediante el uso de la técnica “*patch clamp*” (Hamill y col., 1981) se registraron corrientes iónicas en configuración de célula entera y corrientes de canal único en distintas configuraciones.

Mediante esta técnica se pueden registrar las corrientes o cambios en el potencial eléctrico que se verifican en el circuito establecido entre un electrodo de Ag/AgCl sumergido en una micropipeta de vidrio que contiene una solución salina, la totalidad o un segmento de la membrana celular y el electrodo de referencia que también es de Ag/AgCl y se encuentra sumergido en la solución que baña las células.

En la figura III.4 se muestra un esquema del circuito eléctrico que equivale a la membrana plasmática, las resistencias tienen por análogos a los canales iónicos presentes en la membrana plasmática a través de los cuales fluye la corriente iónica.

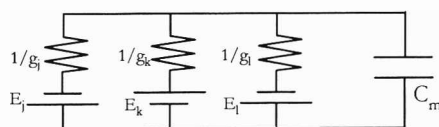


Figura III.4. Circuito eléctrico análogo a la membrana plasmática.  $E_i$ : potencial de equilibrio electroquímico del ion  $i$ ,  $g_i$ : conductancia para el ion  $i$ ,  $C_m$ : capacitancia de la membrana.

La técnica de *patch clamp* consiste en la aproximación de una micropipeta de vidrio a la superficie de la membrana celular y en el establecimiento de un sello de alta resistencia eléctrica (cercana a  $10\text{ G}\Omega$ ) entre la pipeta y la membrana. Este sello se logra ejerciendo una leve succión a través de la pipeta cuando ésta se encuentra apoyada sobre la célula. Esta primera configuración se denomina C-A (del inglés *cell-attached*) (figura III.5), en ella no hay acceso desde la pipeta al interior celular, por lo que éste se conserva. La solución contenida por la micropipeta se encuentra en contacto con la región extracelular del segmento de membrana circunscripto por el borde de la punta de la pipeta, en esta región se encuentran generalmente uno o cuatro canales iónicos.

A partir de la configuración C-A se pueden obtener otras configuraciones: la configuración W-C (del inglés *whole-cell*) se obtiene succionando a través de la micropipeta de forma de romper el sector de membrana rodeado por el sello. En estas condiciones el electrodo está conectado con el interior celular y la solución del electrodo difunde al interior celular.

Mediante tracción de la pipeta es posible obtener, a partir de W-C, otra configuración que se denomina O-O (del inglés *outside-out*), en este caso se traccionan los segmentos de membrana que continúan por fuera del sello de la micropipeta, estos segmentos vuelven a coalescer y se forma una pequeña vesícula con pocos canales, esta vesícula expone su lado externo a la solución de perfusión y el interno a la solución contenida en la micropipeta.

A partir de la configuración C-A, por medio de tracción de la pipeta, se obtiene un segmento de membrana que queda circunscripto por el contorno de la micropipeta exponiendo al medio de perfusión el lado interno de la membrana y el lado externo expuesto a la solución de la micropipeta. Esta configuración se denomina I-O (del inglés *inside-out*). En la figura III.5 se muestran esquemas de todas las configuraciones.

Las células aisladas se observaron con un microscopio invertido equipado con una lente objetivo de 40X (Telaval 3, Zeiss, Jena, Alemania) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (Newport) recubierto con una jaula de Faraday para filtrar ruidos eléctricos ambientales. La placa de Petri que contuvo las células fue perfundida con solución extracelular control, a una velocidad constante de  $0,5\text{ ml/min}$  por medio de un sistema de vías múltiples. En este sistema las soluciones alcanzan la placa propulsadas por la aceleración de la gravedad desde sus reservorios y por medio de cánulas flexibles conectadas a pipetas controladas por un micromanipulador (Leitz). Los líquidos son retirados de la placa por medio de succión continua por una bomba de vacío. Las pipetas

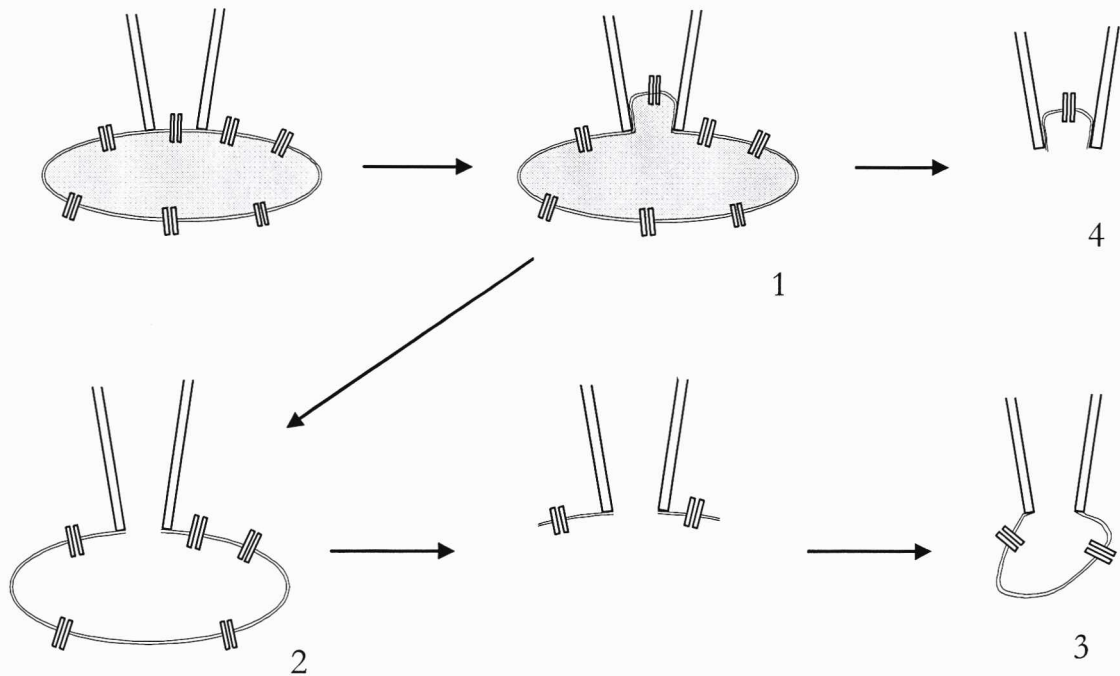


Figura III.5. Configuraciones en que se puede utilizar la técnica de *patch clamp*. 1: C-A 2: W-C 3: O-O 4: I-O.

de perfusión se ubicaron cerca de las células ensayadas y en forma previa al registro experimental se perfundió durante 15 minutos con la solución control de cada experimento. Para realizar los registros se seleccionaron las células de aspecto relajado (ahusado) y bien adheridas al fondo de la caja de Petri. Los ensayos se realizaron entre 4 y 6 horas luego de producida la disociación. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

Las micropipetas fueron realizadas con capilares de vidrio WPI PG52165-4 por medio de calentamiento y estiramiento vertical en dos fases (PP-83, Narishige Scientific Instrument Laboratorios, Tokio, Japón). La resistencia de estas pipetas estuvo en el rango de 2 a 4 M $\Omega$ , medida en solución extracelular control. La micropipeta se movilizó mediante un micromanipulador de precisión (Huxley-Style precisión MX310R, Newport). El electrodo de referencia se colocó dentro de la solución que bañó las células.

La señal eléctrica se filtró adecuadamente con un filtro tipo Bessel de 8 polos y se registró con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA). Los datos fueron convertidos mediante una placa conversora A/D – D/A (DIGIDATA 1200 Axon Instruments). Todos los componentes del equipo se conectaron a tierra con el fin de disminuir el ruido eléctrico en los experimentos.

### *Registros de corrientes totales en configuración W-C*

En esta configuración la solución salina contenida por la micropipeta difunde hacia el interior celular y mediante un protocolo de fijación de voltaje es posible registrar la corriente total que fluye a través de la suma de canales presentes en la membrana (“modo fijación de voltaje”). En esta configuración también se puede medir el valor del potencial de membrana en reposo o en respuesta a un estímulo fijo de corriente (“modo de fijación de corriente”).

Para registrar corrientes iónicas totales se aplicaron protocolos de voltaje de dos tipos:

*-Pulso de Voltaje:* cambio discreto instantáneo del valor del potencial desde un valor determinado (potencial de mantenimiento) que se mantiene durante un intervalo fijo y luego retorna también en forma instantánea al valor de potencial de mantenimiento.

*-Rampa de Voltaje:* cambio del valor del potencial aplicado a una cierta velocidad durante un determinado período de tiempo desde el valor de potencial de mantenimiento hasta un valor de potencial determinado y luego nuevamente al de mantenimiento.

Estos protocolos se generan con el programa Clampex (pClamp6) conectado al amplificador a través de la placa conversora.

Las corrientes obtenidas en esta configuración fueron filtradas a 2 kHz y digitalizadas a una frecuencia de muestreo de 40 kHz (en los experimentos con protocolos de pulsos de voltaje) y de 5 kHz (en los experimentos con protocolos de rampas de voltaje). La resistencia en serie tuvo valores en el rango de 10 a 15 M $\Omega$  y fue compensada en forma electrónica al 70 % en la mayoría de los experimentos.

El análisis de los datos obtenidos fue realizado empleando el programa Clampfit (pClamp6) que permite visualizar el registro de corriente en función del tiempo o del potencial, hacer cálculos y ajustes de los distintos parámetros que caracterizan la corriente iónica.

### *Registros de corrientes de canal único*

Se utilizaron las configuraciones I-O y O-O. Se realizaron registros de la actividad de canal único con una duración de 30 a 60 segundos en distintos valores de potencial constante. Los valores de potencial fueron aplicados directamente desde el amplificador del equipo. La señal proveniente del amplificador fue filtrada a 2 kHz y digitalizada a 16 kHz.

El análisis de los datos se realizó con los programas Fetchan y Pstat (pClamp6).



Conductancia del canal: es un valor empírico obtenido a partir de la amplitud de la corriente que porta un ión y la fuerza que impulsa esta corriente (diferencia entre el valor del potencial de membrana y el potencial de equilibrio electroquímico para este ión). La conductancia es el factor de proporcionalidad entre la corriente y esta diferencia, por lo que se puede obtener como la pendiente de la relación corriente - potencial aplicado. La conductancia iónica caracteriza al canal cuando se obtiene en condiciones experimentales y de concentración iónica equivalentes.

Probabilidad de apertura ( $P_o$ ): la actividad de un canal iónico es un fenómeno estocástico, por lo que se cuantifica en términos de probabilidad de apertura de canal. La probabilidad de apertura depende de factores como el potencial de membrana, la presencia de sustancias químicas, deformación mecánica de la membrana entre otros factores que pueden modificar el estado conformacional de los distintos canales iónicos.

La  $P_o$  se define como el cociente entre el tiempo que el canal pasa en estado abierto y el tiempo total del ensayo. En la mayor parte de los experimentos la  $P_o$  se estima con el parámetro  $N P_o$ , donde  $N$  es el número total de canales presentes en el segmento de membrana utilizado, (en general se observan entre 2 y 5 niveles de corriente por segmento) y  $P_o$  es la probabilidad de apertura individual.

### **Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de patch clamp:**

Solución de Disociación: NaCl 140 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, Glucosa 20 mM, Hepes 5 mM, pH 7,4.

### **Ensayos en configuración W-C:**

#### ***Corrientes de $K^+$ :***

Solución extracelular: NaCl 154,7 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, Glucosa 6 mM, Hepes 5 mM. El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH.

Solución intracelular de electrodo: KCl 130 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  5 mM, Ácido etilen-glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 0,1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 20 mM. El pH se ajustó a 7,3 con agregado de KOH.

#### ***Corriente catiónica no selectiva:***

Solución extracelular: NaCl 154,7 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, Glucosa 6 mM, Hepes 5 mM. El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH.

Solución intracelular de electrodo: CsCl 130 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>ATP 5 mM, EGTA 10 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 20 mM. El pH se ajustó a 7,3 con agregado de CsOH.

***Corrientes de Ca<sup>2+</sup>:***

Solución extracelular: NaCl 116,2 mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Glucosa 6 mM, Hepes 5 mM, Cloruro de tetraetilamonio 10 mM. El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH

Solución intracelular de electrodo: CsCl 130,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, Na<sub>2</sub>ATP 5,0 mM, EGTA 10 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 20 mM. El pH se ajustó a 7,3 con agregado de CsOH.

**Ensayos en configuración O-O**

***Corrientes de K<sup>+</sup>:***

Solución extracelular: NaCl 150 mM, KCl 5,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Glucosa 20 mM, Hepes 5 mM, El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH.

Solución intracelular de electrodo: KCl 130 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>ATP 5 mM, EGTA 0,1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 20 mM. El pH se ajustó a 7,3 con agregado de NaOH.

**Ensayos en configuración I-O**

***Corrientes de K<sup>+</sup>:***

Solución de electrodo: KCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M, CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH

Solución externa: KCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, EGTA 1 mM. El pH se ajustó a 7,4 con agregado de NaOH

**III.2.4. Determinación de concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en segmentos vasculares**

Los ensayos de determinación de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se realizaron en el laboratorio del Profesor Franco Tanzi del Departamento de Ciencias Fisiológicas y Farmacológicas de la Universidad de Pavia, Italia, con quien nuestro laboratorio mantiene una estrecha colaboración.

Para estimar el nivel de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático se utilizó una técnica microfluorimétrica. Se empleó la sonda fluorescente Fura-2, esta molécula fluoresce

emitiendo luz cuya longitud de onda de máxima excitación es distinta dependiendo de si se encuentra unida o no al ión  $\text{Ca}^{2+}$  (380 nm para la forma libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y 340 nm para la forma unida), la luz emitida proveniente de las dos formas se cuantifica a 510 nm. Esta molécula se incorpora al medio extracelular en forma de acetoximetil éster (Fura-2-AM) para ser incorporada al citoplasma gracias a la actividad de esterases presentes en la membrana plasmática. Una vez desesterificada en el citosol la sonda no es capaz de atravesar las membranas por lo que no se la encuentra en el interior de orgánulos como el retículo sarcoplásmico o la mitocondria. Luego de un tiempo de incubación se remueve el exceso de Fura-2-AM remanente en el espacio extracelular por enjuague con la solución control. De esta forma durante los experimentos el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  que se registra corresponde al de los citoplasmas de las células cargadas. El preparado se excita alternativamente con las dos longitudes de onda y se registra la intensidad de luz emitida en cada caso, luego se utiliza el cociente de intensidades como indicador de la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los segmentos vasculares se limpiaron del tejido conectivo circundante, se prepararon anillos de aproximadamente 2 mm de ancho a los que en forma mecánica se les removió el endotelio, posteriormente se abrieron para obtener segmentos rectangulares. Estos segmentos se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente y al reparo de la luz en una solución de Fura-2-AM 16  $\mu\text{M}$  preparada en la solución control, cuya composición control se detalla más adelante. Luego de este tiempo se lavaron con la solución control a fin de remover el exceso de Fura-2-AM. Los experimentos se realizaron fijando el segmento vascular con pequeñas agujas al fondo de una placa de Petri que contenía una silicona para ese fin. Esta placa fue luego montada en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, AxioLab) equipado con una lámpara de mercurio de 100 W. El preparado se visualizó gracias a un objetivo de inmersión en agua (Zeiss 63X Achromat). La luz con la que se excitó fue filtrada a través de un filtro infrarrojo, un filtro neutro y un filtro de longitud de onda que alternativamente dejó pasar la luz de 340 o de 380 nm (Chroma Technology, Brattleboro, VT). La luz emitida fue filtrada para seleccionar la de 510 nm antes de ser colectada por una cámara de alta sensibilidad (Extended-ISIS Camera, Photonic Science, Millham, Reino Unido). Con un programa desarrollado en el laboratorio se controlaron la cámara, los filtros y el obturador y se midió la fluorescencia de un número discreto de regiones de interés que correspondieron a más de una célula de músculo liso. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron cada 1,5 o cada 2,0 segundos. Las soluciones se aplicaron con pipetas pasteur

volcándolas desde el objetivo del microscopio y se removieron gracias a una bomba de vacío conectada *ad hoc* (figura III.6).

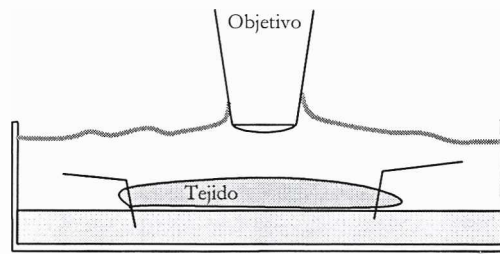


Figura III.6. Preparado empleado para la determinación de la  $[Ca^{2+}]_i$  por microfluorimetría en células de músculo liso *in situ* de aorta de rata y arteria umbilical humana.

Protocolos experimentales utilizados para evaluar los efectos de Genisteína sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ :

*Aorta de rata:*

Se repitieron estímulos con serotonina  $2 \mu M$  o solución despolarizante de  $K^+$   $80 \text{ mM}$ , estos estímulos fueron de distinta duración (dependiendo del ensayo) y estuvieron separados por intervalos en que el tejido se lavó con la solución control. Algunos de estos estímulos fueron realizados en presencia de Genisteína aplicada en forma previa. En algunos ensayos Genisteína fue agregada en forma conjunta con tetraetilamonio  $0,5 \text{ mM}$ .

*Arteria umbilical humana:*

Se repitieron estímulos con serotonina  $2 \mu M$  o solución despolarizante de  $K^+$   $80 \text{ mM}$ , estos estímulos fueron de distinta duración (dependiendo del ensayo) y estuvieron separados por intervalos en que el tejido se lavó con la solución control. Algunos de estos estímulos fueron realizados en presencia de Genisteína aplicada en forma previa.

Se realizaron ensayos en que Genisteína se agregó sobre segmentos previamente estimulados con ácido ciclopiazónico  $10 \mu M$ .

Se efectuaron ensayos en que los segmentos arteriales fueron mantenidos durante una hora en una solución sin  $Ca^{2+}$ . Posteriormente se restituyó la concentración de  $Ca^{2+}$   $1,5 \text{ mM}$  cambiando el líquido extracelular. A algunos segmentos se les agregó Genisteína  $20 \mu M$  en los últimos 20 minutos de incubación en la solución sin  $Ca^{2+}$ .

### Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de determinación de $[Ca^{2+}]_i$ :

Solución control: NaCl 150 mM, KCl 6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Ca Cl<sub>2</sub> 1,5 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM.

Solución despolarizante: NaCl 76 mM, KCl 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Ca Cl<sub>2</sub> 1,5 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM.

Solución sin Ca<sup>2+</sup>: Na Cl 150 mM, KCl 6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM.

### III.3. Drogas y reactivos utilizados

Las sustancias empleadas para los distintos ensayos fueron calidad *pro analysi*.

### III.4. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron expresados como valor medio  $\pm$  error estándar y fueron evaluados mediante análisis de varianza, en el caso de que los tratamientos presentasen una variación mayor que la esperada al azar, los promedios fueron comparados por el test de Tukey con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . En los casos correspondientes se utilizó el test de Student. El análisis de varianza y los tests de Tukey y Student se realizaron utilizando un programa de análisis estadístico SIGMA STAT.

Los ensayos del capítulo IV fueron replicados al menos tres veces. El número de réplicas de los ensayos del capítulo V se indican en el texto.

## **Resultados y Discusión**

# **Isoflavonas y Proteínas de Soja**

## IV. ISOFLAVONAS Y PROTEÍNAS DE SOJA

### IV.1. Procedimiento de cuantificación de isoflavonas

A efectos de contar con condiciones adecuadas para la separación y cuantificación de isoflavonas mediante HPLC inicialmente se procedió a seleccionar el gradiente de solventes más apropiado. En base a los resultados obtenidos se seleccionó, tal como se indicó en Materiales y Métodos, un gradiente no lineal generado con ácido acético al 0,1 % en agua y ácido acético al 0,1 % en acetonitrilo:agua 50:50. Con este sistema de solventes se logró una buena separación de las diferentes isoflavonas presentes en los extractos obtenidos a partir de harina y otros productos de soja tales como los aislados proteicos. Se prepararon soluciones a partir de los patrones comerciales de las isoflavonas, se inyectaron diferentes volúmenes de cada solución en la columna HPLC y se correlacionó el área del cromatograma (unidades de absorbancia por segundo) con la masa (microgramos) obteniéndose las correspondientes curvas de calibración, las que siguieron un modelo de ajuste lineal (tabla IV.1).

Tabla IV.1. Parámetros de las curvas de calibración para la cuantificación de isoflavonas.

Isoflavona	Factor de respuesta ( $\mu\text{g}/\text{absorbancia} \times \text{s}$ )	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
Genisteína	$1,738 \times 10^{-7}$	0,993
Genistina	$2,866 \times 10^{-7}$	0,994
Malonil-genistina	$4,206 \times 10^{-7}$	0,998
Acetil-genistina	$3,998 \times 10^{-7}$	0,999
Daidzeína	$3,343 \times 10^{-7}$	0,998
Daidzina	$4,664 \times 10^{-7}$	0,995
Malonil-daidzina	$6,054 \times 10^{-7}$	0,994



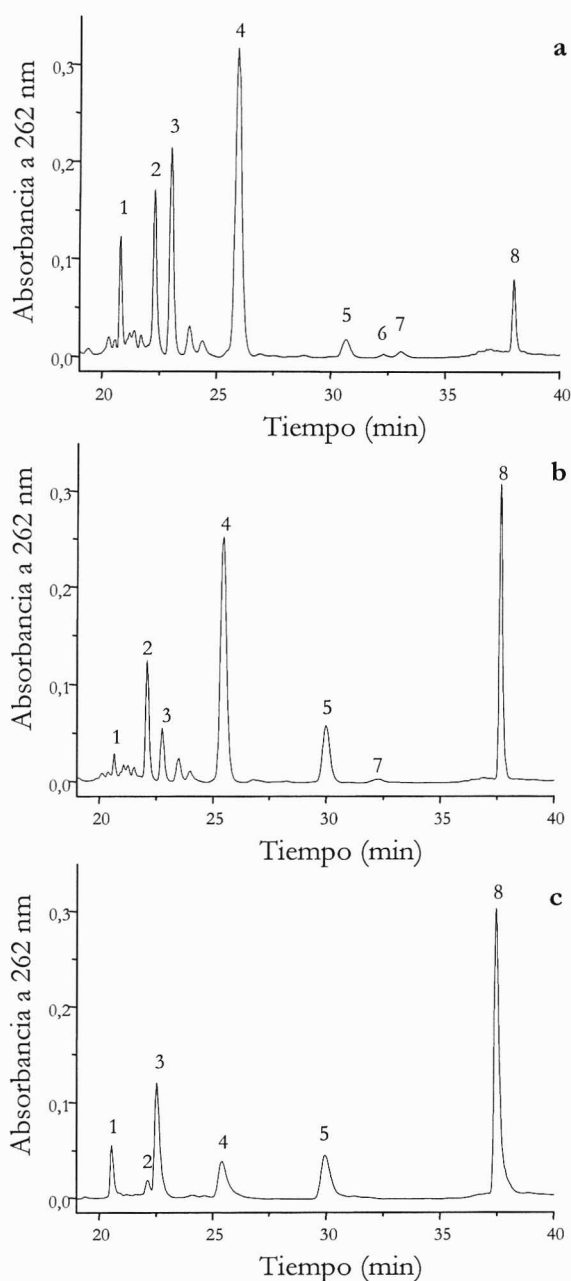


Figura IV.1. Cromatogramas de extractos hidroalcohólicos de aislados obtenidos en distintas condiciones. a) Procedimiento básico. b) Los  $\beta$ -glucósidos fueron hidrolizados por macerado de la harina a pH 6,5. c) Saponificación de los ésteres por alcalinización y posterior hidrólisis de los  $\beta$ -glucósidos liberados por neutralización. 1: Daidzina, 2: Malonil-daidzina, 3: Genistina, 4: Malonil-genistina, 5: Daidzeína, 6: Acetil-genistina, 7: Gliciteína, 8: Genisteína.

La figura IV.1 muestra, a modo de ejemplo, cromatogramas típicos correspondientes a las isoflavonas de aislados proteicos obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales los cuales presentaron distintos patrones de conjugación. Las isoflavonas se separan de acuerdo a la polaridad que presentan en las condiciones de análisis, el pH ácido en la columna asegura que las moléculas no se encuentren disociadas.

De esta manera, para la serie de Genisteína, la molécula más polar – que abandona en primer lugar la columna - es Genistina, la sigue Malonil-genistina, luego Acetil-genistina y finalmente Genisteína, que es la menos polar de las isoflavonas presentes en la soja. En el panel a se muestra el cromatograma correspondiente a un aislado obtenido con el protocolo básico, que no difiere mucho del de la harina de partida. En el mismo se observa una gran proporción de malonil-conjugados, seguida de  $\beta$ -glucósidos, un porcentaje menor de aglucona y una más pequeña del acetil-éster.

En el panel b de la misma figura se presenta el cromatograma de las isoflavonas de un aislado cuyo patrón de conjugación fue modificado mediante el procedimiento descrito en la página 21 realizando la precipitación proteica a pH 5,6 durante 23 horas. En él se observa que gran parte de los  $\beta$ -glucósidos se han convertido en aglucona, la que se encontró en una proporción comparable al malonil-conjugado.

El panel c representa a las isoflavonas de un aislado en que el patrón de conjugación se afectó por el procedimiento detallado en la página 21 en el que se realizó una maceración de la harina a pH 11 durante 60 minutos seguida de otra a pH 6,5 por 12 horas. En este caso la forma mayoritaria es la aglucona que se formó a partir de las otras por saponificación de los ésteres – malónico y acético – seguida de hidrólisis del enlace  $\beta$ -glucosídico. (Reacciones detalladas en la figura I.2).

Los cromatogramas presentados corresponden a resultados que serán discutidos en detalle en las siguientes secciones.

## **IV. 2. Isoflavonas en harinas desgrasadas de soja**

### *IV.2.1. Contenido de isoflavonas en harinas desgrasadas de soja*

El contenido de isoflavonas de las harinas utilizadas se muestra en la tabla IV.2. Estas harinas se almacenaron a 4 °C durante el tiempo que llevó este trabajo. Se comprobó que el almacenamiento de la harina no afectó el contenido de Genisteína total ni los patrones de conjugación. En las harinas se halló que el aporte de la serie de Genisteína al contenido total de isoflavonas fue mayor que el de la serie de Daidzeína y éste a su vez mayor que el correspondiente a Gliciteína (datos no mostrados), en concordancia con los datos obtenidos por Wang y Murphy, (1996). Cabe señalar que el contenido de Gliciteína total es muy bajo en soja. La razón entre el contenido de Genisteína total y el de Daidzeína total varió entre 1,52 y 1,58.

Tabla IV.2. Contenido de Genisteína y Daidzeína totales en las harinas utilizadas en este trabajo, los valores están expresados como  $\mu\text{g}$  de cada isoflavona por g de harina.

Partida	Genisteína	Daidzeína
2001	$1156,3 \pm 11,6$	$756,8 \pm 5,2$
2002	$833,0 \pm 8,9$	$526,4 \pm 5,0$
2004	$947,8 \pm 14,2$	$602,4 \pm 7,4$

#### IV.2.2. Efecto del macerado de harinas a distintos pHs sobre el patrón de conjugación

Se analizó el patrón de conjugación de las isoflavonas luego de haber dispersado harina en agua en distintas condiciones de pH. La composición de isoflavonas de la harina inicial, en lo que respecta a la serie de la Genisteína, mostró un porcentaje mayoritario ( $54,31 \pm 0,51 \%$ ) de Malonil-genistina, seguido por un  $36,85 \pm 0,88 \%$  de Genistina y cantidades equivalentes de Acetil-genistina y Genisteína que entre ambas sumaban un  $8,84 \pm 0,81 \%$ . Estos datos fueron coincidentes con los rangos descriptos

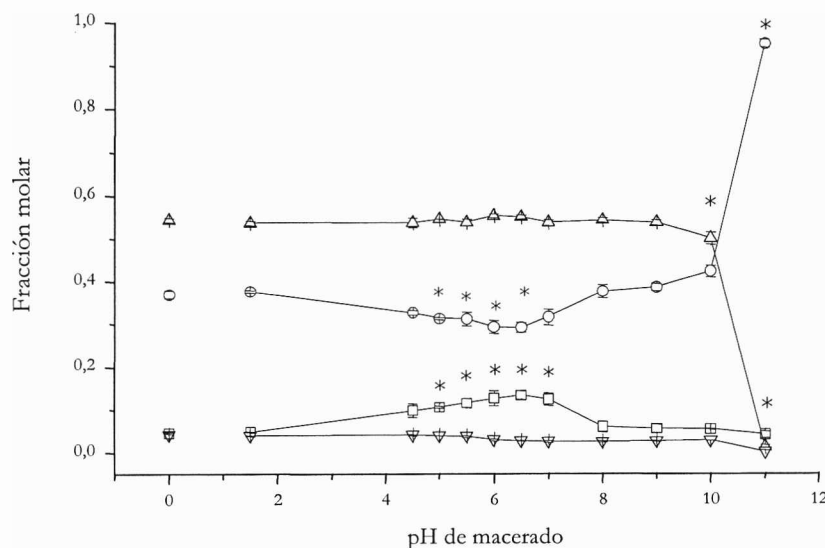


Figura IV.2. Contenido de Genisteína (□), Genistina (○), Malonil-genistina (△) y Acetil-genistina (▽) luego del macerado de la harina a los distintos pHs. La concentración de cada molécula se expresa en forma de fracción molar. Los valores en  $x = 0$  corresponden a la harina de partida. Los valores señalados con \* son significativamente distintos de los valores de la harina de partida.

en bibliografía (Wang y Murphy 1996; Rickert y col., 2004). Las proporciones antedichas fueron afectadas por la maceración de la harina a distintos pHs. En la figura IV.2 se muestra la composición de las isoflavonas correspondientes a la serie de Genisteína expresada en forma de fracción molar. Las reacciones verificadas con los macerados de la harina a diferentes pHs fueron la saponificación de los ésteres y la hidrólisis enzimática del enlace  $\beta$ -glucosídico. La saponificación comenzó a detectarse en forma significativa a partir de pH 10,0 y fue casi total a pH 11,0 ( $p < 0,05$ ), como consecuencia de esta reacción el contenido de los ésteres malónico y acético disminuyó y el del  $\beta$ -glucósido aumentó. Por su parte, la conversión enzimática del  $\beta$ -glucósido en aglucona se evidenció entre pHs 4,5 y 8,0 siendo máxima a pH 6,5, pH en el que se hidrolizó el  $21,2 \pm 2,0$  % ( $p < 0,05$ ) de la Genistina original. La maceración de la harina a diferentes pHs no produjo pérdida o destrucción de la cantidad total de las isoflavonas. El tratamiento a distintos pHs podría aplicarse en forma secuencial para producir un patrón de Genisteína distinto al de la harina original - que generalmente presenta como fracción mayoritaria al éster malónico - para enriquecerlo en  $\beta$ -glucósidos o en agluconas. En los granos o harinas de soja generalmente se encuentran bajos porcentajes de aglucona, esta forma es la que tiene actividad biológica y la que puede absorberse en el tracto gastrointestinal (Ismail 2005). Productos fermentados como el tempeh o el miso presentan un importante grado de conversión del  $\beta$ -glucósido en aglucona mientras que los productos no fermentados, como el tofu o los aislados proteicos, generalmente no presentan una fracción mayoritaria de la forma con actividad biológica.

#### IV.2.3. *Determinación de actividad $\beta$ -glucosidasa en harinas de soja*

Para confirmar la existencia de  $\beta$ -glucosidasa activa en la harina utilizada como materia prima se determinó su actividad de la manera indicada en la página 27 de Materiales y Métodos. Su presencia es importante porque permite convertir un dado patrón de conjugación en otro con una mayor proporción de isoflavonas biodisponibles.

Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que en la porción de muestra que no recibió tratamiento térmico, el  $86,5 \pm 0,9$  % de la Genistina inicial se transformó en Genisteína por acción de la  $\beta$ -glucosidasa ( $p < 0,05$ ) (figura IV.3). Como consecuencia de esta transformación la fracción molar de la aglucona creció aproximadamente nueve veces ( $0,046 \pm 0,002$  hasta  $0,416 \pm 0,006$ ,  $p < 0,05$ ). Se detectó también una leve disminución ( $1,3 \pm 0,6$  % respecto del original) de Malonil-genistina.

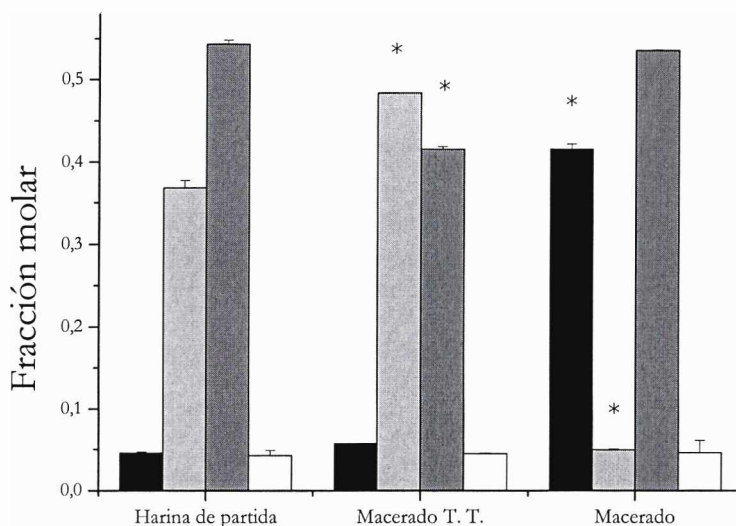


Figura IV.3. Determinación de actividad  $\beta$ -glucosidasa en harina de soja, se muestran los patrones de conjugación expresados como fracciones molares en las tres muestras, harina original, harina tratada térmicamente (T.T. - 90 °C - 15 minutos) en forma previa al macerado a pH 6,5 y harina macerada a pH 6,5 durante 12 horas. Genisteína (■), Genistina, (▣), Malonil-genistina (▤), Acetil-genistina (□). Los valores señalados con \* son significativamente distintos de los de la harina de partida.

La muestra que había sido tratada térmicamente presentó un aumento de la fracción molar de aglucona de 1,2 veces (desde  $0,046 \pm 0,002$  hasta  $0,054 \pm 0,001$ ,  $p < 0,05$ ) valor que representa el grado de conversión no enzimática. El tratamiento térmico de la dispersión de harina además provocó un aumento de la fracción de Genistina con una disminución concomitante de Malonil-genistina ( $23,4 \pm 0,8$  % de la cantidad inicial,  $p < 0,05$ ) demostrando que el tratamiento térmico produce hidrólisis de la unión éster. Este fenómeno fue también descrito por Coward y col., (1998) en ensayos en los que se trataba harina de soja con calor húmedo.

Estos resultados confirman que la harina de partida contenía enzima funcional, sugiriendo que el tratamiento al que fue sometida en su producción no fue tan drástico como para inactivarla completamente o dicha inactivación fue reversible. Si dispersiones acuosas de harina son expuestas a pHs cercanos a 6,5 se producirá la hidrólisis de los  $\beta$ -glucosidos en un grado que dependerá del tiempo - y de la temperatura - de macerado. Sobre la base de estos hallazgos se pueden plantear experimentos que involucren la conversión enzimática de  $\beta$ -gucósidos en agluconas sin que se requiera el agregado de enzima proveniente de microorganismos u otras preparaciones.

### IV.3. Isoflavonas en aislados proteicos y subproductos

Para estudiar como se distribuyen las isoflavonas entre los aislados proteicos, APS, y los subproductos derivados de su obtención, RI y S, se prepararon aislados según el procedimiento básico y sus modificaciones de acuerdo a lo detallado en Materiales y Metodos (tabla III.1, página 22).

#### IV.3.1. *Modificación de variables de proceso correspondientes a la etapa de extracción de proteínas en la preparación de aislados*

##### IV.3.1.1. *Cambios en el pH*

El primer paso en la obtención de aislados es la extracción de proteínas de la harina. Ésta se realiza a pH alcalino donde las globulinas de reserva son solubles en medio acuoso. La relación entre harina y agua elegida para maximizar la extracción proteica fue 1:10. De acuerdo con Kao y col., (2004), una relación harina:agua entre 1:9 y 1:11 permite alcanzar el máximo rendimiento proteico. En esta etapa se ensayaron pHs de extracción entre 7,0 y 11,0. En todos los casos se recuperó aproximadamente un 90 % de la cantidad total de Genisteína presente en la harina original, cantidad que se distribuyó entre los tres productos obtenidos, RI, S y APS.

En la figura IV.4 (paneles a, b y c) se muestra la variación a 20 °C del contenido de Genisteína y sus formas conjugadas en el residuo insoluble, RI, obtenido luego de la extracción alcalina realizada a diferentes pHs, en el suero, S, y en el aislado proteico, APS, manteniendo el pH de precipitación constante (pH 4,5). Los resultados se expresaron como microgramos de Genisteína total - e individualmente para las formas conjugadas (expresadas en su equivalente aglucona) - por gramo de harina inicial. Se puede observar una disminución en el contenido de Genisteína total en RI en función del aumento del pH de extracción (panel a). A pH 7,0 un  $38,5 \pm 2,3$  % de la Genisteína total quedó retenido en este subproducto mientras que a pH 11,0 este porcentaje se redujo a un  $20,3 \pm 3,1$  %. La cantidad remanente en el suero, S, no se modificó (panel b). El aislado proteico, APS, retuvo más isoflavonas con el aumento del pH de extracción proteica (panel c) y se enriqueció desde  $1305,56 \pm 15,75$  hasta  $1550,65 \pm 28,28$   $\mu\text{g}$  Genisteína total / g aislado para pH 7,0 y pH 11,0 respectivamente ( $p < 0,05$ ) (panel d).

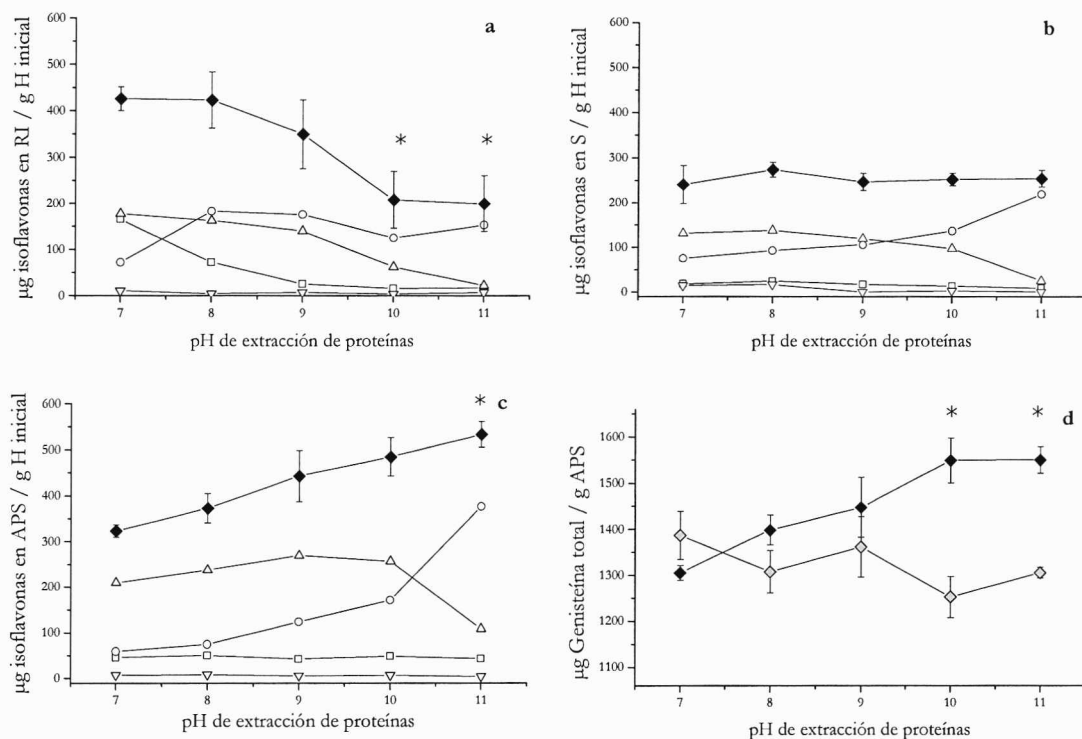


Figura IV.4. Contenido de Genisteína y sus formas conjugadas en RI (a), S (b), APS (c y d) a temperatura ambiente, obtenidos realizando la extracción proteica a distintos pHs. Los valores están expresados como  $\mu\text{g}$  de isoflavonas por g de harina (H) inicial (a, b y c) y como  $\mu\text{g}$  de Genisteína total por g de APS (d). Genisteína (—□—), Genistina (—○—), Malonil-genistina (—△—), Acetil-genistina (—▽—), Genisteína total a temperatura ambiente (—◆—), Genisteína total a 50 °C (—◇—). Los valores señalados con \* son los significativamente distintos de los del procedimiento básico y de interés para la discusión de los resultados.

La adición de cantidades diferentes de NaOH o HCl, en cualquier etapa del proceso, respecto de las empleadas en el procedimiento básico de obtención de APS indefectiblemente conducirá a un incremento del contenido final de NaCl en los aislados o subproductos obtenidos. El NaCl es soluble en medio acuoso, por lo tanto el contenido de esta sal variará durante el proceso de extracción de las isoflavonas y podría interferir en su determinación. A efectos de verificar esa influencia realizamos ensayos control en los que la concentración de NaCl en el solvente de extracción varió entre 0 y 0,2 M. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de extracción de las distintas formas de Genisteína presentes en harina o aislados proteicos de soja no se vieron afectados por la concentración de sal en el solvente de extracción. Esta información se hace extensible, de aquí en más, a todos los ensayos en que se varíe el contenido final de NaCl en productos o subproductos bajo análisis, por adición durante el proceso de distintas cantidades de ácido o base.

Dado que las isoflavonas presentan un débil carácter ácido, con pKas que se extienden desde el rango alcalino (9,74 y 11,0 para las beta-glucósidos y agluconas respectivamente) hasta el ácido (5,7 para Malonil-daidzina) (McLeod y Shepherd, 2000; Rickert y col, 2004), su solubilidad en agua se incrementa con el aumento del pH por aumento de su grado de disociación. En este sistema, las isoflavonas podrían solubilizarse a pHs de extracción altos abandonando la matriz sólida de la harina. Estas moléculas se harían nuevamente insolubles durante la precipitación isoelectrica y podrían coprecipitar con las proteínas enriqueciendo el aislado. Los datos aportados por Piskula y col., (1999) son compatibles con esta hipótesis dado que ellos midieron la solubilidad de Genisteína y Genistina a pH 2,0; 7,5 y 10,6, la cual fue inferior al 8% a los pHs ácido y cercano a la neutralidad y del 100 % al pH francamente alcalino.

Observando la distribución de las isoflavona de la serie de Genisteína, los cambios encontrados en RI, S y APS fueron consistentes con los discutidos para el efecto del macerado de harina a distintos pHs. Es interesante remarcar que el residuo insoluble obtenido a pH 7,0 tuvo un contenido mucho mayor de aglucona y uno más bajo de beta-glucósido que el resto de los RI. Esta diferencia puede atribuirse a una mayor acción enzimática, dado que por razones de procedimiento, el residuo insoluble se mantenía en suspensión a pH 7,0 y a temperatura ambiente por un período de tiempo prolongado (hasta concluir la obtención del aislado) antes de congelarse, lo que permitió la acción de  $\beta$ -glucosidasa.

Estos resultados muestran que el pH es un factor importante en determinar el contenido de isoflavonas de los aislados proteicos cuando se realiza la extracción de proteínas a temperatura ambiente, obteniéndose aislados con mayor contenido que con el procedimiento básico a pHs 10,0 y 11,0. Este aumento en el contenido de isoflavonas de la serie de Genisteína en los aislados se logró disminuyendo la cantidad que hubiera quedado en el residuo insoluble y desviándola hacia el producto de interés.

#### IV.3.1.2. *Cambios en el pH y la temperatura*

El aumento de temperatura de 20 a 50°C durante la extracción de proteínas a pH alcalino modificó parcialmente los resultados previamente discutidos. La principal diferencia detectada fue la menor variación en el contenido de Genisteína total en función del pH (figura IV.5, paneles a, b y c). El aumento de temperatura en esta etapa no modificó el contenido de Genisteína en el aislado proteico (panel d).



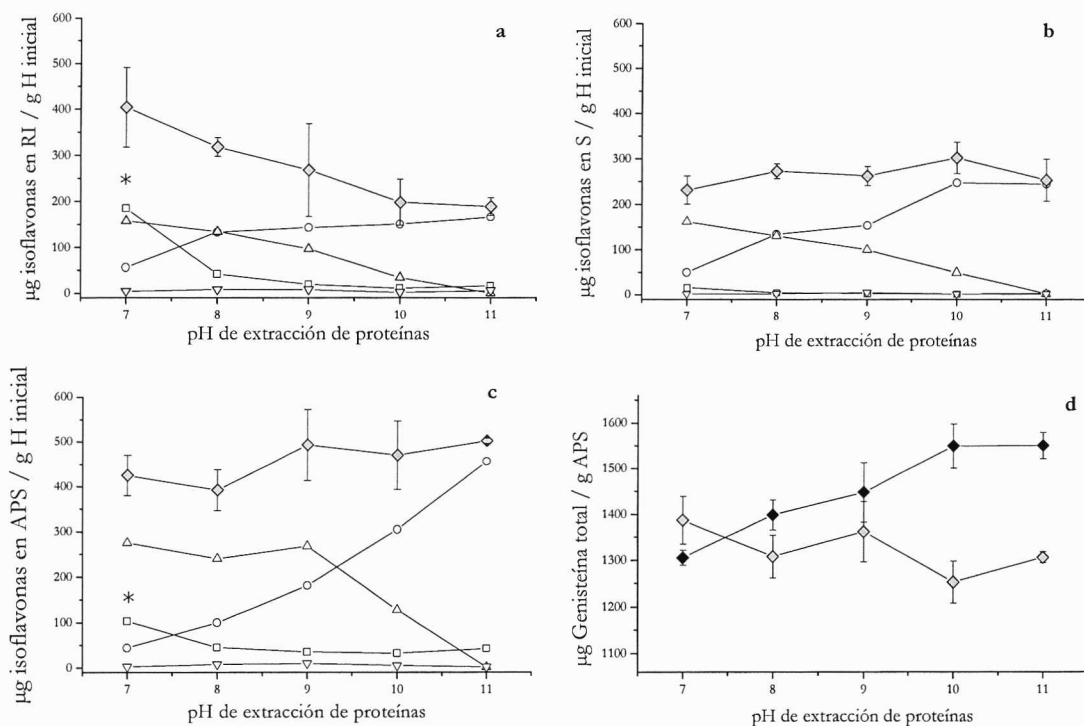


Figura IV.5. Contenido de Genisteína y sus formas conjugadas en RI (a), S (b), APS (c y d) a 50 °C, obtenidos realizando la extracción proteica a distintos pHs. Los valores están expresados como  $\mu\text{g}$  de isoflavonas por g de harina (H) inicial (a, b y c) y como  $\mu\text{g}$  de Genisteína total por g de APS (d). Genisteína (—□—), Genistina (—○—), Malonil-genistina (—△—), Acetil-genistina (—▽—), Genisteína total a temperatura ambiente (—◆—), Genisteína total a 50 °C (—◇—). Los valores señalados con \* son los significativamente distintos de los del procedimiento básico y de interés para la discusión de los resultados.

A pH 7,0 y 50 °C se observó que la conversión de Genistina en Genisteína (reflejada en un mayor contenido de aglucona y un menor contenido de  $\beta$ -glucósido en los RI y APS) fue mayor que la detectada al mismo pH y 20 °C. Este fenómeno es consistente con el aumento de actividad de  $\beta$ -glucosidasa a esta temperatura informado por Matsuura y col., (1989).

### IV.3.2. Modificación de variables de proceso correspondientes a la etapa de precipitación de proteínas en la preparación de aislados

#### IV.3.2.1. Cambios en el pH

Para estudiar el efecto de la variación del pH durante la precipitación ácida en el contenido de Genisteína y sus formas conjugadas se varió el mismo entre 3,0 y 6,0, rango que incluye el pH isoelectrico promedio de las globulinas de reserva. En todos los casos

el pH de extracción de las proteínas se mantuvo constante e igual a 8,0. Bajo estas condiciones la solubilidad de las proteínas exhibió cambios marcados, especialmente en los valores extremos en los que las proteínas se encontraron más solubles. Esto produjo cambios significativos en el rendimiento del aislado proteico que varió entre  $5,4 \pm 1,4$  y  $27,8 \pm 1,0$  % a pHs 3,0 y 4,0 respectivamente ( $p < 0,05$ ) (figura IV.6, panel a). En el rango de pH entre 3,5 y 5,6 el porcentaje de proteínas encontrado en los aislados fue prácticamente igual ( $79,1 \pm 2,7$  % en base húmeda). La proporción de glicinina a  $\beta$ -conglucina -determinada por electroforesis- en los distintos APS se mantuvo constante.

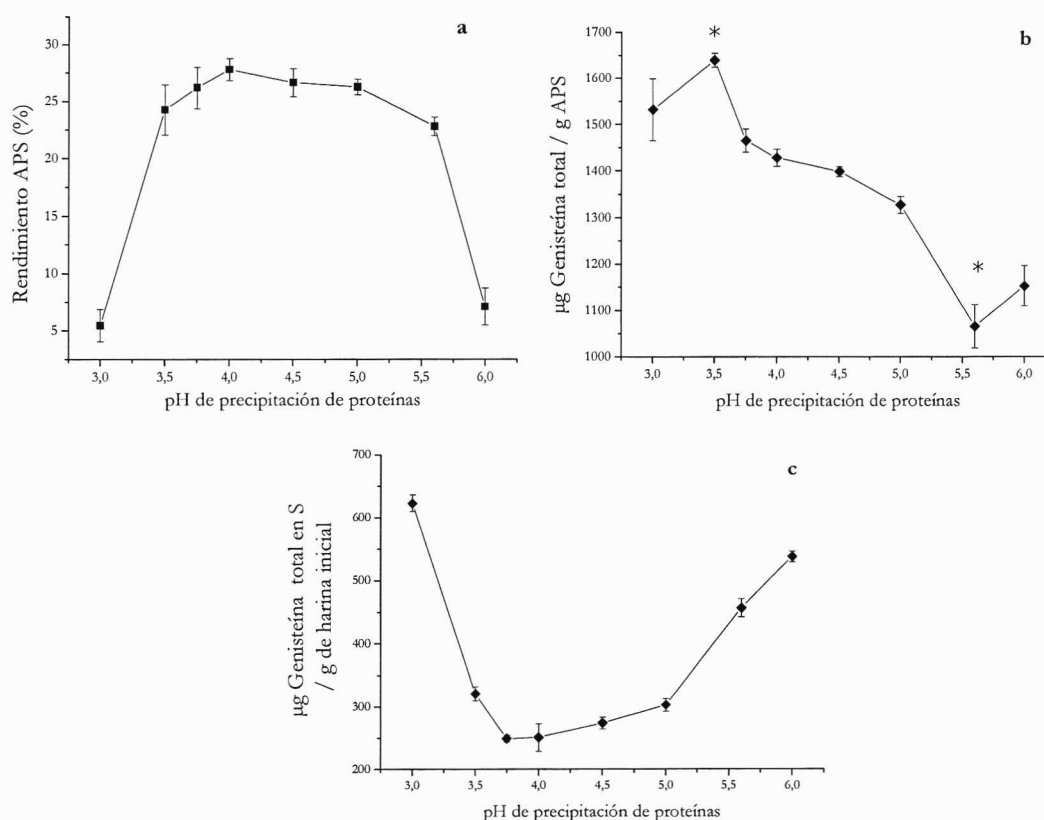


Figura IV.6. Modificación en el pH de precipitación de proteínas. a) Rendimiento de APS. b) Contenido de Genisteína total en APS. c) Genisteína total retenida en S. Los valores señalados con \* son los significativamente distintos de los del procedimiento básico y de interés para la discusión de los resultados.

El valor más alto de contenido de Genisteína total fue hallado cuando las proteínas se precipitaron a pH 3,5 -  $1639,46 \pm 15,15$   $\mu\text{g}$  Genisteína total/g de aislado -, y el más bajo a pH 5,6 -  $1065,45 \pm 46,48$   $\mu\text{g}$  Genisteína total/g de aislado - ( $p < 0,05$ ) (figura IV.6, panel b). Cuando se analizó el porcentaje de la Genisteína y sus formas conjugadas presente en el sobrenadante alcalino y se tuvo en cuenta el rendimiento del aislado, se observó que a pH 3,5 el  $60,0 \pm 4,7$  % de la Genisteína total que se extraía de la

harina al solubilizar las proteínas a pH 8,0 precipitó junto con el aislado. Este porcentaje fue igual a pH 4,0, donde el aumento en el rendimiento compensó el descenso en el contenido de Genisteína total y se redujo a pH 5,6 ( $36,5 \pm 4,1 \%$ ,  $p < 0,05$ ).

En el panel c de la figura IV.6 se muestra el comportamiento de las isoflavonas en los sueros obtenidos en estos experimentos. La relación entre el pH y el contenido de isoflavonas fue opuesta a la detectada para el rendimiento de aislado. Se observó que en los pHs extremos en los que la proteína permanecía soluble en el suero, también lo hacían las isoflavonas, sugiriendo un cierto nivel de asociación.

Se encontró que la disminución en el contenido de Genisteína total en los APS obtenidos precipitando las proteínas a pHs mayores que 3,5 era a expensas de la disminución de las formas conjugadas, mientras que el contenido de aglucona fue constante en todos los pHs ensayados. Para el caso de Malonil-genistina se puede plantear un aumento de su solubilidad a pHs cercanos a la neutralidad por aumento de su grado de disociación, de ocurrir, estas moléculas quedarían solubles y constituirían el suero. También se podría hipotetizar que la asociación proteína-formas conjugadas fuera más débil a pHs mayores a 3,5.

Estos resultados muestran que el pH de precipitación de las proteínas durante la preparación de aislados proteicos es un factor relevante en la distribución de la Genisteína. Se logró obtener un APS más rico en Genisteína total al reducir el pH de precipitación, se alcanzó un aumento del  $17,3 \pm 0,2 \%$  ( $p < 0,05$ ) cambiando el pH de precipitación de 4,5 a 3,5.

#### IV.3.2.2 *Cambios en el tiempo y el pH*

En la tabla IV.3 se muestran los valores correspondientes al contenido de Genisteína total en aislados que se obtuvieron por precipitación durante distinto tiempo a pH 3,5 y 5,6 y temperatura ambiente. Se puede observar que luego de 23 horas el contenido de Genisteína fue significativamente mayor para los dos pHs de precipitación ensayados ( $p < 0,05$ ). El efecto del tiempo fue el mismo para las dos condiciones de precipitación, por lo que a pH 5,6 el contenido de Genisteína total fue en todos los tiempos menor que a pH 3,5, sugiriendo que el efecto del pH sobre las proteínas o las isoflavonas no afecta la velocidad de unión sino la afinidad entre proteínas e isoflavonas.

El aumento del contenido de Genisteína total con el tiempo de precipitación sugiere la existencia de un desplazamiento de las isoflavonas de la fase fluída a la fase sólida dispersa. A pesar del efecto favorable detectado, el incremento del tiempo de

Tabla IV.3. Contenido de Genisteína total en APS obtenidos en diferentes tiempos y pHs de precipitación ( $\mu\text{g}$  Genisteína total / g APS)

Tiempo (min)	pH de precipitación	
	3,5	5,6
15	1228,52 $\pm$ 36,27	1000,03 $\pm$ 8,76
210	1245,83 $\pm$ 0,94	1008,08 $\pm$ 7,80
1380	1451,82 $\pm$ 32,46	1135,96 $\pm$ 41,94

precipitación no resulta una condición recomendable para la producción de aislados proteicos de soja a gran escala ya que puede implicar riesgos microbiológicos y problemas de aprovechamiento de equipos que no serían fácilmente compensables desde el punto de vista económico. De todas maneras estos resultados brindan información sobre el comportamiento del sistema.

#### IV.3.2.3. Cambios en la temperatura y el pH

El contenido de Genisteína total presente en los aislados no se modificó cuando la temperatura de precipitación se redujo de temperatura ambiente a 4 °C, en ninguno de los pHs estudiados.

La disminución de la temperatura de precipitación proteica puede afectar no sólo la asociación entre las isoflavonas y las proteínas, sino además reducir la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Por lo tanto, cuando se analizan los efectos de esta variable se debe considerar que durante la precipitación proteica a temperatura ambiente se generan agluconas a partir de  $\beta$ -glucósidos. Esta conversión aumenta con el pH de precipitación debido al efecto de esta variable sobre la actividad de la enzima.

Si la temperatura afectara la interacción proteína-aglucona de distinta forma que la interacción proteína-formas conjugadas, en el análisis de resultados debería tenerse en cuenta la variación de la cantidad de Genistina y Genisteína disponibles para asociarse con las proteínas. En las condiciones experimentales empleadas, se encontró que el contenido de aglucona en los aislados precipitados a 4 °C a pH 4,5 y 5,6 era la mitad que aquel obtenido cuando la precipitación se llevaba a cabo a temperatura ambiente (figura 7, panel a). Este hecho podría deberse a una interacción proteína-aglucona menos favorable a mayor temperatura o a la mayor cantidad de aglucona presente a temperatura ambiente

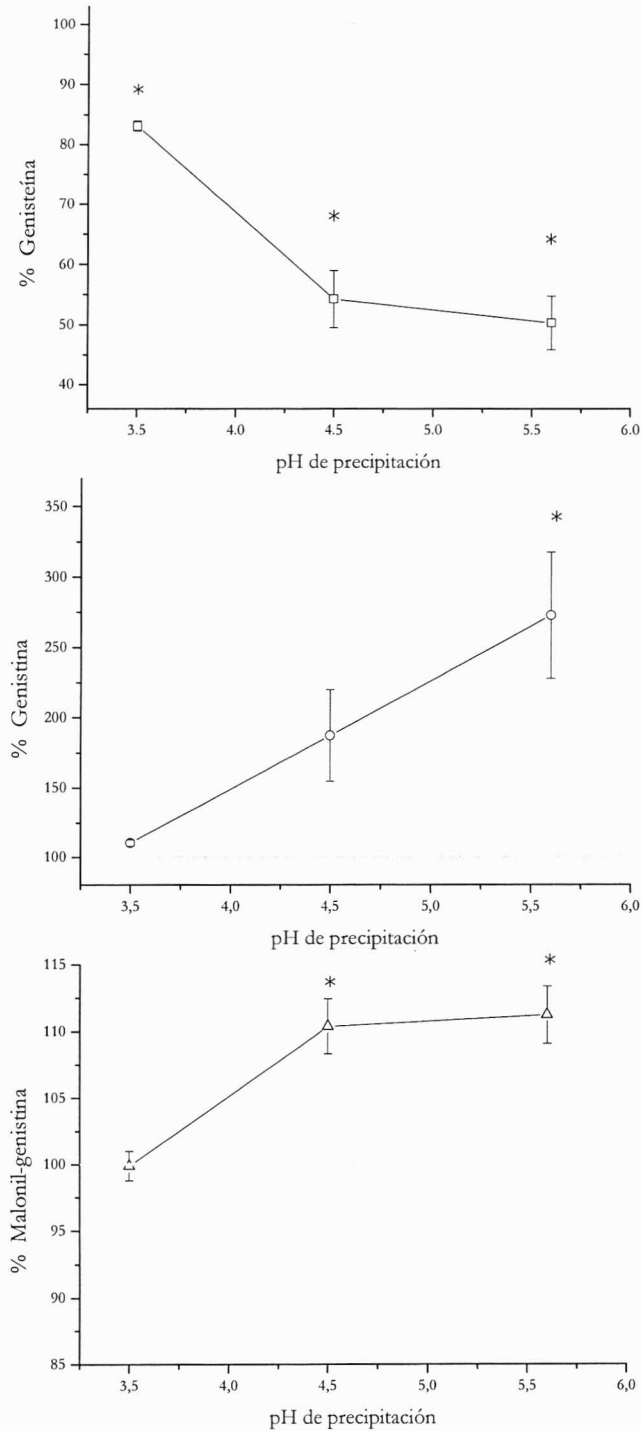


Figura IV.7. Contenido de isoflavonas en aislados proteicos obtenidos precipitando las proteínas a temperatura ambiente o a 4 °C. Los valores se expresan como el porcentaje obtenido a 4 °C respecto de la condición de temperatura ambiente. a) Genisteína. b) Genistina. c) Malonil-genistina. Los valores señalados con \* son los significativamente distintos de los del procedimiento básico y de interés para la discusión de los resultados.

como consecuencia de la mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa. A pH 3,5 el efecto fue menor para el contenido de aglucona en los aislados precipitados a temperatura ambiente o a 4

°C. En este caso se podría postular que a este pH la temperatura no afecta en el mismo grado la interacción proteína-isoflavona o que la actividad enzimática es baja formándose una reducida cantidad de aglucona a pesar del tiempo de precipitación prolongado. En cualquiera de las dos temperaturas ensayadas el contenido de aglucona aumentó con el incremento del pH de precipitación, a pesar de que el contenido de Genisteína total disminuyó.

El análisis de los valores de Genistina (figura 7, panel b) indicó que a cualquier pH de precipitación su contenido fue mayor a 4 °C, no pudiéndose discriminar el efecto de la temperatura sobre la interacción proteína-isoflavona del correspondiente a la posible actividad enzimática. Cabe recordar que la  $\beta$ -glucosidasa es menos activa a 4 °C que a 20 °C lo que redundaría en una mayor cantidad de Genistina en el sistema a la menor temperatura.

Malonil-genistina no es afectada por la actividad enzimática por no ser esta molécula sustrato de la  $\beta$ -glucosidasa, de manera que se puede suponer que la temperatura no afecta la cantidad disponible de esta isoflavona para interactuar con las proteínas u otros componentes presentes en la dispersión. A cualquiera de las temperaturas ensayadas se encontró que el contenido de Malonil-genistina fue mayor cuanto más próximo o igual a pH 3,5 fue llevada a cabo la precipitación de proteínas, (valores no mostrados) en coincidencia con los resultados de las páginas 51 - 53. La disminución de la temperatura hasta 4 °C provocó un aumento significativo del contenido de Malonil-genistina en los aislados precipitados a pH 4,5 y 5,6 (figura IV.7, panel c). Este aumento fue de un  $10,39 \pm 2,06$  % para pH 4,5 y de  $11,24 \pm 2,14$  % para pH 5,6 ( $p < 0,05$ ). A pH 3,5, no se observaron diferencias en el contenido de Malonil-genistina al variar la temperatura a la que se llevó a cabo la precipitación proteica. Estos resultados sugieren que la interacción proteína-Malonil-genistina es más intensa a baja temperatura cuando el sistema se encuentra a pHs 4,5 y 5,6. Este comportamiento es el que muestran las interacciones de tipo entálpico, como son el puente de hidrógeno y la interacción iónica, por lo que estos resultados sostienen la idea de que Malonil-genistina y las proteínas se asociarían mediante esta clase de enlaces a pHs 4,5 y 5,6 y posiblemente mediante otro tipo de interacción a pH 3,5.

### IV.3.3. Modificaciones combinadas de variables de proceso de la preparación de aislados proteicos

#### IV.3.3.1. Extracción a pH 8,0 u 11,0, precipitación a pH 3,5 o 4,5 de proteínas

Con el fin de evaluar la posible interacción entre el pH de extracción y el de precipitación se prepararon aislados combinando las condiciones de extracción y precipitación en las que se habían logrado los valores máximos de contenido de Genisteína total.

Estos ensayos se realizaron con las tres muestras de harina estudiadas y en todos los casos la condición de mayor contenido de Genisteína total fue la de extracción a pH 8,0 y precipitación a pH 3,5, no encontrándose interacción favorable entre el aumento del pH de extracción y la disminución del pH de precipitación. Los valores encontrados para una harina que contenía  $947,89 \pm 14,17 \mu\text{g}$  de Genisteína total / g se muestran en la tabla IV.4.

Tabla IV.4. Contenido de Genisteína total en APS obtenidos en diferentes condiciones de extracción y precipitación proteica ( $\mu\text{g}$  Genisteína total / g APS)

pH de extracción	pH de precipitación	
	3,5	4,5
8,0	$1419,95 \pm 10,28$	$1209,50 \pm 15,54$
11,0	$1308,35 \pm 24,37$	$1300,15 \pm 10,88$

El estado conformacional de las proteínas de soja es dependiente del pH al que se encuentran, por lo tanto el tratamiento a pHs altos como 10,0 u 11,0 o bajos como 3,0 o 3,5, empleados en las etapas de extracción o precipitación de las proteínas, podría tener un efecto desnaturizante irreversible. Para evaluar este posible efecto se realizaron calorimetrías diferenciales de barrido a aislados obtenidos extrayendo las proteínas a pH 11,0 y precipitándolas a pH 3,5 y se compararon los valores de  $\Delta H$  correspondientes a los aislados obtenidos en las condiciones empleadas en el procedimiento básico (extracción a pH 8,0 y precipitación a pH 4,5). Para estos últimos el valor de  $\Delta H$  de desnaturización fue  $17,02 \pm 0,53 \text{ mJ/mg}$  en tanto que para los obtenidos en las condiciones extremas de

pH de extracción y precipitación fue de  $16,43 \pm 0,41$  mJ/mg. Estos resultados sugieren que la permanencia de las proteínas a pH alcalino durante la etapa de extracción (90 minutos) o ácido durante la de precipitación (15 minutos) no produce una desnaturalización irreversible. Probablemente los efectos desnaturalizantes de los pHs extremos fueron revertidos durante la resuspensión a pH 7,4. Cabe recordar que los aislados producidos en cualquier condición se resuspendieron siempre a pH 7,4 y que todas las calorimetrías se llevaron a cabo a dicho pH. Otro aspecto a tener en cuenta es el tiempo necesario para lograr una desnaturalización irreversible. Wagner y col (2000) informaron que el tratamiento de 60 minutos a pH 3,5 y temperatura ambiente sobre un aislado proteico de soja conduce a una desnaturalización del 29 %. En los ensayos realizados por nosotros las proteínas fueron mantenidas a los pHs de precipitación durante 15 minutos, tiempo al que habría que adicionar los correspondientes a la centrifugación y lavado del precipitado que en suma es menor a una hora. Estos resultados indican que los cambios de pH en las condiciones en que fueron probados en este trabajo no afectan el estado conformacional de las proteínas presentes en el producto final.

#### IV.3.3.2. *Cambio en la temperatura y el pH de precipitación proteica con macerado previo de harina a pH 6,5 durante 8 horas*

Para dilucidar si el efecto de la temperatura sobre el contenido de agluconas y  $\beta$ -glucósidos, analizado previamente (página 56), era debido a una razón de afinidad o de la cantidad disponible de aglucona, se prepararon aislados a partir de harina previamente macerada a pH 6,5 durante 10 horas a temperatura ambiente. Este tratamiento permitiría, en principio, convertir un alto porcentaje de Genistina en Genisteína y de este modo se podría estudiar el efecto de la temperatura sin la interferencia de la acción de  $\beta$ -glucosidasa. En estos ensayos la aglucona, formada durante la etapa de maceración, estaría presente durante todo el proceso de precipitación de proteínas.

En estas condiciones se observó que la disminución de la temperatura durante la etapa de precipitación de las proteínas no afectó de manera significativa el contenido de Genisteína total del producto final. Visto este resultado, se analizó el efecto de la temperatura durante la precipitación proteica en forma individual para Genisteína y para Malonil-genistina. El contenido de aglucona en APS precipitados a 4 °C y pHs 3,5 o 5,6, decreció un  $14,93 \pm 0,79$  % y un  $12,42 \pm 2,53$  % respectivamente ( $p < 0,05$ ) (figura IV.8, panel a), tomando como referencia el valor obtenido al precipitar a temperatura ambiente.



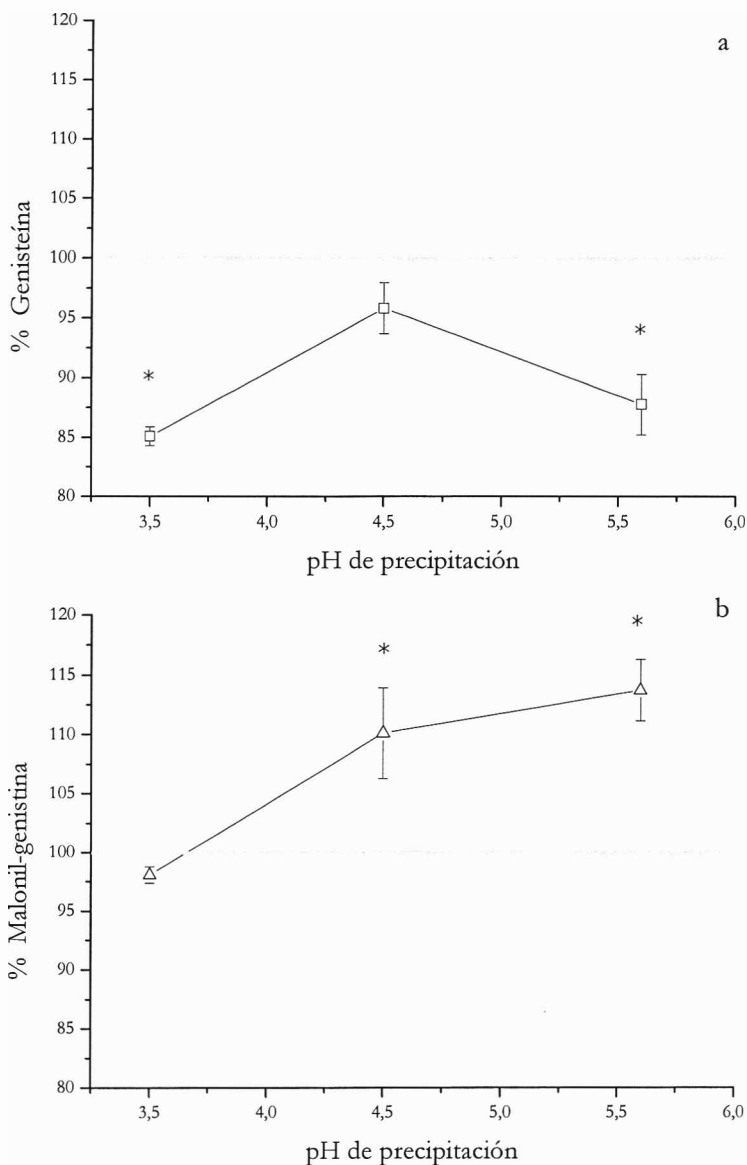


Figura IV.8. Contenido de isoflavonas en aislados proteicos obtenidos precipitando las proteínas a temperatura ambiente o a 4 °C. Previamente a la extracción proteica la harina había sido macerada en agua a pH 6,5. Los valores se expresan como el porcentaje obtenido a 4 °C respecto de la condición de temperatura ambiente. a) Genisteína. b) Malonil-genistina. Los valores señalados con \* son los significativamente distintos de los de la condición de temperatura ambiente.

En el caso en que la precipitación de proteínas se realizó a pH 4,5 no se encontraron diferencias significativas respecto a la temperatura. En el caso de Malonil-genistina se encontró una tendencia opuesta. El contenido de Malonil-genistina en APS (figura IV.8, panel b), precipitando a pH 4,5 y 5,6, aumentó en ambos cuando la temperatura de precipitación decreció a 4 °C.

Estos resultados muestran un comportamiento diferencial para la aglucona y el malonil-éster. El hecho de que la disminución de la temperatura durante la etapa de

precipitación proteica induzca una menor asociación entre aglucona y proteínas sería compatible con la existencia de una interacción hidrofóbica entre ellas.

Finalmente se puede concluir que el efecto de la temperatura de precipitación sobre el contenido de isoflavonas en los aislados dependerá del patrón de conjugación de éstas, sin embargo este efecto no sería muy importante en el contenido de Genisteína total dado que las distintas formas tienen comportamientos opuestos que tienden a compensarse.

#### IV. 4. Isoflavonas en $\beta$ -conglucina y glicinina

##### IV.4.1. Contenido de isoflavonas en $\beta$ -conglucina y glicinina

$\beta$ -conglucina y glicinina fueron parcialmente purificadas a partir de tres harinas distintas mediante la técnica descrita por Nagano y col., (1992). El contenido de Genisteína encontrado en la fracción glicinina fue mayor que el correspondiente a  $\beta$ -conglucina independientemente de la harina de partida, obteniéndose valores de Genisteína total  $3,20 \pm 0,06$  veces mayores en glicinina. (tabla IV.5).

Tabla IV.5. Contenido de Genisteína en las globulinas purificadas y en la harina de partida para las tres preparaciones. Los valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de Genisteína total / g de producto.

partida	$\beta$ -conglucina	glicinina	harina
2001	$409,76 \pm 27,45$	$1269,6 \pm 67,14$	$1156,3 \pm 11,6$
2002	$327,05 \pm 20,90$	$1051,1 \pm 58,90$	$833,0 \pm 8,9$
2004	$252,57 \pm 16,72$	$833,18 \pm 18,05$	$947,2 \pm 14,2$

Cuando se utiliza el método de Nagano y col., glicinina se obtiene a las 30 horas de iniciada la separación, mientras que  $\beta$ -conglucina requiere de aproximadamente 24 horas adicionales. Además la relación sólidos:solución acuosa a la que se enfrentan las proteínas es diferente. Según Jackson y col., (2002), las isoflavonas pueden perderse en las etapas de remojo o macerado que se requieren cuando se procesa el grano de soja. Teniendo en cuenta esta última aseveración la diferencia en el contenido de isoflavonas detectado entre las dos globulinas de reserva podría deberse al hecho que  $\beta$ -conglucina se lavara de isoflavonas por permanecer más tiempo en contacto con soluciones acuosas.

Para evaluar el efecto de estas variables se realizó una modificación del protocolo original de Nagano y col., en el que se mantuvieron iguales los tiempos de exposición y la relación masa de sólido:volumen de solución para ambas globulinas. En estas condiciones se volvieron a encontrar diferencias en el contenido de isoflavonas, observándose que glicinina contenía el doble ( $1,9 \pm 0,2$  veces,  $p < 0,05$ ) del contenido de Genisteína total que  $\beta$ -conglucina. A partir de este resultado se deshechó la hipótesis que basaba, en forma exclusiva, la diferencia de contenido de isoflavonas en ambas fracciones de globulinas en la pérdida de éstas en las soluciones acuosas.

Alternativamente se podría postular que las isoflavonas de la serie de Genisteína se asocian más fácilmente a la proteína insoluble. De ser esto cierto, el hecho de que glicinina se mantuviera insoluble durante un largo tiempo durante el procesamiento (12 horas a pH 6,4 a 4 °C mientras que  $\beta$ -conglucina permanece en solución) favorecería la transferencia de la Genisteína de la solución a la fracción insoluble a pesar de que el pH 6,4 no es el más favorable para la interacción proteína-isoflavona. Esta hipótesis está basada en los resultados obtenidos en los experimentos en que se modificaba el tiempo de precipitación de las proteínas en la obtención de APS (página 54).

Otro factor que podría afectar la asociación entre glicinina e isoflavonas es la temperatura, dado que mientras glicinina se precipita a 4 °C,  $\beta$ -conglucina lo hace a temperatura ambiente. Para verificar o no esta suposición se modificó el proceso de purificación de globulinas: el primer paso de precipitación de glicinina a pH 6,4 se llevó a cabo a temperatura ambiente y a 4 °C, también se conservó el producto del segundo paso de precipitación a pH 5,0 que se corresponde con una mezcla de glicinina y  $\beta$ -conglucina, para su posterior análisis. En caso de que las isoflavonas se asociaran en mayor proporción a glicinina a baja temperatura y fueran secuestradas del medio fluido, a temperatura ambiente quedarían disponibles para poder coprecipitar con la mezcla precipitada a pH 5,0 y con  $\beta$ -conglucina. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura IV.9. Se observó que la temperatura de precipitación afectó el contenido de Genisteína total en glicinina, a 4 °C se obtuvieron valores mayores que a temperatura ambiente ( $11,5 \pm 1,7$  % de diferencia,  $p < 0,05$ ). También se vio afectado el contenido de Genisteína total en la mezcla que se obtuvo en el segundo paso, si bien esta precipitación se realizó a temperatura ambiente en los dos ensayos, la mezcla de la preparación que siempre permaneció a temperatura ambiente presentó un mayor contenido de Genisteína total que la que se había mantenido a 4 °C en el primer paso de precipitación. Este resultado indica que la Genisteína que no se asoció a glicinina a temperatura ambiente fue

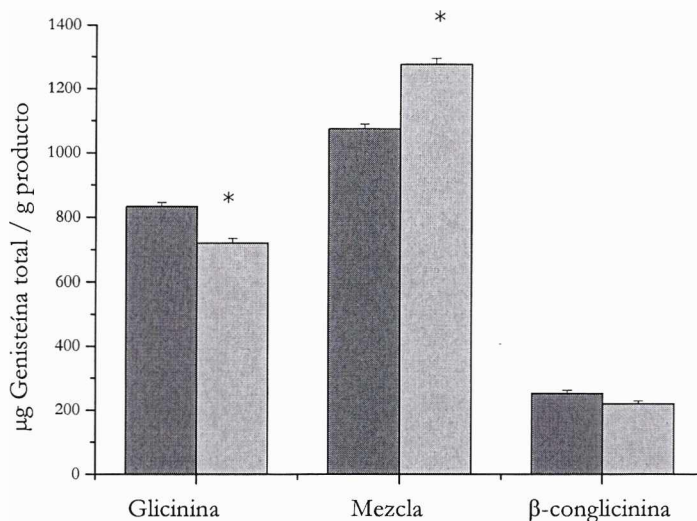


Figura IV.9. Contenido de Genisteína total en glicinina, en la mezcla de proteínas obtenida en la segunda precipitación y en β-conglicinina. La precipitación inicial, en la que se obtuvo glicinina, se realizó a 4 °C (■) o a temperatura ambiente (□). Los valores señalados con \* son significativamente distintos a los obtenidos realizando la primera precipitación a 4 °C.

retenida por la mezcla obtenida a pH 5,0. Los valores de contenido de Genisteína total en β-conglicinina no se vieron afectados significativamente.

Una posible explicación del fenómeno que induce el mayor contenido de isoflavonas en la glicinina obtenida a 4 °C podría basarse en los resultados de precipitación de APS realizada a 4 °C y temperatura ambiente (páginas 54 - 56). En esos experimentos se encontró una mayor asociación proteínas - malonil-glucósidos a 4 °C y proteínas-agluconas a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que el contenido de malonil-glucósido en la harina utilizada representó el  $60,0 \pm 0,1$  % de la serie de Genisteína, sería lógico pensar que la baja temperatura favoreciera su asociación con glicinina, aumentando su contenido de Genisteína total, si bien el cambio que produce esta variable no alcanza para justificar la magnitud de la diferencia de contenido de isoflavonas entre ambas proteínas de almacenamiento.

Se puede concluir que las variables de proceso de separación de las proteínas de almacenamiento -temperatura de precipitación y diferencias en los volúmenes y tiempos de exposición a fases acuosas- sumadas a las diferencias en la estructura de estas proteínas, que podrían determinar una mayor afinidad isoflavonas-glicinina, explican las diferencias en el contenido de isoflavonas detectado.

IV.4.2. Disociación isoflavonas -  $\beta$ -conglucina e isoflavonas - glicina

Cuando se analizó la concentración de isoflavonas de ultrafiltrados provenientes de las dispersiones acuosas de ambas globulinas de reserva se encontró que el 60% de las isoflavonas presentes originalmente se disoció. Los resultados se expresaron como la fracción de las isoflavonas encontradas en el permeado respecto de la cantidad total presente en la globulina.

$\beta$ -conglucina y glicina liberaron las distintas isoflavonas de la serie Genisteína en forma diferencial de acuerdo a lo mostrado en el figura IV.10 Se observó que a cualquier pH  $\beta$ -conglucina liberó un porcentaje mayor de las isoflavonas que glicina, lo que sugiere una mayor interacción isoflavonas – glicina, en concordancia con lo discutido previamente (pagina 61).

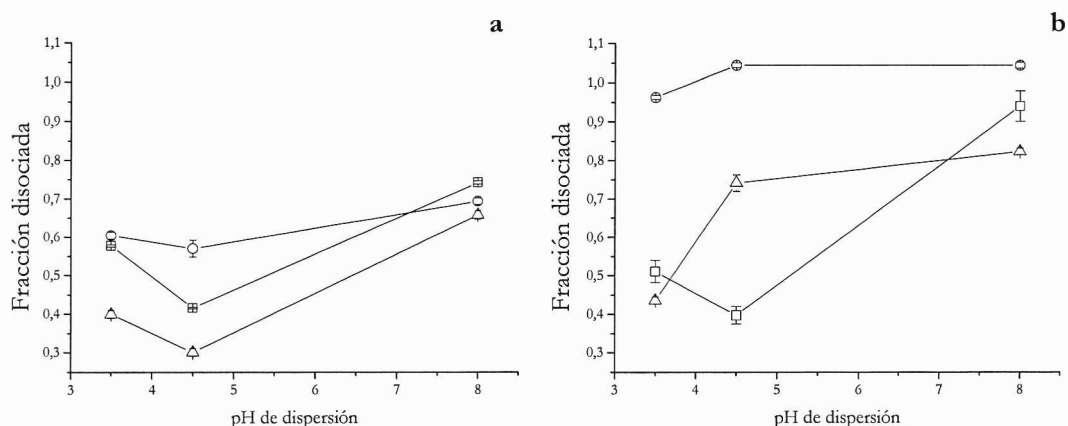


Figura IV.10. Disociación isoflavonas-proteínas. Se muestra la fracción (con respecto a la cantidad de isoflavonas contenidas inicialmente por las globulinas) permeada a cada pH. a) glicina. b)  $\beta$ -conglucina. Genisteína (□). Genistina (○). Malonil-genistina (△).

El hecho que a pH 3,5 ambas globulinas mostraran una mayor afinidad por el malonil-glucósido explicaría el alto contenido de Genisteína total encontrado en los aislados obtenidos por extracción de las proteínas a pH 8,0 y precipitación a pH 3,5. En esta condición se encontró que la forma mayoritaria de la serie de Genisteína fue Malonil-genistina. Este fenómeno también explicaría la ausencia de interacción entre el aumento del pH de extracción proteica (11,0) y la disminución del de precipitación (3,5) (página 57). En esta condición experimental, gran parte de los malonil-ésteres se transformaron en  $\beta$ -glucósidos, transformando el patrón de conjugación en uno enriquecido en Genistina - que parece tener poca afinidad por  $\beta$ -conglucina a pH 3,5 - y empobrecido en Malonil-genistina - que tendría alta afinidad tanto por  $\beta$ -conglucina como por glicina.

## IV.5. Caracterización de la interacción isoflavonas - proteínas

### IV.5.1. Cambios en las condiciones de extracción de isoflavonas de productos derivados de soja

A fin de analizar las interacciones entre las isoflavonas y los componentes de la soja se llevó a cabo la extracción de isoflavonas a partir de aislados proteicos y otros productos derivados de soja en distintas condiciones de pH, de polaridad del solvente y del tiempo de exposición al solvente.

#### IV.5.1.1. Cambios en el pH durante la extracción hidroalcohólica de isoflavonas

Se utilizaron los aislados proteicos que habían sido resuspendidos a pH 1,9; 2,5; 3,0; 3,25; 3,5; 4,0; 5,6; 7,4 y 8,4 antes de proceder a su congelación y liofilización. (página 21). Las isoflavonas se extrajeron a partir de dichos aislados con etanol:agua 60:40, durante 12 horas a temperatura ambiente y luego se determinó su concentración por HPLC como fuera descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.11 Cuando se analizó la concentración de isoflavonas en los extractos hidroalcohólicos provenientes de los aislados se encontraron dos patrones de respuesta al tratamiento según se consideraran las formas conjugadas o la aglucona. El nivel de extracción de Genisteína no fue afectado por el valor del pH de resuspensión del APS (figura IV.11, panel a). Los niveles de extracción de Genistina y Malonil-genistina mostraron una dependencia con el pH de resuspensión del aislado, los valores mínimos fueron detectados entre pHs 3,25 y 3,5 y los máximos a pHs 7,4 y 8,4 ( $p < 0,05$ ) (paneles b y c). Las diferencias relativas entre los máximos y los mínimos fueron  $20,2 \pm 1,0$  % para Genistina y  $35,4 \pm 0,6$  % para Malonil-genistina con respecto a los mínimos.

Estos resultados sugieren que la interacción entre los componentes del aislado, principalmente proteínas, y las isoflavonas es de distinta naturaleza para las formas conjugadas y la aglucona. En el caso de las formas conjugadas esta asociación sería dependiente del pH de resuspensión y sería máxima a pHs entre 3,25 y 3,5, lo que explicaría un menor nivel de extracción de isoflavonas en este rango. Esta hipótesis es concordante con los resultados hallados al modificar el pH de precipitación proteica durante la preparación de aislados (discutido en la página 52), caso en que se encontró un mayor contenido de isoflavonas al precipitar a pH 3,5, dado por un incremento de las

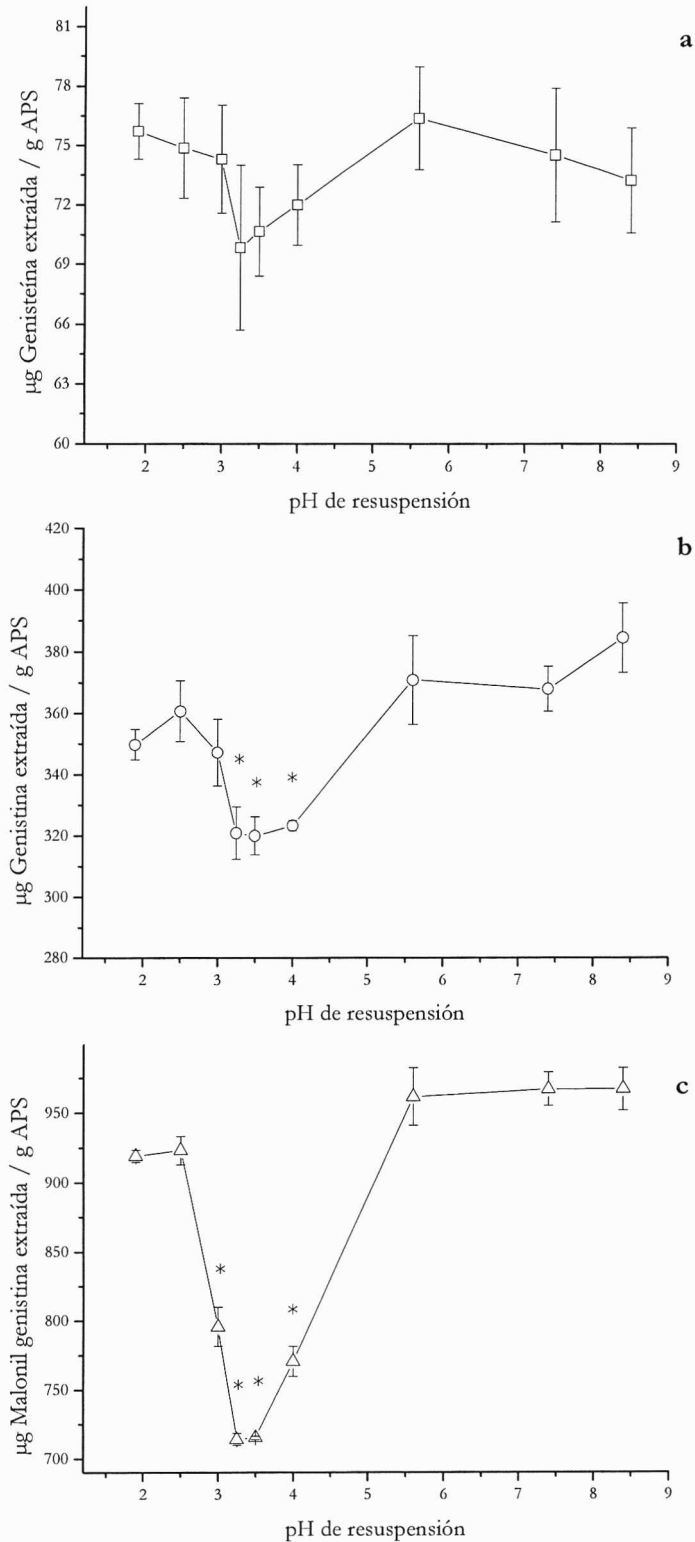


Figura IV.11.Extracción hidroalcohólica de isoflavonas de aislados proteicos llevada a cabo en distintos pHs. a) Genisteína. b) Genistina. c) Malonil-genistina. Los valores señalados con \* son significativamente distintos de los encontrados a pHs 7,4 y 8,4.

formas conjugadas, lo que nos permitió sugerir que ese aumento se debía a una mayor interacción proteína-isoflavona.

El hecho de que la aglucona no sea liberada por las proteínas en mayor extensión a los pHs más altos ensayados - comparando con los otros pHs - en principio parecería contradecir los resultados encontrados cuando  $\beta$ -conglucina y glicinina se resuspendían a pHs entre 3,5 y 8,0 y las isoflavonas se disociaban en agua (página 63). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en presencia de 60 % de etanol las proteínas se encuentran insolubles a cualquier pH, en tanto que en agua están insolubles a pHs 3,5 y 4,5 y solubles a pH 8,0. Por consiguiente esto sugiere que la aglucona es más afín por la proteína cuando esta se encuentra insoluble.

Kao y col., (2004) analizaron el efecto de la variación de la relación agua:poroto de soja en la preparación de tofu sobre el contenido de isoflavonas. Estos autores encontraron que el aumento de la proporción de agua no afectaba la cantidad de agluconas extraídas en la leche de soja mientras que sí aumentaba la cantidad de formas conjugadas. Ellos también observaron que una mayor cantidad de isoflavonas conjugadas quedaba retenida en el tofu cuanto mayor era la relación agua:poroto durante la etapa de extracción. En el caso de las agluconas se observó el comportamiento opuesto. Estos autores postularon la existencia de una interacción hidrofóbica entre agluconas y proteínas. Si bien en este trabajo no se analizó la naturaleza de la asociación entre las globulinas de almacenamiento de la soja y las isoflavonas conjugadas, surge claramente que las agluconas y las formas conjugadas se comportaron en relación con las proteínas de forma diferencial.

El cambio en el grado de interacción proteínas-isoflavonas a los distintos pHs de resuspensión podría deberse a modificaciones en la estructura proteica debidas a la  $[H^+]$ . En este sentido, Lakemond y col., (2000) mostraron que la variación del pH desde 7,6 hasta 3,8 se vio acompañada por un cambio en la estructura de glicinina, la cual pasó de la forma hexamérica a una trimérica como consecuencia de modificaciones en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. En particular estos autores detectaron cambios en el entorno local de los triptofanos de la glicinina hacia un entorno más apolar y una desestabilización del entorno de las tirosinas. En otro trabajo Lakemond y col., (2000) estudiaron el efecto de pH (pHs 7,6; 5,2 y 3,8) en la desnaturalización térmica de glicinina, en este caso se demostró que al pH más ácido se producía un mayor grado de desnaturalización en las tres fuerzas iónicas ensayadas. Estos resultados muestran que las proteínas de soja poseen una conformación diferente a pH 5,2 y 3,8, pHs muy cercanos a los que afectan, de acuerdo a nuestro trabajo, la asociación proteínas-isoflavonas. Las variaciones en el plegamiento de la molécula, en este caso de glicinina, podrían exponer



regiones - posiblemente hidrofóbicas - que permitieran una mayor asociación con las formas conjugadas.

Kim y col., (2004) encontraron que la desnaturalización de glicinina comienza a pH 3,75, encontrándose completamente desnaturalizada por debajo de pH 3,0.

La desnaturalización proteica en general se encuentra acompañada por un desplegamiento de los polipéptidos que conforman la proteína. Se puede suponer que como consecuencia de este desplegamiento se expone una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos originalmente escondidos del agua, los cuales serían accesibles a las isoflavonas. En este caso se podría especular con que las formas conjugadas estarían asociadas a las proteínas por medio de enlaces tipo puente de hidrógeno o uniones electrostáticas. Cuando la proteína se despliega y expone al medio polar más sitios hidrofóbicos se produciría un desplazamiento de las isoflavonas conjugadas hacia esas posiciones. La ausencia de un efecto del pH sobre la extracción de la aglucona podría explicarse si ésta ya se encontrara interactuando con regiones hidrofóbicas de la superficie proteica, aún en estado nativo.

Estos resultados, sumados a los obtenidos en los correspondientes a los ensayos de cambio en el pH y temperatura de precipitación (página 56), en los que a pH 3,5 no se encontraba efecto de la temperatura sobre la asociación Malonil-genistina-proteínas, pero sí a pHs 4,5 y 5,6 sugieren que las formas conjugadas, o al menos el malonil-éster pasaría de establecer una asociación de tipo entálpica - posiblemente a través de puente de hidrógeno - a pHs 4,5 y 5,6, a una de carácter hidrofóbico cuando las proteínas se encuentran parcialmente desplegadas a pH 3,5.

Los resultados de los ensayos realizados indican claramente que el efecto del pH de resuspensión de APS en la interacción proteínas-Genisteína es un aspecto importante a considerar no sólo en la preparación de alimentos derivados de soja, sino también en la cuantificación de las isoflavonas presentes en un alimento ya preparado. Debería tenerse en cuenta que en aquellos alimentos que presenten pH ácido (3,5 – 3,25), la extracción de isoflavonas estaría desfavorecida por la mayor interacción entre ellas y las proteínas que lleva a una mayor retención de las isoflavonas por parte de la matriz del producto.

#### IV.5.1.2. *Cambios en la composición del solvente y en el tiempo de exposición durante la extracción hidroalcohólica*

Los solventes se caracterizan por una serie de propiedades denominadas solvatrómicas, entre ellas se pueden mencionar la capacidad de ceder H para formar

puentes de H ( $\alpha$ ), la capacidad de aceptar H en estas uniones ( $\beta$ ) y la permitividad eléctrica ( $\epsilon$ ). Se asume que en solventes formados por mezclas de dos compuestos se obtienen propiedades con niveles intermedios entre los valores individuales.

En este ensayo se utilizaron mezclas de etanol:agua en tres proporciones (40:60; 60:40 y 80:20) y dos tiempos de exposición al solvente (30 minutos y 12 horas). Luego de estos períodos las dispersiones se centrifugaron en las condiciones descriptas anteriormente y se analizaron por HPLC.

La exposición de las proteínas de soja a soluciones de etanol produce modificaciones en su estructura que podrían afectar la asociación entre ellas y las isoflavonas. En este caso la insolubilización de las proteínas se produce por disminución de la constante dieléctrica que afecta uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas que estabilizan la proteína (Creighton, 1993).

#### IV.5.1.2.1. *Efectos sobre el aislado proteico*

En el presente trabajo se encontró que el tiempo de exposición al solvente empleado en la extracción de isoflavonas de los APS afectó su nivel de extracción. Para 30 minutos de extracción se obtuvo, promediando los contenidos obtenidos con los tres solventes utilizados, el  $68,7 \pm 10,7$  % de la Genisteína total extraída luego de 12 horas de exposición al solvente. En el caso del solvente más polar (etanol:agua 40:60) la diferencia en el contenido de isoflavonas extraídas durante los dos tiempos de exposición al solvente fue menor ( $79,9 \pm 2,2$  %). Para el solvente menos polar el efecto del tiempo de extracción fue mayor; al cabo de 30 minutos sólo se alcanzó a extraer el  $53,4 \pm 1,5$  % de lo que se extraía luego de 12 horas. Estas diferencias podrían deberse al requerimiento de un cierto tiempo para desestabilizar la interacción isoflavona-proteína y / o solubilizar las isoflavonas.

Cuando se extrajeron las isoflavonas de los aislados proteicos con solventes de distinta polaridad por el término de 12 horas se observó que los solventes más polares fueron efectivos, logrando extraer prácticamente la totalidad de las tres formas de Genisteína analizadas (figura IV.12, paneles a y b). El menor valor encontrado fue para la aglucona con el solvente más polar y su extracción fue del  $91,8 \pm 2,4$  % respecto al solvente que contenía 60 % de etanol (paneles a y b). El solvente de mínima polaridad ensayado, etanol:agua 80:20, resultó poco efectivo: logró extraer el 100 % de la alglucona pero sólo el  $77,1 \pm 2,4$  % de las formas conjugadas presentes en los APS (panel c). Estos resultados son similares a los encontrados por Lin y Giusti (2005), quienes utilizaron

como solventes de extracción de isoflavonas mezclas de acetonitrilo y agua en distintas proporciones y como sustrato emplearon porotos de soja. Estos autores mostraron que el solvente más polar fue el que logró extraer un mayor contenido de las formas conjugadas de las isoflavonas.

Igual concentración de etanol generó una respuesta distinta para las formas conjugadas y agluconas lo cual podría deberse no sólo a las diferencias de polaridad de las isoflavonas sino también a los posibles cambios que el etanol genere en la estructura de las proteínas. Tsumura y col., (2004) encontraron que a pH 2,0,  $\beta_3$ -conglucina experimenta una pérdida de estructura en hoja plegada a favor de la formación de alfa hélice así como la formación de agregados ante el cambio en la concentración de etanol de 40 a 70 %. Estos datos apoyan la idea original que las modificaciones de las proteínas presentes en los APS podrían ser la causa de la mayor o menor retención de los fitoquímicos encontradas en el aislado cuando se modifica el porcentaje de etanol en el medio de extracción.

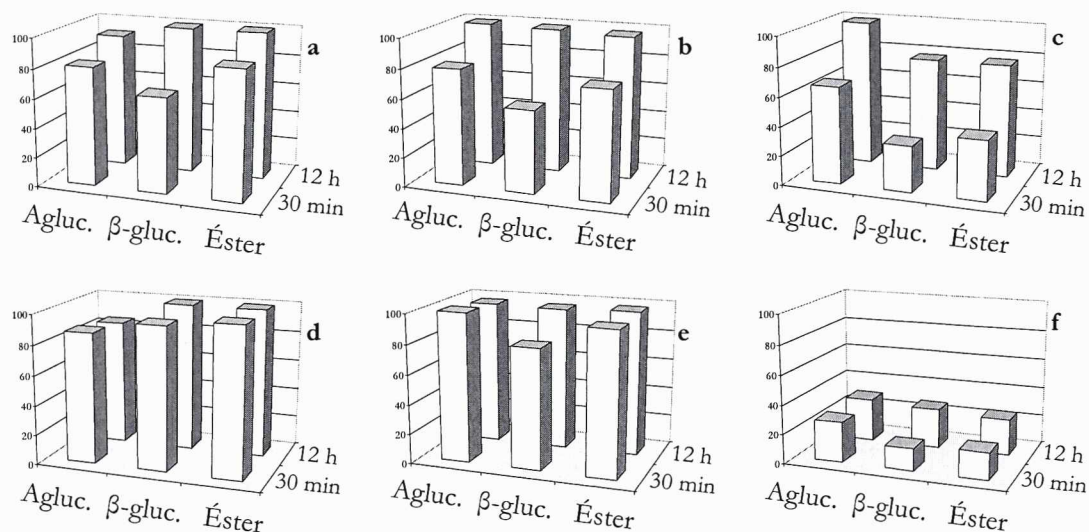


Figura IV. 12. Porcentaje de extracción de isoflavonas de APS con etanol:agua 40:60 (a), 60:40 (b), 80:20 (c) y de S con etanol:agua 40:60 (d), 60:40 (e), 80:20 (f) a temperatura ambiente y en 30 minutos o 12 horas de exposición.

#### IV.5.1.2.2. Efectos sobre el suero y los productos de composición intermedia

El análisis de los resultados en el resto de los productos estudiados, suero y productos de composición proteica intermedia entre las correspondiente al S y al APS, indicó que el efecto del tiempo de extracción de las isoflavonas no fue el mismo para todos los casos. Al cabo de 30 minutos se solubilizó el  $92,4 \pm 2,9$  % de las isoflavonas

que se alcanzaban a extraer del S en 12 horas, mientras que en el caso del APS, este porcentaje fue igual a  $68,7 \pm 10,7$  % de su extracción a 12 horas. Estos resultados indicarían que la interacción establecida por las isoflavonas con los componentes del aislado es más intensa que aquella establecida con los componentes del suero, requiriendo así un mayor tiempo para su extracción. También podría postularse que en el S Genistina y Malonil-genistina se encuentran libres. El contenido de Genisteína en S, la más apolar de las isoflavonas ensayadas, fue muy bajo respecto al correspondiente a las otras formas del patrón de conjugación. Este hecho se podría explicar por su escasa solubilidad en agua y la ausencia de proteínas o moléculas en este subproducto que tuvieran afinidad por ella.

Cuando las isoflavonas presentes en el suero fueron extraídas con los solventes de diferente polaridad se observó que el solvente menos polar no fue capaz de solubilizarlas completamente (figura IV.12 panel f). En este caso la diferencia de extracción lograda con los distintos solventes ensayados fue mucho mayor que para el caso de los APS discutido previamente. El solvente menos polar, etanol:agua 80:20, logró extraer sólo el  $20,1 \pm 3,1$  % de las moléculas de Genisteína total extraídas con el solvente de relación etanol:agua 60:40. Este hallazgo marca una diferencia con lo observado para el aislado, en el que a pesar que la extracción con el solvente menos polar no era óptima, superaba el  $87,7 \pm 3,2$  % al cabo de 12 horas de exposición. Estas diferencias entre APS y S indicarían que el efecto de la polaridad del solvente de extracción de las isoflavonas estaría asociado a cambios en la competencia entre solvente y proteína más que en la solubilidad de las isoflavonas.

El análisis de los resultados obtenidos con productos de composición proteica intermedia entre S y APS mostró que el comportamiento de los mismos respondía al de su composición (resultados no mostrados).

Los resultados discutidos muestran que la polaridad del solvente utilizado para extraer las isoflavonas es un factor importante en la valoración del contenido de estas sustancias en distintos productos derivados de soja y confirman el hecho que la relación etanol:agua 60:40 es la óptima entre las estudiadas para recuperar la mayor proporción de isoflavonas de la serie de Genisteína.

IV.5.2. *Precipitación y solubilización de proteínas*

Con el objeto de evaluar el efecto de la solubilidad de las proteínas en la interacción con las isoflavonas se realizó una serie de ensayos en los que luego de su extracción, las proteínas fueron precipitadas y se volvieron a solubilizar parcialmente a diferentes pHs. Posteriormente, las proteínas solubles se separaron de las insolubles para analizar la distribución de isoflavonas de la serie de Genisteína en ambas fracciones. Se eligió como pH de precipitación 3,5 dado que en esta condición se había detectado la mayor interacción para las formas conjugadas. Se utilizaron los pHs 5,6; 6,0 y 6,3 para la solubilización dado que en dichas condiciones pueden coexistir proteínas solubles e insolubles y la interacción entre formas de isoflavonas conjugadas y proteínas no parecía ser tan intensa. Se procedió a acidificar (pH 3,5) y alcalinizar parcialmente (pHs 5,6; 6,0 o 6,3) la dispersión previamente a la separación de las fases por centrifugación para evaluar la reversibilidad de la asociación proteínas-isoflavonas de la serie Genisteína. De ocurrir este fenómeno el mismo se reflejaría en un desplazamiento de las isoflavonas desde el precipitado disperso a la fase acuosa continua.

Como se detalla en Materiales y Métodos (página 27), se obtuvieron dos productos AP, a partir de las proteínas insolubles y AS, a partir de las proteínas solubles. (figura IV.13).

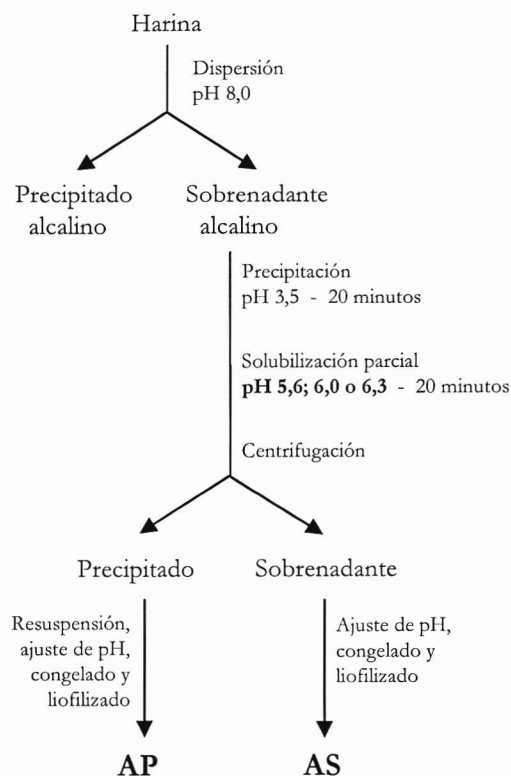


Figura IV.13. Ensayo de precipitación y solubilización de proteínas.

El contenido proteico en AP se mantuvo constante ( $75,84 \pm 1,14$  %) a los tres pHs de solubilización, mientras que para AS se verificó un aumento del contenido de las proteínas proporcional al aumento del mismo desde  $25,90 \pm 0,70$  hasta  $38,50 \pm 2,01$  % ( $p < 0,05$ ) (tabla IV.6). Este último aumento se debe a la mayor solubilización de las proteínas de reserva por su alejamiento del punto isoeléctrico.

Tabla IV.6. Porcentaje de proteínas (en base húmeda) en los AP y AS obtenidos en los distintos pHs de solubilización.

	AP	AS
pH 5,6	$78,66 \pm 1,33$	$25,91 \pm 1,22$
pH 6,0	$74,42 \pm 1,26$	$31,64 \pm 0,55$
pH 6,3	$74,44 \pm 0,59$	$38,51 \pm 2,02$

El contenido total de isoflavonas en AP y AS se vio afectado por el pH de solubilización, el AS se enriqueció en Genisteína total a medida que aumentó el pH, mientras que AP perdió isoflavonas. Este resultado surge de la suma de los valores correspondientes a cada isoflavona de la serie de Genisteína mostrados en la figura IV.14, paneles a, b y c. Los cambios detectados en el contenido de isoflavonas no fueron paralelos a las variaciones del contenido proteico, ya sea porque el contenido proteico de AP no se modificó o porque el contenido de proteínas de AS aumentó mucho más que su contenido de isoflavonas. Cuando se evaluó el cociente entre contenido de isoflavonas y de proteínas ( $\mu\text{g isoflavona/g proteína}$ ) como un índice de asociación entre ambas, se observó que el mismo fue constante para la aglucona en AP y en AS (figura IV.14, panel d) y para Genistina en AP (panel e). Este resultado podría explicarse de existir algún tipo de interacción proteína-isoflavona independiente del pH en el rango 5,6 – 6,3. El mismo índice decreció con el aumento del pH para Genistina en AS y para Malonil-genistina tanto en AP como en AS (figura IV.14 e y f). La disminución del cociente en AS podría deberse al aumento del contenido de proteínas, más marcado que el aumento del contenido de Genistina o Malonil-genistina, en tanto que la disminución para Malonil-genistina en AP podría atribuirse a la disminución de su contenido, posiblemente originado en el aumento de su disociación como ácido y con el consecuente aumento de solubilidad.

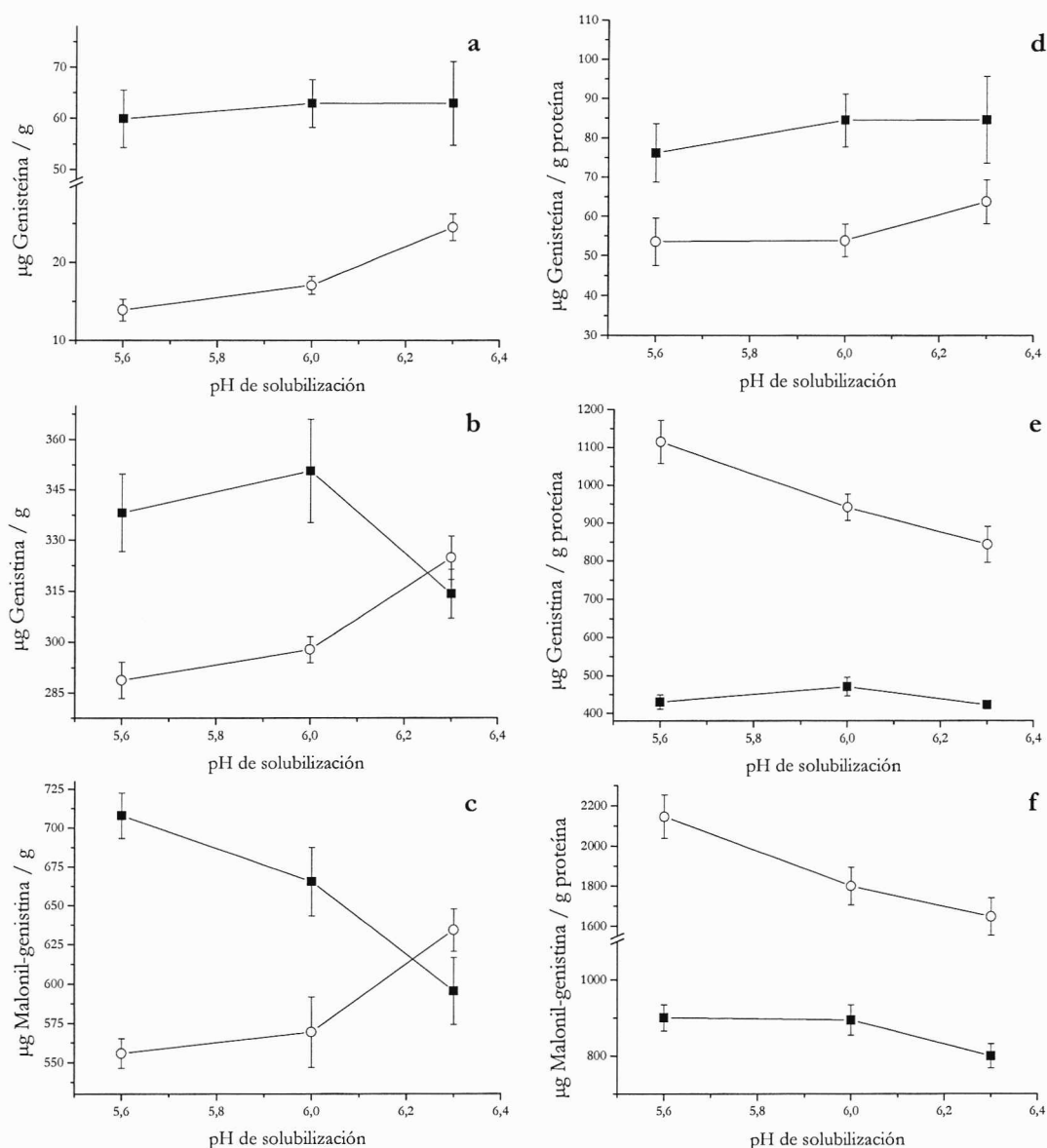


Figura IV.14. Contenido de isoflavonas en AS (—○—) y AP (—■—). Los valores se expresan como µg de cada isoflavona por g de producto: a) Genisteína, b) Genistina, c) Malonil-genistina, o µg de cada isoflavona por g de proteínas de cada producto: d) Genisteína, e) Genistina, f) Malonil-genistina.

Los resultados mostrados sugieren la asociación de la aglucona en forma unívoca a las proteínas, mientras que los malonil-glucósidos interactuarían con ellas cuando se encontraran no ionizados. Genistina, que no puede ionizarse en el rango de pH de solubilización ensayado estaría asociada a las proteínas insolubles, mientras que la disminución del cociente Genistina-proteínas en AS indicaría que mientras las proteínas se encontraran solubles, la Genistina no estaría asociada a ellas pudiendo estar también soluble, en muy baja concentración, en el medio acuoso o asociada a otros componentes.

De la comparación de los contenidos de isoflavonas (paneles a, b y c) y de los índices (paneles d, e y f) surge que:

-la aglucona se encuentra presente con mayor contenido y mayor índice en AP.

-las formas conjugadas muestran la misma tendencia para el contenido hasta pH 6,0, en tanto que el índice en todos los pHs ensayados es mayor en AS.

Este comportamiento podría explicarse si las formas conjugadas se disociaran de las proteínas en mayor grado y permanecieran solubles en AS.

Estos experimentos indicarían que la interacción entre las isoflavonas y las proteínas de reserva de soja es reversible. En los tres pHs de solubilización ensayados, las proteínas partieron del mismo nivel de asociación con las isoflavonas (recordar que en todos los casos las proteínas se habían precipitado a pH 3,5) detectándose una reducción del  $12,1 \pm 2,0$  % ( $p < 0,05$ ) en el contenido de Genisteína total en AP entre el pH de solubilización más bajo y el más alto sin una variación concomitante en el contenido proteico. Estos resultados son concordantes con los alcanzados en el ensayo de disociación de isoflavonas a partir de  $\beta$ -conglucina y de glicina.

La reversibilidad de la asociación proteínas – isoflavonas debería tenerse en cuenta en la elaboración de alimentos en los que habría que evitar etapas de procesamiento en que las isoflavonas se disociaran de la matriz y se perdieran en las fases acuosas.

#### **IV.6. Preparación de aislados proteicos de soja con alto contenido de isoflavonas bioactivas**

Dado que los resultados obtenidos sugieren que las interacciones isoflavona-proteína serían reversibles y preferenciales para las proteínas - aglucona, se diagramó un diseño experimental en el que se trató de inducir este tipo de asociación. Como se ha visto, la aglucona no presentaba una afinidad importante por los componentes del suero, por lo que se pensó en transformar las formas conjugadas de la serie de Genisteína en aglucona mediante hidrólisis secuencial (en un primer paso se saponificaron los ésteres y luego mediante acción de  $\beta$ -glucosidasa, los  $\beta$ -glucósidos se transformaron en aglucona). De esta manera se esperaba que Genistina y Malonil-genistina que hubieran quedado en el suero, pudieran desplazarse al aislado. Siguiendo esta línea de pensamiento se preparó un aislado tratando la harina a pH 11 durante una hora a temperatura ambiente a efectos



de saponificar los ésteres, posteriormente se ajustó el pH a 6,5 (óptimo para la acción de  $\beta$ -glucosidasa) y seguidamente se agregó una cantidad de harina equivalente al 20 % de la masa inicial la cual aportó la enzima, ya que el pH 11 destruye la actividad de la enzima presente en la harina original. La dispersión de harina tratada se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas, luego se ajustó el pH a 8,0, y se continuó con el procedimiento básico de preparación de aislados proteicos.

Tal como se esperaba el tratamiento realizado modificó el patrón de conjugación de la harina original. El porcentaje de aglucona fue alto ( $49,9 \pm 1,9$  %) si se considera el contenido total de Genisteína, Genistina y Malonil-genistina distribuidas en APS, S y RI. Esta conversión en aglucona se logró a expensas de una disminución de las formas conjugadas (que constituyeron el  $20,0 \pm 5,0$  % y el  $30,1 \pm 4,8$  %, Genistina y Malonil-genistina respectivamente) (tabla IV.7.).

Tabla IV.7. Patrones de conjugación globales en harina, productos obtenidos con el procedimiento básico y productos obtenidos con el tratamiento. Los valores están expresados como porcentaje.

	Harina	APS + S + RI proc. básico	APS + S + RI tratamiento
Genisteína	$4,3 \pm 0,1$	$6,8 \pm 1,3$	$49,9 \pm 1,9$
Genistina	$35,7 \pm 0,1$	$35,9 \pm 1,5$	$20,0 \pm 5,0$
Malonil-genistina	$60,0 \pm 0,1$	$57,3 \pm 0,8$	$30,1 \pm 4,8$

El tratamiento de transformación de formas conjugadas en aglucona permitió en el caso de APS con respecto al procedimiento básico (tabla IV.8):

- aumentar el contenido de Genisteína total ( $1391,74 \mu\text{g/g}$ ) en un  $10,4 \pm 0,4$  %
- su rendimiento en un  $11,0 \pm 0,1$  % y
- la fracción molar de aglucona en un  $726,3 \pm 54,3$  %

Bajo estas condiciones experimentales se observó además, (tabla IV.8), que de los  $952,6 \mu\text{g}$  de Genisteína total presentes en un gramo de harina,  $475,97 \mu\text{g}$  (valor que surge de multiplicar el contenido de Genisteína total por g de APS por el rendimiento de APS) se encontraban en el APS, lo que equivale a un incremento del 22,5 % respecto a la cantidad obtenida en el APS preparado de acuerdo al procedimiento básico ( $1261,08 \mu\text{g/g APS} \times 0,3080 \text{ g APS} / \text{g harina} = 388,41 \mu\text{g/g harina}$ ). El suero, que en el procedimiento básico de preparación retenía el  $26,1 \pm 0,8$  % de la Genisteína presente en

Tabla IV.8. Contenido de isoflavonas y rendimiento de S y APS obtenidos con el procedimiento básico y el tratamiento de transformación de formas conjugadas en aglucona. Los valores de las formas conjugadas están expresados en su equivalente de aglucona.

	Tratamiento	Procedimiento básico
<b>µg Genisteína / g APS</b>		
Genisteína	<b>723,73 ± 10,10</b>	<b>79,35 ± 5,08</b>
Genistina	218,78 ± 46,87	345,01 ± 13,93
Malonil-genistina	449,23 ± 51,69	836,72 ± 12,02
Genisteína total	<b>1391,74 ± 18,61</b>	<b>1261,08 ± 29,49</b>
<b>µg Genisteína / g S</b>		
Genisteína	67,45 ± 4,18	22,49 ± 3,56
Genistina	172,70 ± 41,34	422,80 ± 9,26
Malonil-genistina	185,85 ± 20,19	533,88 ± 23,54
Genisteína total	426,01 ± 19,44	979,17 ± 30,52
Rendimiento APS (%)	<b>34,19 ± 0,07</b>	<b>30,80 ± 0,01</b>
Rendimiento S (%)	29,29 ± 0,31	25,10 ± 0,12

un gramo de harina, bajo estas condiciones experimentales retuvo sólo el  $13,5 \pm 0,6$  % de lo existente en la harina ( $p < 0,05$ ), la diferencia ( $120,9$  µg Genisteína total / g de harina) es lo que se desplazó al aislado.

Los resultados de este ensayo permitieron demostrar que a través de la modificación de variables tales como el pH y el tiempo de extracción de las proteínas se logra transformar el patrón de conjugación de las isoflavonas aumentando la fracción aglucona. Esto permite a su vez enriquecer el aislado proteico en Genisteína dada la mayor afinidad de las proteínas de reserva de soja por las agluconas que por las formas conjugadas. El producto final se enriqueció en la forma de la serie de Genisteína que posee mejor biodisponibilidad y mayor acción biológica (Piskula y col., 1999; Piskula 2000, Kawakami y col., 2005) a partir de la fracción del malonil-éster no biodisponible (Ismail y col., 2005). En la aplicación a mayor escala se podría reducir el tiempo de obtención requerido para obtener este patrón de conjugación agregando  $\beta$ -glucosidasa proveniente de otra fuente.

# Isoflavonas y Músculo Liso Vascular

## V. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS ISOFLAVONAS DE SOJA SOBRE EL MÚSCULO LISO VASCULAR

### V.1. En Aorta de Rata:

#### V.1.1. Efectos vasorrelajantes de Genisteína y Daidzeína.

Los anillos de aorta de rata respondieron a la aplicación del agonista Serotonina (5-HT) 2  $\mu\text{M}$  y a la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM produciendo una contracción (figura V.1, paneles a y b respectivamente). La amplitud de la respuesta contráctil inducida por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM, expresada como gramos fuerza/gramos peso de tejido (gF/gP), fue significativamente mayor que la producida por 5-HT (293,94  $\pm$  30,48 gF/gP n = 29 versus 48,79  $\pm$  4,57 gF/gP n = 32, p < 0,001). En la misma figura se muestra el efecto que produce el agregado de Genisteína 20  $\mu\text{M}$  y Daidzeína 20  $\mu\text{M}$  sobre dichas contracciones.

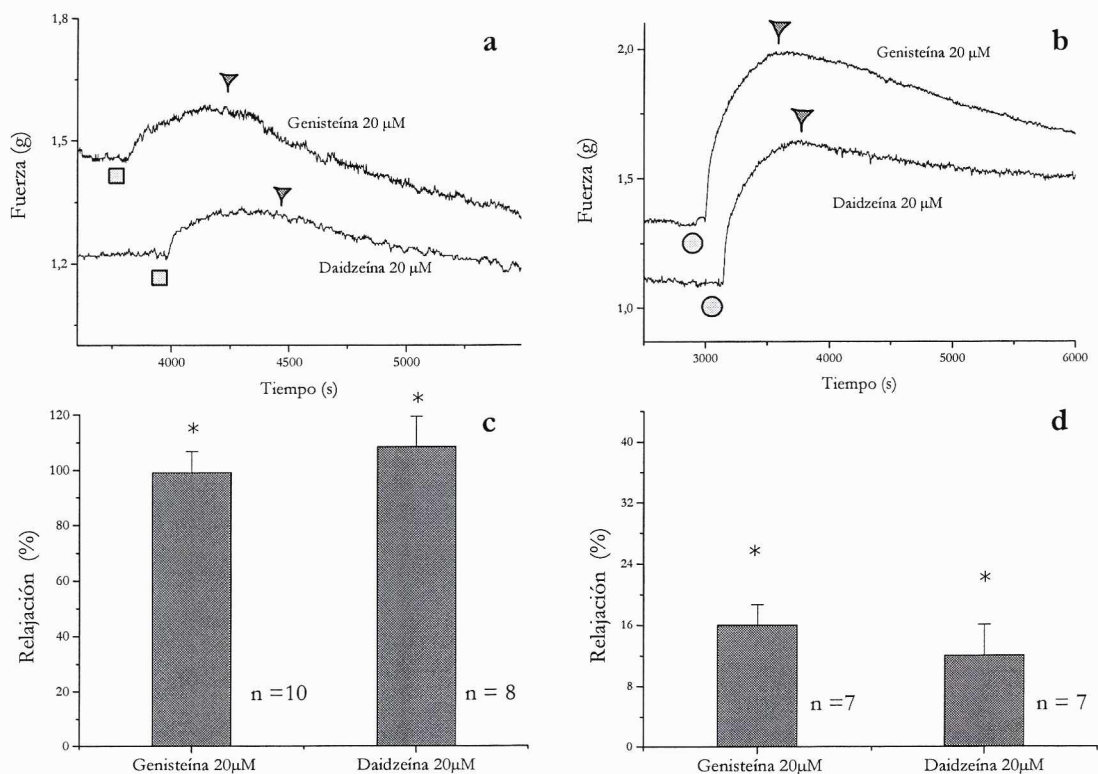


Figura V.1. Determinación de fuerza isométrica en aorta de rata. a) aplicación de Genisteína 20  $\mu\text{M}$  o Daidzeína 20  $\mu\text{M}$  a anillos precontraídos por 5-HT 2  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ). b) aplicación de las mismas sustancias sobre anillos precontraídos por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM ( $\circ$ ). c) y d) porcentajes de relajación a los 10 minutos de aplicación ( $\nabla$ ) de las isoflavonas. El \* señala los porcentajes significativamente distintos de los controles.

La contracción inducida por 5-HT fue completamente relajada por ambas isoflavonas a los diez minutos de agregadas a los anillos vasculares ( $p < 0,001$ ). Mientras que, sobre la contracción inducida por la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM la relajación fue significativa ( $p < 0,001$ ) pero mucho menor que en el caso anterior. En los paneles c y d de la figura V.1 se muestran los valores medios obtenidos en esta serie de experimentos. El agregado de Dimetilsulfóxido (DMSO) (0,04 % v/v), utilizado como vehículo para solubilizar las isoflavonas, no modificó significativamente la respuesta contráctil de los anillos arteriales comparada con la contracción control sin agregado del vehículo. En estos controles la relajación detectada a los 10 minutos fue del  $26,9 \pm 4,9$  % y  $4,1 \pm 1,4$  % para los anillos estimulados con 5-HT y  $K^+$  80 mM respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto que en el músculo liso de la aorta de rata Genisteína y Daidzeína producen un efecto vasodilatador agudo, el cual fue completo en el caso de la contracción inducida por el agonista 5-HT y parcial para aquella inducida por la solución de  $K^+$  80 mM. El hecho de que en ambos casos Daidzeína indujera una relajación de igual magnitud que la producida por Genisteína, a la misma concentración, sugiere que en este tejido, el mecanismo vasorrelajante de Genisteína podría ser independiente de la inhibición de tirosina-quinasa ya que Daidzeína (Akiyama y Ogawara 1991) es un análogo estructural de Genisteína que no posee el efecto típico inhibitor de tirosina-quinasa comprobado para esta última isoflavona (Akiyama y col., 1987, Akiyama y Ogawara 1991).

#### V.1.2. Efectos de Genisteína sobre la concentración de $Ca^{2+}$ intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en células de músculo liso de aorta de rata *in situ*.

En la figura V.2 se presenta una fotografía de un preparado de células de músculo liso *in situ* de segmentos desendotelizados de aorta.

Cuando se realizaron medidas de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), se observó en primer lugar que 5-HT 2  $\mu$ M y la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM inducían un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En ambos casos cuando los estímulos fueron repetidos luego de un intervalo de 5 minutos en presencia de solución extracelular control, se produjo un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de la misma magnitud que el primero. Cuando la segunda aplicación se realizó en presencia de Genisteína 20  $\mu$ M (aplicada 3 minutos antes de la 5-HT o la solución de  $K^+$  80 mM) se produjo una disminución significativa del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por ambos estímulos siendo este efecto mayor para la respuesta a la 5-HT que para la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM ( $p < 0,001$ ). Estos

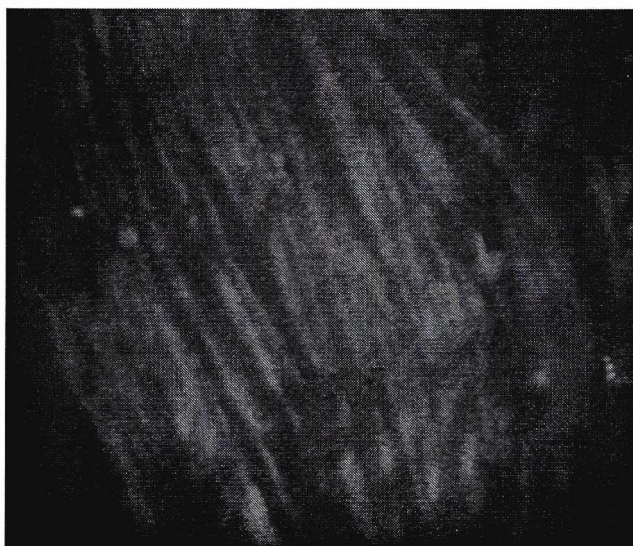


Figura V.2. Fotografía de un preparado de células musculares lisas de aorta de rata *in situ* cargadas con Fura-2.

efectos fueron totalmente reversibles para la solución de  $K^+$  80 mM (luego de 5 minutos de lavado la respuesta fue igual a la original) y parcialmente reversibles para la 5-HT. Registros típicos de esta serie experimental y los valores medios obtenidos en cada caso se presentan en la figura V.3.

El hecho que Genisteína produzca un efecto inhibitorio menor sobre el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM que sobre aquel producido por la 5-HT, tal como se observó también en el desarrollo de fuerza, permite hipotetizar que el mecanismo de vasorrelajación podría estar mediado, en parte, por la activación de canales de  $K^+$  que, hiperpolarizando la célula generan disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje y una consecuente reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cabe recordar que este mecanismo de vasorrelajación no puede ponerse en juego cuando la célula es despolarizada mediante el aumento de la concentración extracelular de  $K^+$  hasta 80 mM debido a que se ha cambiado el valor del potencial de equilibrio electroquímico para este ión. Por lo tanto en este caso, la activación de los canales de  $K^+$  no conduce a una hiperpolarización celular eficiente para la inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$ . Para probar esta hipótesis se ensayó el efecto de Genisteína en presencia de un bloqueador de canales de  $K^+$ , tetraetilamonio (TEA) 0,5 mM sobre el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por 5-HT (TEA en esta concentración es considerado, en el músculo liso, selectivo para canales de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$ ). La figura V.4 muestra que el efecto inhibitorio de Genisteína observado inicialmente (panel a) fue parcialmente revertido por el TEA ( $n = 10$ ,  $p < 0,05$ ) (panel b) indicando que la

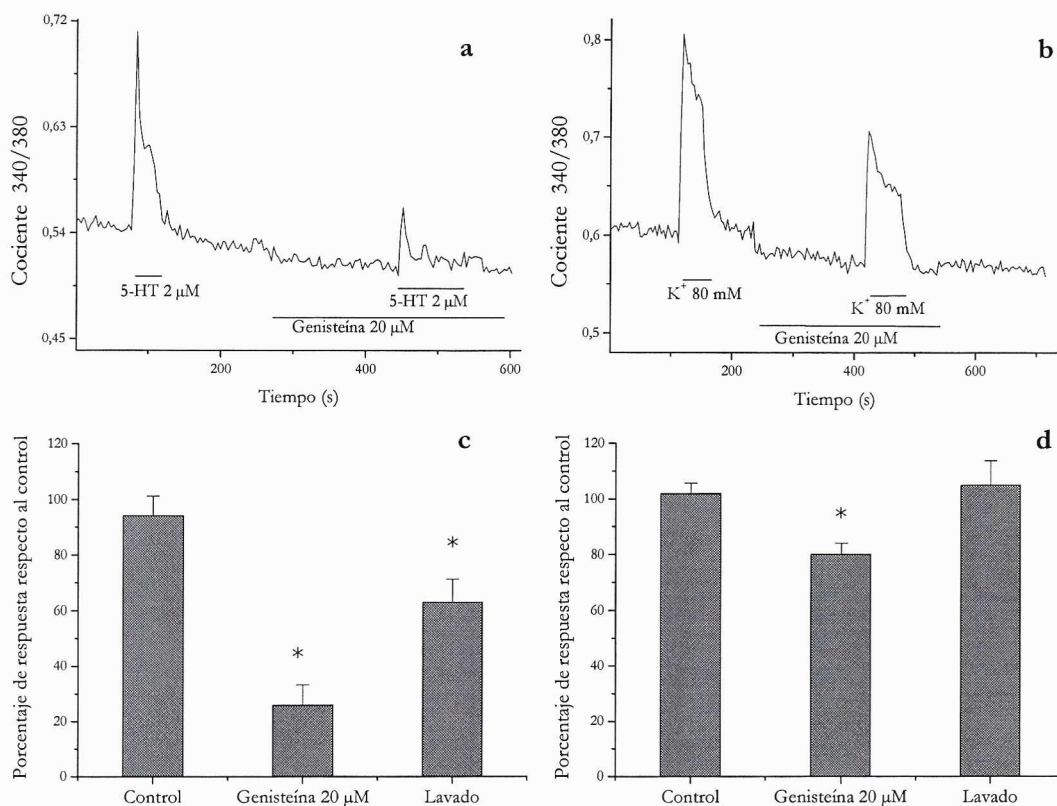


Figura V.3. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células musculares lisas de aorta de rata *in situ*. a) dos aplicaciones consecutivas de 5-HT 2  $\mu$ M, la segunda fue realizada en presencia de Genisteína 20  $\mu$ M. b) dos aplicaciones consecutivas de  $K^+$  80 mM, la segunda fue realizada en presencia de Genisteína 20  $\mu$ M. c) Valores medios del porcentaje de la amplitud de la respuesta a 5-HT 2  $\mu$ M en presencia de Genisteína y del lavado respecto del control. d) Valores medios de la respuesta a la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM en presencia de Genisteína 20  $\mu$ M y en el lavado, respecto del control. El \* señala los valores significativamente distintos del control.

activación de canales de canales de  $K^+$ , probablemente de tipo  $BK_{Ca}$  estaría involucrada en el mecanismo de acción de Genisteína. Nevala y col., (2001) mediante ensayos de desarrollo de fuerza realizados en arteria mesentérica de rata, presentan evidencias que muestran, al igual que nuestras observaciones, que Genisteína produce relajación mediante la activación de canales de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$ .

Otro resultado obtenido en nuestros ensayos, fue el hecho que en la mayor parte de los segmentos que fueron estimulados con 5-HT 2  $\mu$ M, si se mantenía este agonista en contacto con el tejido arterial durante varios minutos se observaba que luego del primer aumento rápido de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la misma presentaba oscilaciones a una frecuencia de  $9,06 \pm 0,33$  ciclos por minuto ( $n = 27$ ). Estas oscilaciones se presentaban en fase entre las células vecinas, debido probablemente a la presencia de uniones de hendidura entre las células de músculo liso del segmento estudiado. Cuando 5-HT era removida el nivel de  $Ca^{2+}$

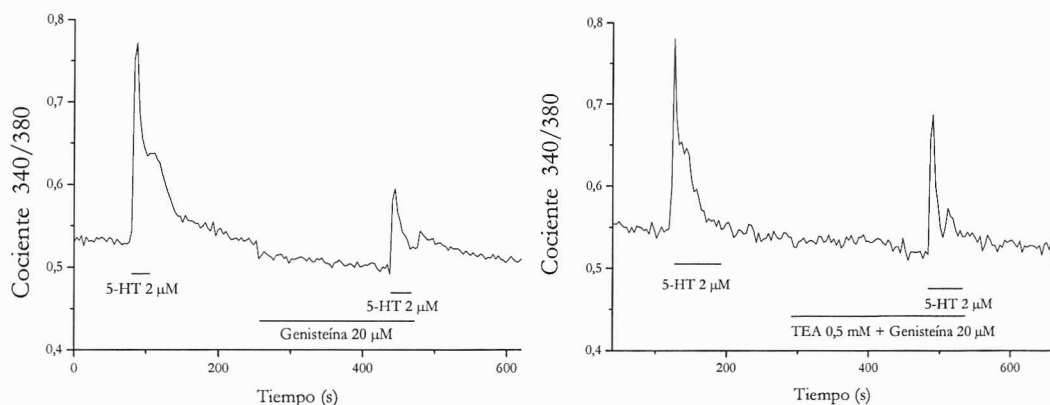


Figura V.4. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células musculares lisas de aorta de rata *in situ*. Dos aplicaciones consecutivas de 5-HT  $2 \mu\text{M}$ , a) La segunda fue realizada en presencia de Genisteína  $20 \mu\text{M}$ . b) La segunda fue realizada en presencia de Genisteína  $20 \mu\text{M}$  y TEA  $0,5 \text{ mM}$ .

regresaba a los valores basales, y si se realizaba una segunda aplicación, luego de 3 – 4 minutos de lavado se evocaba una respuesta igual a la primera (figura V.5, panel a). En otra serie de experimentos la segunda aplicación de 5-HT se efectuó luego de preincubar el segmento arterial durante 90 segundos con Genisteína  $20 \mu\text{M}$  observándose una disminución significativa en la frecuencia de las oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  como se aprecia en el panel b de la figura V.5. El TEA  $0,5 \text{ mM}$  por sí solo no produjo efectos sobre el patrón de oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en tanto que el efecto inhibitorio de Genisteína sobre las oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  fue abolido en su presencia (panel c, d y e, respectivamente).

Estos datos permiten sugerir que Genisteína, mediante la activación de canales de  $K^+$ , logra atenuar la frecuencia de las oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por 5-HT en las células de músculo liso de aorta de rata. Este resultado es interesante ya que mediante este mecanismo Genisteína podría disminuir la sensibilidad de la célula a la 5-HT, teniendo en cuenta que ha sido demostrado que la frecuencia de oscilaciones que producen ciertos agonistas es función directa de la concentración del mismo (Nicholls y col., 1995). Garland (1987), midiendo al mismo tiempo potencial de membrana y fuerza de contracción en segmentos de arteria basilar de conejo, probó que la aplicación de 5-HT producía una despolarización del músculo liso simultánea a la contracción del vaso y oscilaciones en el potencial de membrana seguidas por oscilaciones en la fuerza de contracción cuando la concentración de 5-HT era mayor a  $1 \mu\text{M}$ .



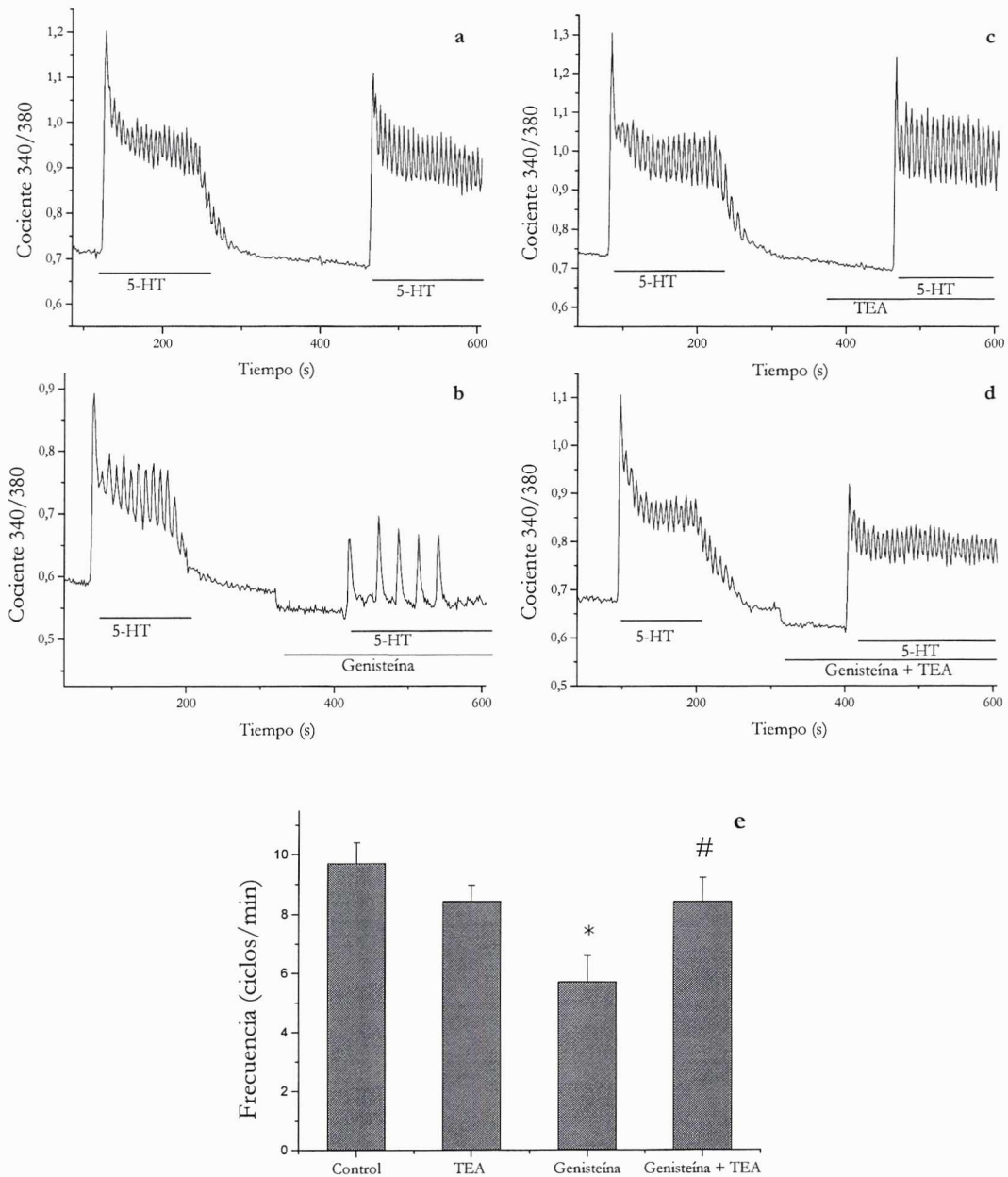


Figura V.5. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células de músculo liso de aorta de rata *in situ*. Respuesta a aplicaciones consecutivas de 5-HT, la segunda intervención se realizó luego de preincubación con Genisteína 20  $\mu$ M y/o TEA 0,5 mM. a) control. b) Genisteína. c) TEA.. d) Genisteína + TEA. e) Frecuencia de las oscilaciones en la segunda aplicación. El \* señala el valor significativamente distinto del control. El # indica diferencia significativa entre Genisteína y Genisteína + TEA.

Otro dato a tener en cuenta es que el tiempo necesario para que Genisteína 20  $\mu$ M mostrara efectos inhibitorios sobre el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la frecuencia de sus oscilaciones en nuestros ensayos fue notablemente corto con respecto a los presentados por otros autores como Nelson y col., (1987), quienes mostraron, en células de aorta de rata en cultivo, efectos inhibitorios similares pero luego de 45 minutos de la incubación con una concentración de 5-HT mucho mayor (148  $\mu$ M). Estos autores no informaron

haber observado oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cabe señalar que estas diferencias podrían deberse a que en nuestro caso se trata de células *in situ* mientras que en el caso citado se ensayó sobre un cultivo celular. En nuestros experimentos la preincubación durante 1,5 o 3 minutos con Genisteína antes de repetir el estímulo con 5-HT o solución despolarizante de  $K^+$  80 mM, fue suficiente para observar el efecto inhibitorio de la misma.

En cuanto al efecto inhibitorio parcial que Genisteína produjo sobre el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM y teniendo en cuenta que sobre el desarrollo de fuerza Genisteína y Daidzeína producen el mismo efecto, sugerimos que ambas isoflavonas podrían tener un leve efecto inhibitorio de canales selectivos al  $Ca^{2+}$ . Estos, ante la despolarización producida por la solución de  $K^+$  80 mM permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y finalmente contracción muscular como ha sido ampliamente demostrado en diferentes tipos de vasos (Karaki y col., 1997). En nuestro trabajo se ha observado que la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de dichos canales iónicos participó en el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM, ya que verapamil 100  $\mu$ M, un bloqueador de canales de  $Ca^{2+}$ , inhibió completamente dicha respuesta (resultados no mostrados).

Por otro lado también se observó, en otra serie experimental, que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la solución despolarizante de  $K^+$  80 mM fue en su amplitud  $19,05 \pm 5,42$  % menor ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) cuando el segmento arterial era preincubado durante 15 minutos con tapsigargina 1  $\mu$ M (figura V.6.). Tapsigargina es una sustancia inhibitoria

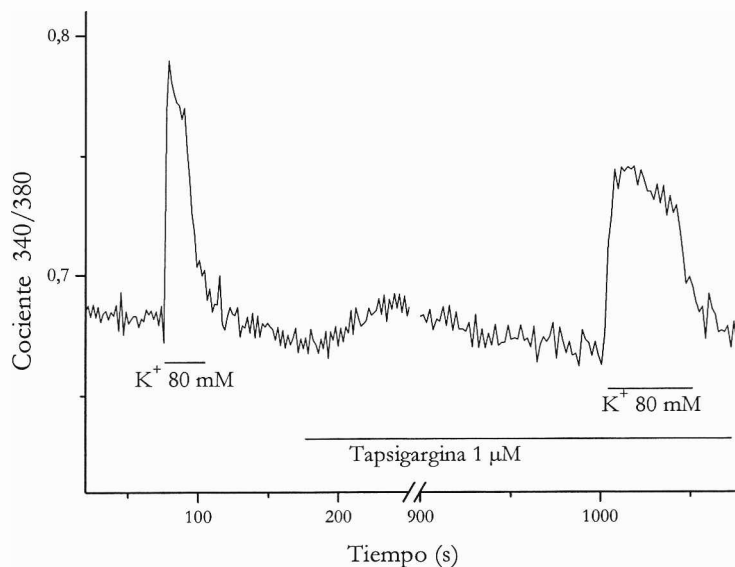


Figura V.6. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células de músculo liso de aorta de rata *in situ*. Dos aplicaciones consecutivas de  $K^+$  80 mM, la segunda se realizó luego de 15 minutos de incubación con tapsigargina 1  $\mu$ M.

de la  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa del retículo sarcoplásmico y por lo tanto su acción produce vaciamiento total o parcial del mismo disminuyendo la participación de este organoide intracelular en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Por lo tanto el efecto inhibitorio de tapsigargina sobre el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producido por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM pone en evidencia la contribución de fuentes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en dicha respuesta, las cuales podrían activarse gracias a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales selectivos al  $\text{Ca}^{2+}$  - sensibles al voltaje - presentes en la membrana celular (mecanismo conocido como “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ”, descrito en la página 12).

Por lo expuesto anteriormente la inhibición parcial que produce Genisteína sobre el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM podría deberse a inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje y/o inhibición de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo a través de los receptores de rianodina, si bien son necesarios otros ensayos que permitan mostrar en forma concluyente esta hipótesis.

Finalmente, teniendo en cuenta los datos presentados por Saini y col., (2003) que muestran que la contracción inducida por 5-HT en aorta de rata es mediada por el receptor  $5\text{-HT}_{2a}$ , cuya activación produce un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  proveniente de fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y extracelulares, nuestros datos no descartan la posibilidad de que además de la activación de los canales de  $\text{K}^+$ , Genisteína pueda interferir con las estructuras que median la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de orgánoides intracelulares. Esta posibilidad queda planteada para futuros estudios, conjuntamente con el estudio del mecanismo de acción responsable del efecto parcial que las isoflavonas producen sobre la contracción y aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por la solución de  $\text{K}^+$  80 mM.

## V.2. En arteria umbilical humana (AUH)

### V.2.1. Efectos vasorrelajantes de Genisteína y Daidzeína

Inicialmente se ensayaron diferentes concentraciones de Genisteína (20 -100  $\mu\text{M}$ ) sobre anillos precontraídos con 5-HT 1  $\mu\text{M}$  observando que la misma produce un efecto relajante significativo cuya velocidad y magnitud fueron dependientes de la dosis aplicada. Esta relajación fue significativa a los 10 minutos de agregada la Genisteína y para una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de Genisteína la relajación de la contracción fue completa luego de 1 hora del agregado de la misma. En la figura V.7 se presentan los valores

medios de la fracción de la fuerza máxima en función del tiempo para las distintas concentraciones ensayadas de Genisteína. Utilizando los valores de relajación luego de 50 minutos de agregada Genisteína se detectó una  $EC_{50}$  de  $45,92 \mu\text{M}$ .

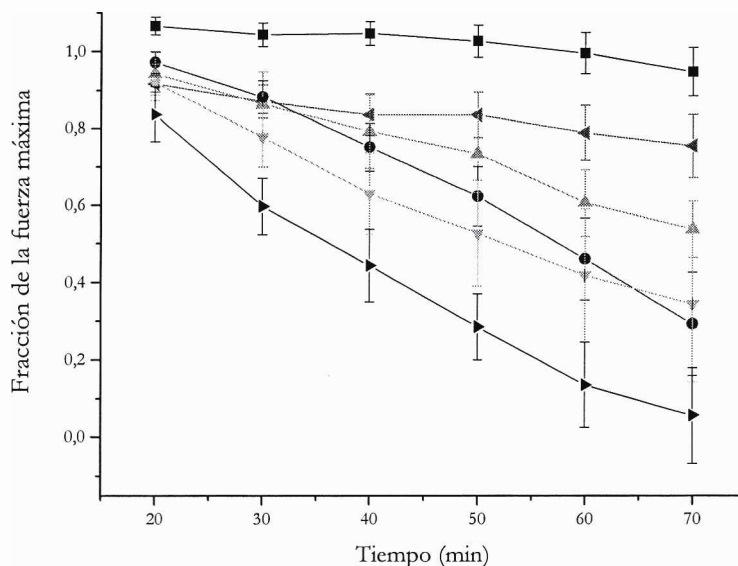


Figura V.7. Determinación de fuerza isométrica en arteria umbilical humana. Aplicación de Genisteína a anillos precontraídos con 5-HT  $1 \mu\text{M}$  Control (-■-). Genisteína en distintas dosis  $20 \mu\text{M}$  (-▼-),  $40 \mu\text{M}$  (-▲-),  $60 \mu\text{M}$  (-●-),  $80 \mu\text{M}$  (-▽-),  $100 \mu\text{M}$  (-►-). Los valores están expresados como fracción de la fuerza máxima desarrollada.

La respuesta contráctil inducida por 5-HT  $1 \mu\text{M}$  en la AUH, también fue inhibida por Genisteína ( $60 \mu\text{M}$ ) cuando la isoflavona fue agregada en forma previa (20 minutos) a la aplicación de 5-HT  $1 \mu\text{M}$ . Los registros típicos se muestran en la figura V.8. Se observó que la fuerza máxima desarrollada por los anillos preincubados con la isoflavona alcanzó el  $53,8 \pm 12,7 \%$  de aquella desarrollada por los anillos de la misma arteria preincubados durante 20 minutos con el vehículo (DMSO) ( $n = 9$  para cada caso,  $p < 0,05$ ). Se observó también que en los anillos preincubados con Genisteína la fuerza desarrollada por 5-HT fue inestable, ( $34,2 \pm 9,7 \%$  de relajación en 60 minutos,  $p < 0,05$ ) mientras que en el mismo tiempo los controles mantuvieron estable la fuerza desarrollada.

Los ensayos realizados con Daidzeína a una concentración equivalente ( $50 \mu\text{M}$ ) a la  $EC_{50}$  obtenida para Genisteína, no mostraron que Daidzeína produzca un efecto significativo sobre la contracción inducida por 5-HT (resultados no mostrados).

Se ensayaron también Genisteína y Daidzeína sobre anillos precontraídos con solución despolarizante de  $\text{K}^+$   $80 \text{ mM}$  observando que Genisteína ( $100 \mu\text{M}$ ) produjo una

inhibición de la contracción del  $77,8 \pm 10,5$  ( $n = 7$   $p < 0,05$ ) (figura V.9) mientras que Daidzeína no produjo ningún efecto ( $7,1 \pm 6,8$   $n=6$  NS).

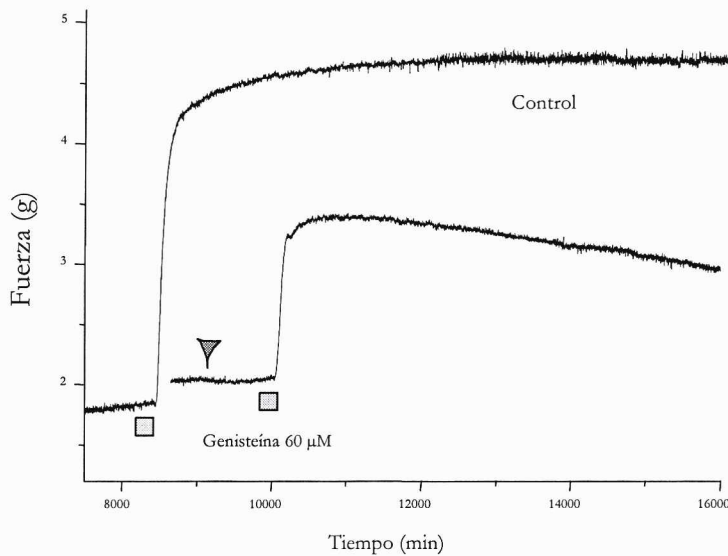


Figura V.8. Determinación de fuerza isométrica en arteria umbilical humana. Aplicación de 5-HT  $2 \mu\text{M}$  (□). Incubación con Genisteína  $60 \mu\text{M}$  (▼) en forma previa al agregado de 5-HT.

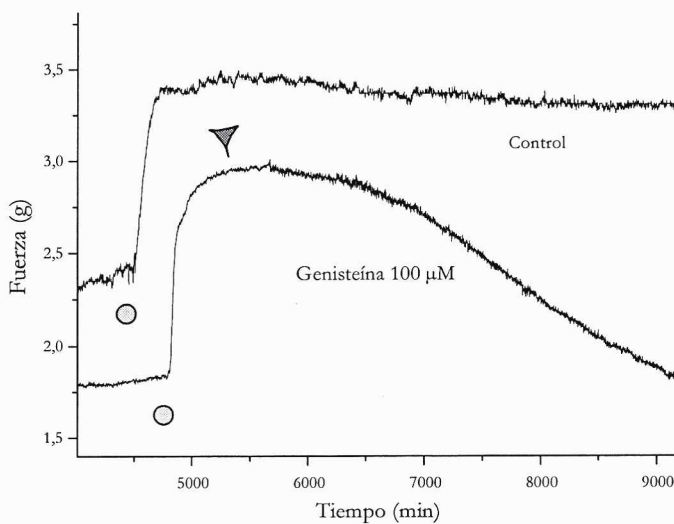


Figura V.9. Determinación de fuerza isométrica en arteria umbilical humana. Aplicación de solución despolarizante de  $\text{K}^+$   $80\text{mM}$  (○). Agregado de Genisteína  $100 \mu\text{M}$  (▼) sobre el anillo precontraído.

V.2.2 Efectos de Genisteína sobre la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en células de músculo liso de la AUH *in situ*.

En la figura V.10 se muestra una fotografía típica del preparado de músculo liso *in situ* en segmentos desendotelizados de AUH cargados con Fura-2 tal como se observó en el microscopio de fluorescencia.

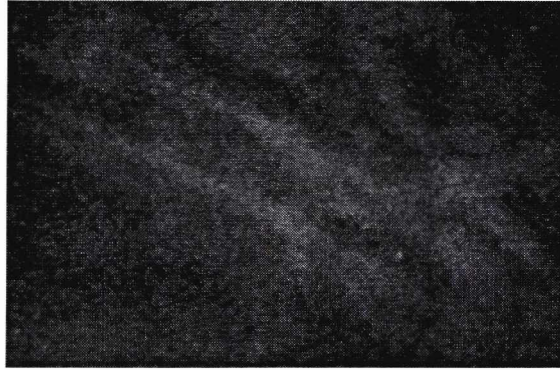


Figura V.10. Fotografía de un preparado de células musculares lisas de arteria umbilical humana *in situ* cargadas con Fura-2.

La respuesta a la aplicación de 5-HT 1  $\mu$ M de las células musculares de AUH consistió en dos fases, la primera fue un aumento agudo de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la segunda fase mostró una  $[Ca^{2+}]_i$  variable (oscilante) mayor que la del nivel basal. Como resultado de la remoción (lavado) de la 5-HT se observaron oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  de magnitud y frecuencia variable durante 10 – 12 minutos (figura V.11).

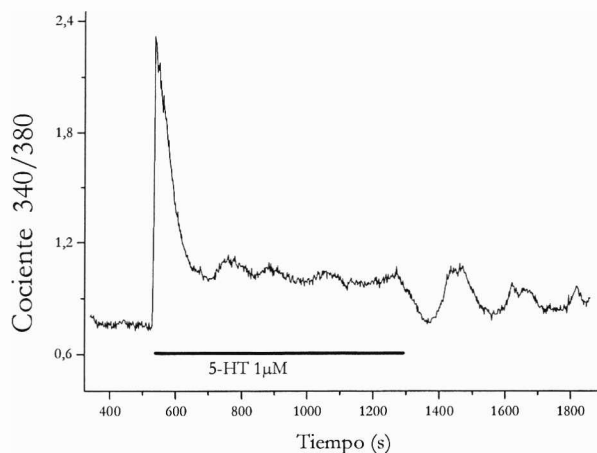


Figura V.11. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células de músculo liso de arteria umbilical humana *in situ*. Respuesta típica a 5-HT 1  $\mu$ M en presencia de  $Ca^{2+}$  en el baño externo.

Cuando se compararon dos aplicaciones consecutivas de 5-HT  $1 \mu\text{M}$  en el mismo segmento arterial separadas por 15 minutos de lavado con solución control, se encontró que la segunda aplicación de 5-HT producía una respuesta igual a la primera (figura V.12, panel a).

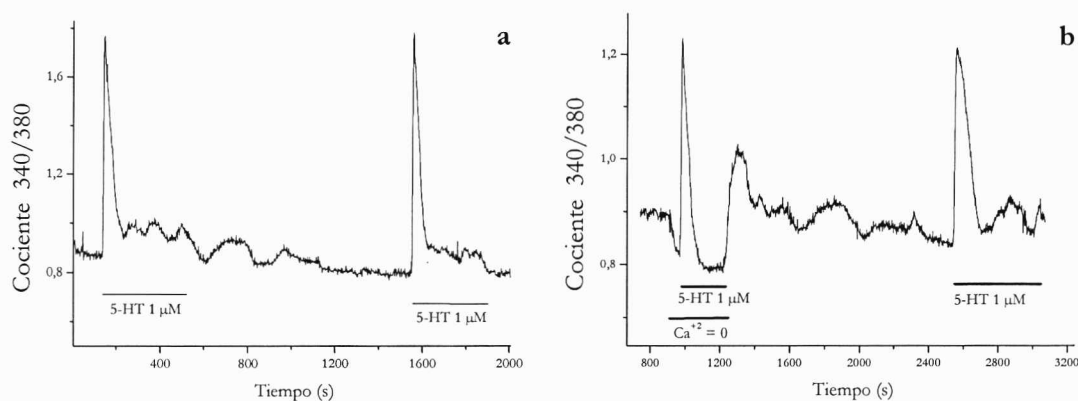


Figura V.12. Determinación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células de músculo liso de arteria umbilical humana *in situ*. Dos estímulos consecutivos con 5-HT  $1 \mu\text{M}$ . a) Ambos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño externo. b) El primer estímulo se realizó en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el segundo en su presencia.

Si la primera aplicación de 5-HT se realizaba en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la segunda en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la respuesta rápida inicial era de la misma amplitud y requería el mismo tiempo en llegar al máximo ( $10,25 \pm 1,16$  segundos), mientras que la segunda fase se veía reducida a un pequeño y transitorio aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (figura V.12, panel b). Estos resultados sugirieron que la primera fase de la respuesta fue dependiente de reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que la segunda dependió de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Estos datos son concordantes con los informados por Dogan y col., (1991) quienes estudiaron la respuesta contráctil a la 5-HT de la AUH y concluyeron que la fuerza desarrollada como respuesta a este agonista dependía tanto del  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente de reservorios intracelulares como del medio extracelular.

A fin de evaluar el efecto de Genisteína sobre el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que producía 5-HT  $1 \mu\text{M}$  en las células de músculo liso *in situ* de segmentos arteriales de AUH, antes de producir el segundo estímulo con 5-HT se realizaron preincubaciones de distinta duración (20; 90 y 180 segundos) con Genisteína  $20 \mu\text{M}$ . Los resultados con los valores medios obtenidos y un registro típico de este tipo de ensayo se muestran en la figura V.13.

Se observó que para los tres tiempos ensayados, la preincubación con Genisteína produjo una disminución de la amplitud del incremento inicial de la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por 5-HT (panel b), no observándose cambios significativos en la fase sostenida de la respuesta. Cabe destacar que el efecto inhibitorio fue mayor cuando se preincubó durante 180 segundos y que en ese caso el tiempo requerido para alcanzar el máximo en la amplitud de la respuesta fue mayor que en ausencia de Genisteína (panel c). Como se observa en el panel a de la figura V.13 estos efectos fueron reversibles, requiriéndose un tiempo de lavado de 15 minutos para revertir completamente el efecto de la isoflavona.

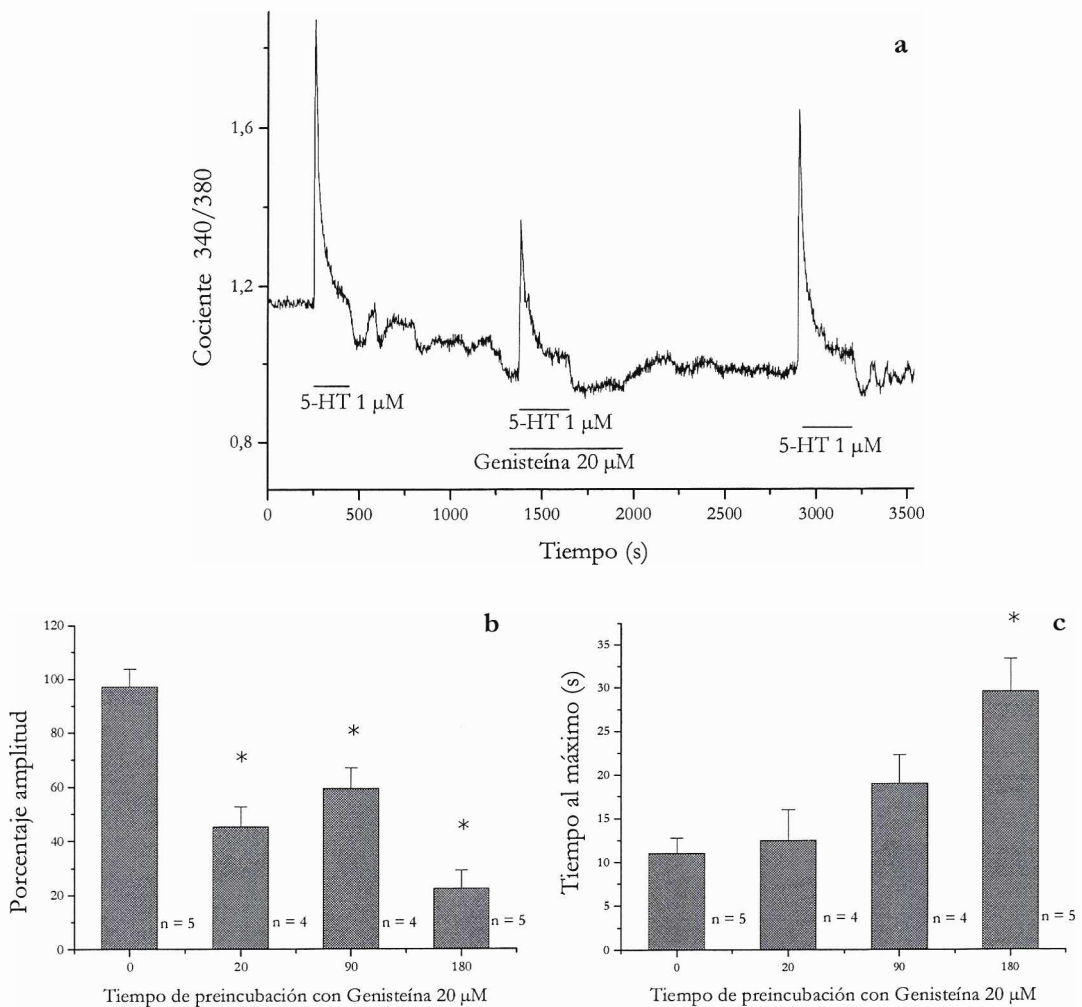


Figura V. 13. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células musculares lisas de arteria umbilical humana *in situ*. Aplicaciones consecutivas de 5-HT 1  $\mu$ M en presencia de  $Ca^{2+}$  en el baño extracelular. La segunda aplicación se realizó en condiciones de control o en presencia de Genisteína 20  $\mu$ M a distintos tiempos de preincubación. a) Registro típico. b) Amplitud del máximo valor de la respuesta, expresado como porcentaje de la respuesta control ( $x = 0$ ). c) Tiempo requerido para alcanzar el máximo valor de la respuesta. Los \* señalan los valores significativamente distintos del control. En cada réplica se estudiaron al menos 5 células.



En base a este resultado y teniendo en cuenta que la magnitud de la fase inicial de la respuesta es igual en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (sugiriendo liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo como principal fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) examinamos si Genisteína inhibía la primer fase de la respuesta a 5-HT afectando la liberación  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. Para ello se llevaron a cabo experimentos en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, realizando ahora una incubación con Genisteína  $20 \mu\text{M}$  durante 90 segundos antes del segundo estímulo con 5-HT. En este caso la amplitud de la respuesta a 5-HT (en presencia de Genisteína) fue significativamente menor que la primera y diferente al control (panel b), indicando que Genisteína efectivamente interfiere con mecanismos de regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  externo (figura V.14)

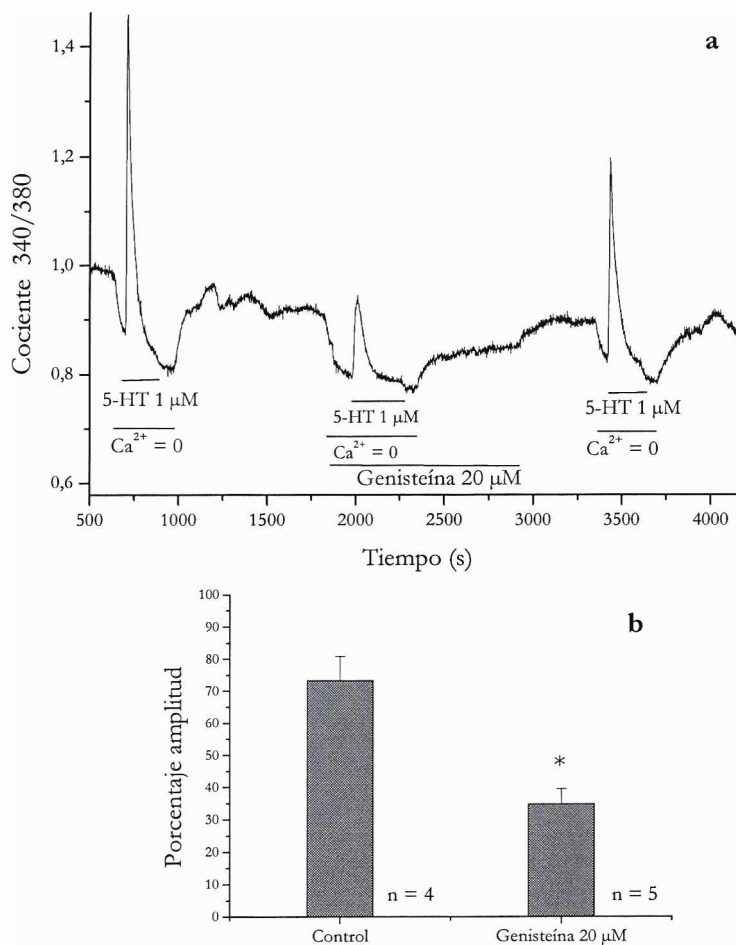


Figura V.14. Determinación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células de músculo liso de arteria umbilical humana *in situ*. Efecto de Genisteína sobre la respuesta a 5-HT en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño externo. a) Registro típico. b) Amplitud del máximo valor de la respuesta, expresado como porcentaje de la respuesta control. El \* indica que la diferencia con el control fue significativa. En cada réplica se estudiaron al menos 5 células.

Otro dato interesante relacionado con los efectos que produce Genisteína sobre los mecanismo citosólicos de regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que se describieron anteriormente, surgió de experimentos realizados con el ácido ciclopiazónico (ACP) el cual inhibe la Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico impidiendo la captación de  $Ca^{2+}$  hacia el retículo con el consecuente vaciamiento del mismo. La aplicación de ACP 10  $\mu M$  a los segmentos

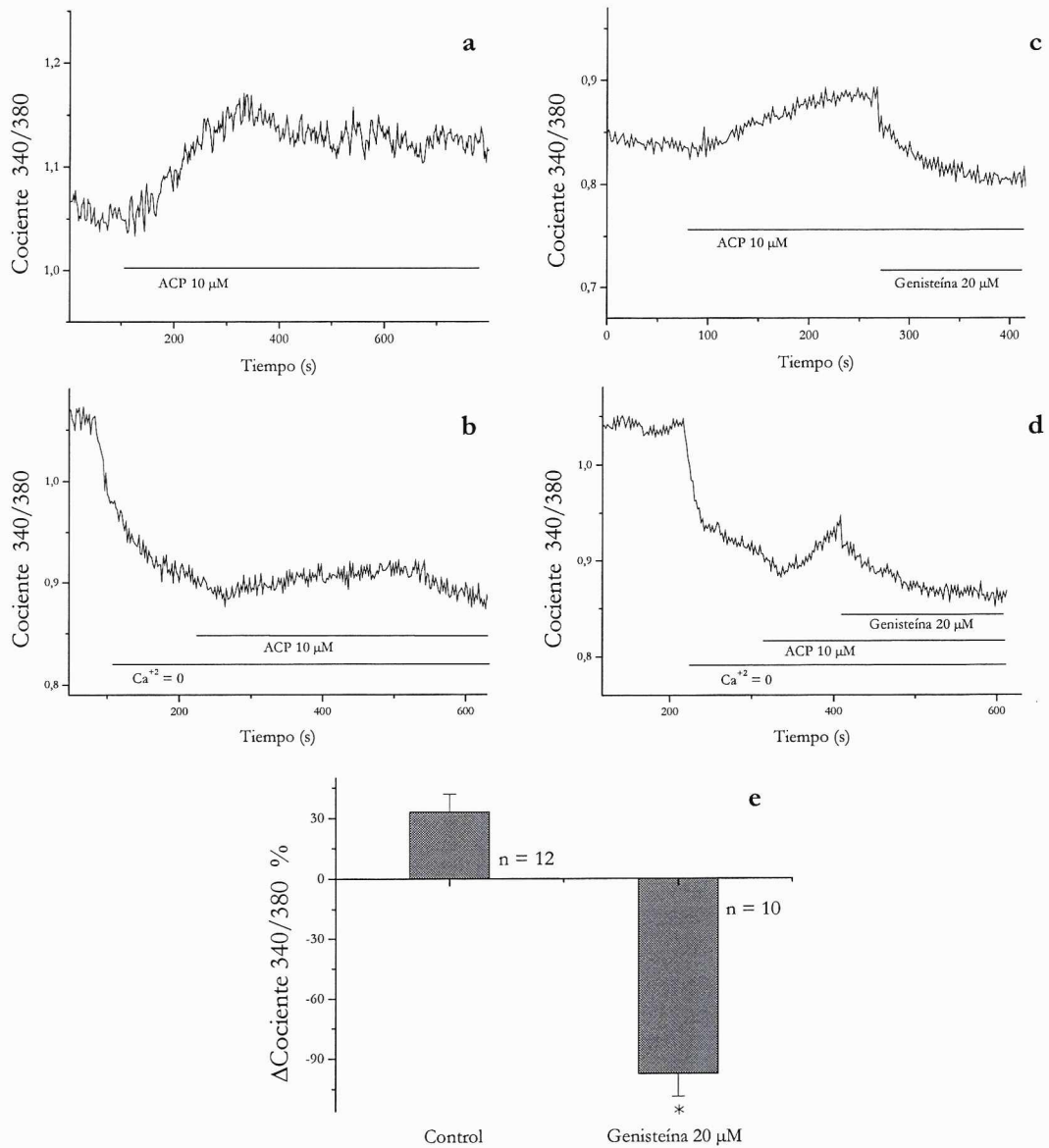


Figura V.15. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células de músculo liso de arteria umbilical humana *in situ*. Efecto de Genisteína sobre la respuesta a ACP 10  $\mu M$ . a) Registro típico en presencia de  $Ca^{2+}$  en el baño externo. b) Registro típico en ausencia de  $Ca^{2+}$  en el baño externo. c) Aplicación de Genisteína 20  $\mu M$  en presencia de  $Ca^{2+}$ . d) Aplicación de Genisteína 20  $\mu M$  en ausencia de  $Ca^{2+}$ . e) Cociente 340/380 a los 60 segundos de aplicada Genisteína o el tiempo equivalente en el control. Los valores están expresados como porcentaje del valor máximo alcanzado. El \* indica que Genisteína 20  $\mu M$  redujo significativamente el cociente 340/380.

arteriales produce *per se* un aumento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$ , tanto en ausencia como en presencia de  $Ca^{2+}$  externo (figura V.15, paneles a y b). Se postula que este incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  observado como respuesta rápida a la aplicación del ACP 10  $\mu$ M en ausencia de  $Ca^{2+}$  es debido a la fuga de  $Ca^{2+}$  del retículo hacia el citoplasma. Flemming y col., (2002) trabajando con músculo liso de arteriolas cerebrales de conejo observaron en respuesta al ACP, un aumento sostenido de la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular y transitorio, y de menor amplitud en ausencia de este ión. Estos autores concluyeron que la respuesta en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo era debida a pérdidas del retículo sarcoplásmico y que en su presencia también involucraba a los canales operados por depleción del retículo sarcoplásmico. Kang y col., (2003) trabajando en arteria pulmonar de conejo concluyeron que en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, la aplicación de ACP promovía la liberación de este ión desde el retículo hacia el citoplasma, el cual era en parte secuestrado por la mitocondria y también extruído al espacio extracelular por la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática. En nuestros ensayos, el agregado de Genisteína 20  $\mu$ M luego de transcurridos 100 segundos desde la aplicación de ACP (cuando la  $[Ca^{2+}]_i$  se encontraba todavía en la fase creciente de la respuesta) produjo una inhibición completa, instantánea y reversible del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , tanto en presencia como en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo (figura V.15, paneles c, d y e).

Este resultado permite profundizar acerca del mecanismo por el cual Genisteína inhibe la fase inicial de la respuesta a 5-HT dependiente del  $Ca^{2+}$  intracelular sugiriendo que la isoflavona produciría sus efectos inhibitorios afectando el mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico. Esto no descarta la posibilidad de que la misma pueda estimular los mecanismos de remoción del  $Ca^{2+}$  como son la captura mitocondrial o la extrusión de  $Ca^{2+}$  mediada por la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática o el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ . Montero y col., (2004) demostraron en células HeLa que Genisteína, Genistina y Daidzeína eran capaces de aumentar la actividad del uniportador de  $Ca^{2+}$  de la mitocondria en forma casi instantánea y reversible. Dean y col., (1997), observaron que la fosforilación de residuos de tirosina inhibe la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática en plaquetas humanas por lo que la inhibición de las tirosinas-quinasa aumentaría su actividad. En timocitos de ratón fue demostrado que la fosforilación en residuos de tirosina del receptor de  $IP_3$  aumentaba su actividad (Jayaraman y col., 1996).

Si bien los primeros ensayos con Genisteína presentados en la figura V.13 no mostraron evidencias de un efecto significativo de la isoflavona sobre los mecanismos,

dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  externo, que mantienen la fase sostenida de la respuesta a 5-HT se pudo observar que en presencia de Genisteína las oscilaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se verificaban durante el lavado de la misma fueron completamente inhibidas (panel a de la figuras V.13), de la misma forma que no se observaron en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. En este tipo de oscilaciones podrían estar involucrados canales iónicos activados por la depleción de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lee y col., 2002), los cuales son activados cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de los reservorios disminuye, permitiendo así un ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular (denominado entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa) para recuperar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares. (Parekh y Penner, 1997). Este indicio nos llevó en primer lugar a realizar ensayos que permitan indagar acerca de la presencia de una entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de músculo liso de la AUH. Para poner de manifiesto este mecanismo, se realizó un protocolo experimental estándar donde en primero se induce la depleción del retículo sarcoplásmico en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y luego se restituye el mismo, de esta manera si la depleción activó una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa esta se pone en evidencia durante la fase de restitución del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (midiendo la emisión de fluorescencia proporcional al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , o en algunos casos también puede medirse como desarrollo de fuerza). En nuestros ensayos se indujo la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico preincubando el tejido durante 1 hora en una solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , luego se restituyó el  $\text{Ca}^{2+}$  (1,5 mM) al medio extracelular observando un aumento significativo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (figura V.16, paneles a y c) que sugiere la presencia de una entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con el objetivo entonces de observar si Genisteína afectaba esta respuesta, como se infería de los primeros resultados, se realizaron los mismos protocolos pero realizando la restitución del  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de Genisteína 20  $\mu\text{M}$ , en este caso la respuesta fue parcialmente inhibida por la isoflavona (figura V.16 paneles b y c).

Este resultado sugiere que Genisteína posee un efecto inhibitorio sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa en la AUH. La presencia de un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativo inhibido por Genisteína permite brindar un mecanismo que explicaría las oscilaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se observaban cuando se removía la 5-HT y la abolición de las mismas en presencia de la isoflavona. Varios autores han demostrado recientemente que Genisteína produce inhibición sobre este mecanismo en distintos tipos celulares. Quinn y col., (2004) demostraron que la preincubación con Genisteína 100  $\mu\text{M}$  durante 20 minutos inhibe la entrada capacitativa en experimentos en que esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se determinaba midiendo contracción del músculo liso de la vesícula biliar de cerdo.

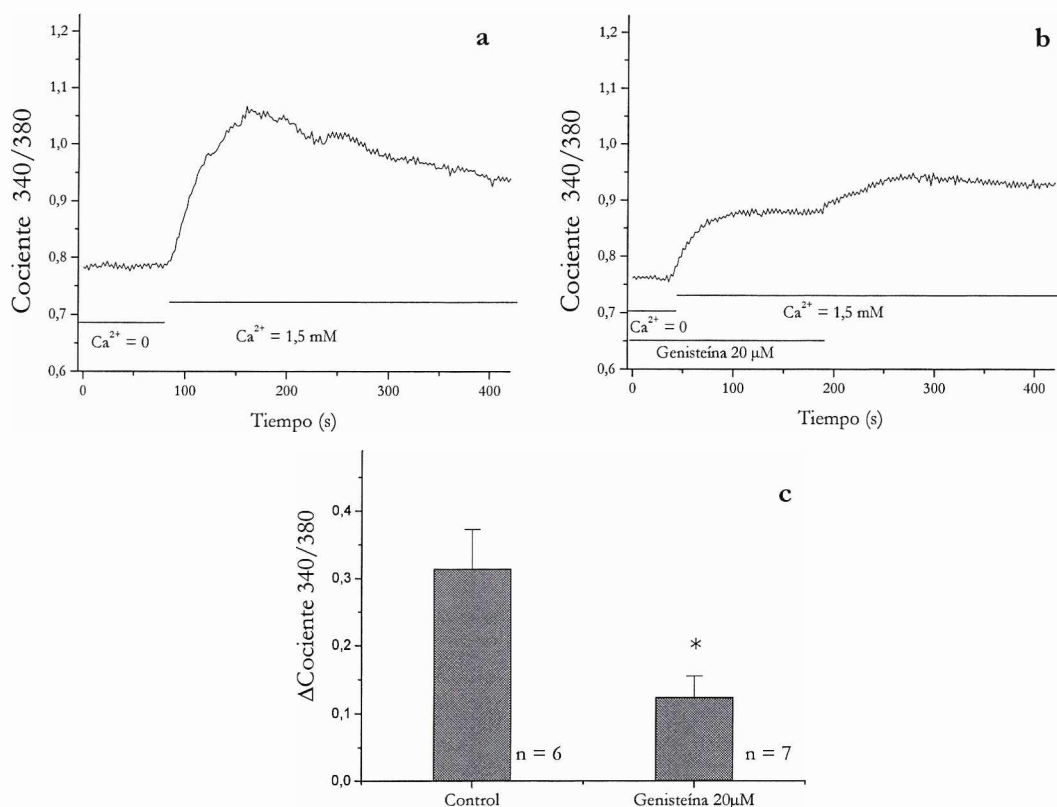


Figura V. 16. Determinación de  $[Ca^{2+}]_i$  en células musculares lisas de arteria umbilical humana *in situ*. Aplicación de solución con  $[Ca^{2+}]_i = 1,5$  mM a segmentos arteriales que habían sido incubados durante 60 minutos en una solución sin  $Ca^{2+}$ . a) Control b) En forma previa y durante la reposición del  $Ca^{2+}$  se agregó Genisteína 20  $\mu$ M. c) Valores medios de la diferencia en el cociente 340/380 evocada por el aumento del  $Ca^{2+}$  en el baño externo. El \* indica que el efecto de Genisteína 20  $\mu$ M fue significativo.

### V 2.3. Efectos sobre canales iónicos presentes en la membrana celular de las células de músculo liso de la AUH

Con el objetivo de estudiar si Genisteína, además de afectar los mecanismos de regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$ , descritos precedentemente modificaba la actividad de canales iónicos de la membrana celular, se realizó un estudio electrofisiológico en células de músculo liso aisladas de AUH valorando el efecto de Genisteína sobre la actividad de los mismos. Estas células presentan canales selectivos al  $Ca^{2+}$  (tipos L, T y P/Q, resultados aún no publicados) sensibles al voltaje y canales catiónicos no selectivos (Raingo y col., 2004) como vías - no excluyentes - de influjo de  $Ca^{2+}$  a la célula. La inhibición de cualquiera de estos dos tipos de canales produce una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  y un consecuente efecto relajante en los segmentos arteriales de AUH (Raingo y col., 2004). También se encuentran expresados en este tejido canales de  $K^+$  de gran conductancia

( $BK_{Ca}$ ) (Milesi y col., 2003) activados por la despolarización celular y por aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Éstos, al activarse, producen una corriente hiperpolarizante que favorece la relajación por promover el cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje. Sustancias que aumenten la probabilidad de apertura de estos canales de  $K^+$  podrían provocar la relajación del músculo liso de la AUH. Los distintos tipos de corrientes iónicas (de  $Ca^{2+}$ , catiónicas no selectivas y de  $K^+$ ) se registraron en configuración W-C (figura V.17), en condiciones iónicas adecuadas para aislar cada tipo de corriente de la corriente total, a través de los diferentes tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular. Sobre estas corrientes se ensayó el efecto de Genisteína y de Daidzeína. Esta última con el objetivo de valorar efectos directos o mediados por la inhibición de tirosina-quinasa.

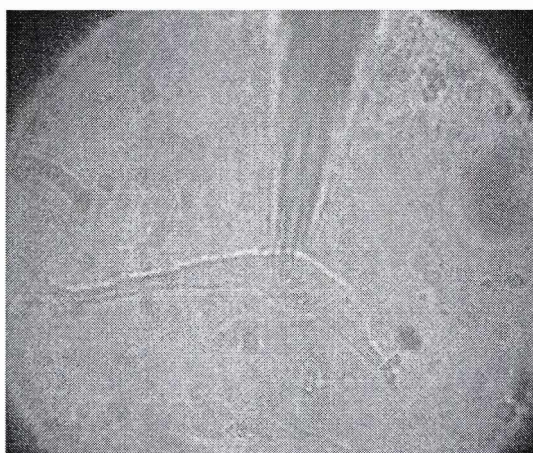


Figura V. 17. Fotografía de una célula de músculo liso de arteria umbilical humana en configuración de W-C.

#### V.2.3.1. Efecto de Genisteína y Daidzeína sobre las corrientes de $Ca^{2+}$

En el panel superior de la figura V.18 se muestran registros típicos de una familia de corrientes de  $Ca^{2+}$  evocadas por la aplicación de distintos pulsos fijos de voltaje de -60 hasta +50 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV (160 ms de duración, en incrementos de 10 mV). Por convención las corrientes de cationes (en este caso  $Ca^{2+}$ ) en dirección entrante (hacia la célula) se grafican como corrientes negativas.

Si se comparan los registros en condiciones control (figura V.18 panel a) y luego de 6 minutos del agregado de Genisteína 40  $\mu$ M (panel b) y las correspondiente curvas I-V obtenidas en cada caso (panel d), se puede observar que Genisteína produjo una inhibición parcial de la corriente de  $Ca^{2+}$  evocada por pulsos de potencial entre -20 y +40

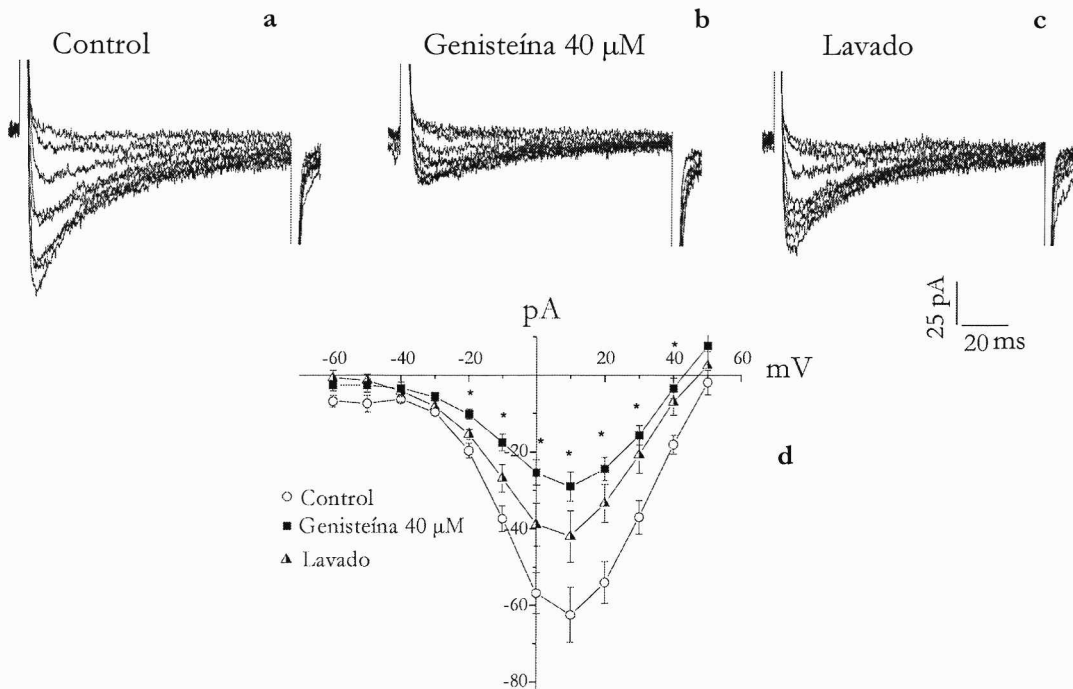


Figura V.18. En los paneles superiores se muestran, superpuestos, cada uno de los registros de corriente correspondiente a los pulsos de voltaje aplicados. Se observa que la corriente tiene un máximo al inicio y luego decae en función del tiempo. En la misma célula la corriente fue registrada en condiciones de: a) control, b) luego de la acción y en presencia de Genisteína 40  $\mu\text{M}$  y c) luego de 5-10 minutos del lavado de Genisteína. La amplitud del máximo de corriente en función del valor de voltaje aplicado (relación I-V) en cada una de las condiciones de registro se presenta en d) esta relación I-V es característica de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje. Los \* indican los valores significativamente distintos del control (n = 8, p < 0,01). En todos los ensayos los registros de corriente en condiciones de control y de lavado se realizaron en presencia del solvente de disolución de Genisteína (DMSO).

mV y que este efecto fue parcialmente reversible luego de 5 - 10 minutos de lavado de la Genisteína (panel d). Cuando se ensayó Daidzeína 50  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por el mismo protocolo de voltaje descrito anteriormente, no se observaron efectos significativos sobre la amplitud de la corriente evocada por los distintos pulsos de potencial (a +10 mV, control:  $-106,6 \pm 23$  pA, Daidzeína:  $-101,2 \pm 24,0$  pA, n = 4).

Estos resultados permiten proponer que la inhibición de canales selectivos al  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje producida por Genisteína podría estar involucrada en el mecanismo por el cual Genisteína induce relajación de los anillos de AUH precontraídos con la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM. Por su parte Daidzeína, en concordancia con el dato electrofisiológico no mostró ningún efecto sobre las contracciones inducidas por la solución despolarizante de  $\text{K}^+$  80 mM. Como hemos referido anteriormente, el hecho de que Daidzeína no produjera efectos significativos y sí lo hiciera Genisteína sugiere que

los mismos podrían estar mediados por la acción inhibitoria de tirosina-quinasa descrita para Genisteína, la cual no se verifica para su análogo estructural Daidzeína (Akiyama y Ogawara, 1991). Disminuciones en la amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediadas por inhibición de tirosinas-kinasas han sido observadas en células de músculo liso de otros lechos vasculares de distintas especies (Liu y col., 1997). En particular en la arteria de la oreja de conejo se ha demostrado que dicha inhibición está involucrada en el efecto de Genisteína (Wijetunge y col., 1992).

### V.2.3.2. Efecto de Genisteína y Daidzeína sobre la corriente catiónica no selectiva (CNS)

En el panel a de la figura V.19 se muestran registros típicos de la corriente CNS evocada mediante la aplicación de una rampa de voltaje (desde -140 mV a +80 mV a una velocidad de cambio de potencial de 0,137 mV/ms desde un potencial de mantenimiento de -40 mV).

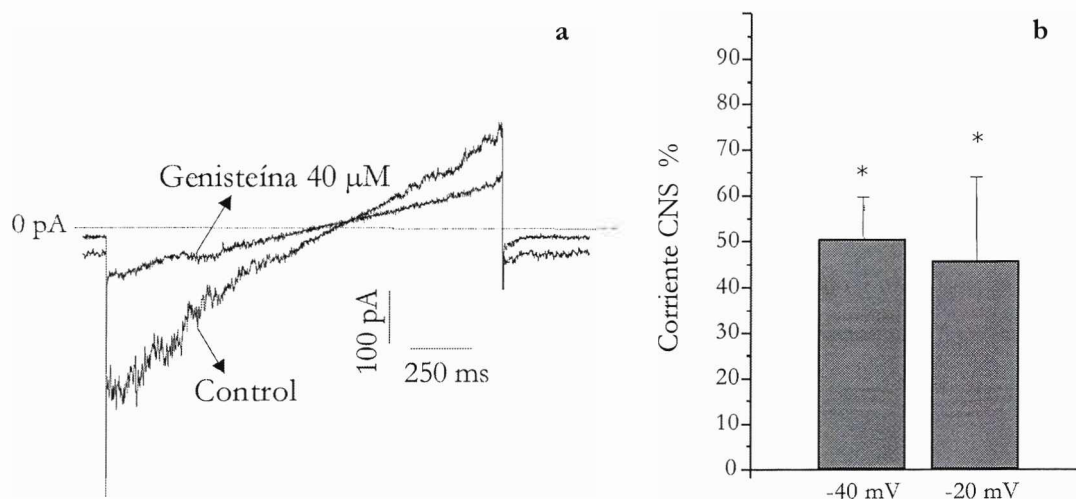


Figura V.19. a) registros de corriente en función del tiempo evocados por la rampa de potencial en condiciones control y luego de 6 minutos de la aplicación de Genisteína 40  $\mu\text{M}$ . b) Amplitud de la corriente evocada a -40 y -20 mV expresada como porcentaje con respecto al control. Los \* indican los valores significativamente distintos del control a esos potenciales ( $n = 6$   $p < 0,05$ ). En todos los ensayos los registros de corriente en condiciones de control se realizaron en presencia del solvente de disolución de Genisteína (DMSO).

Dado que la actividad (probabilidad de apertura) de estos canales es independiente del voltaje, la corriente es función lineal de éste. La corriente iónica evocada por potenciales menores que 0 mV (región de corriente negativa) es transportada por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Raingo y col., 2004), la cual representa una corriente de cationes entrante despolarizante para la célula, que podría estar involucrada directa o indirectamente en los



mecanismos que inducen aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  fundamentales para la contracción de la célula muscular. El ensayo de Genisteína sobre este tipo de corriente mostró que Genisteína 40  $\mu\text{M}$  produjo una inhibición parcial de la corriente evocada. En el panel b de la figura V.19 se muestran los valores medios de porcentaje de amplitud para dos valores de potencial de membrana. Cuando se aplicó Daidzeína 50  $\mu\text{M}$  sobre la corriente CNS no se observó un efecto significativo (resultados no mostrados).

Si bien no se han realizado aún los protocolos experimentales que permitan confirmar si un influjo de  $Ca^{2+}$  capacitativo es parte de esta corriente CNS, la inhibición que produce Genisteína sobre la misma es concordante con los resultados presentados en páginas 89, 90 y 93 que muestran mediante mediciones de  $[Ca^{2+}]_i$  que Genisteína inhibe una entrada de  $Ca^{2+}$  probablemente capacitativa y responsable de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  observadas luego de la remoción de 5-HT.

#### V.2.3.3. Efecto de Genisteína y Daidzeína sobre las corrientes de $K^+$

En los paneles superiores de la figura V.20 se muestran registros típicos de una familia de corrientes de  $K^+$  evocadas por distintos pulsos de voltaje desde -110 hasta +60 mV desde un potencial de mantenimiento de -40 mV (360 ms de duración, en incrementos de 10 mV). La corriente evocada a potenciales despolarizantes mayores que 0 mV es mayoritariamente conducida a través de canales de tipo  $BK_{Ca}$  (Milesi y col., 2003). Como se puede observar al comparar los registros en condiciones control (panel a) y luego de 6 minutos del agregado Genisteína 40  $\mu\text{M}$  (panel b) y, las curvas I-V que muestran la relación entre la amplitud de corriente en la región final – constante - del registro y el valor de voltaje del pulso aplicado (panel d), obtenidas en cada una de las condiciones experimentales, se observa que Genisteína 40  $\mu\text{M}$  produjo un incremento significativo en la corriente de  $K^+$  evocada por potenciales despolarizantes mayores a 0 mV. Este efecto fue reversible luego del lavado de la isoflavona (panel c).

La aplicación de Daidzeína 80  $\mu\text{M}$  sobre las corrientes de  $K^+$  evocadas por el mismo protocolo de voltaje descrito anteriormente no mostró efectos significativos sobre la amplitud de la corriente (a + 30 mV, control:  $205,9 \pm 49,3$  pA Daidzeína:  $249,9 \pm 75,7$  pA n = 6).

Datos bibliográficos (Valverde y col.,1999; Dick y Sanders, 2001) indican que algunos reguladores selectivos de los receptores de estrógeno pueden, al igual que el 17- $\beta$  estradiol, activar los canales de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$  mediante su unión a un sitio específico localizado en la región extracelular de la subunidad  $\beta$  del mismo. Teniendo en cuenta

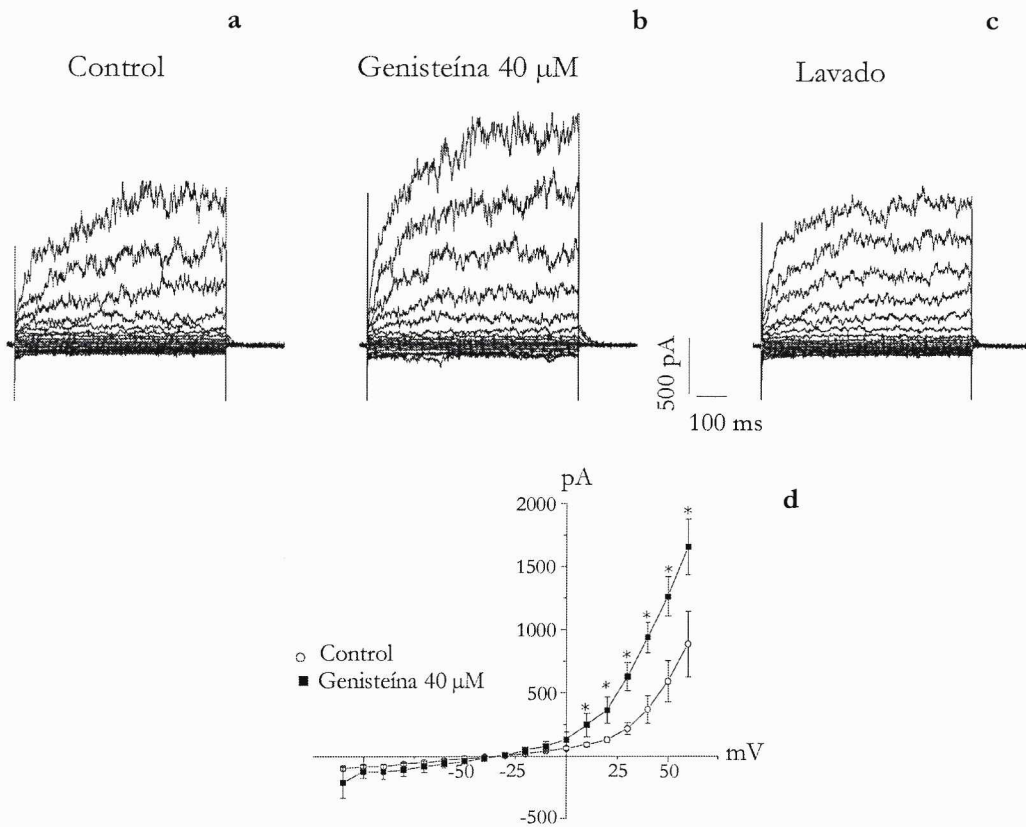


Figura V.20. En los paneles superiores se muestran, superpuestas, cada uno de los registros de corriente correspondientes a los pulsos de voltaje aplicados. Se observa que la corriente crece con una cinética dependiente del potencial y del tiempo hasta un máximo y luego se mantiene estable hasta el final del pulso. En la misma célula la corriente de  $K^+$  fue registrada en condiciones de: a) control, b) luego de la acción y en presencia de Genisteína  $40 \mu\text{M}$  y c) luego de 5-10 minutos del lavado de Genisteína. La amplitud de corriente en la región final constante del registro en función del voltaje aplicado (relación I-V) en cada una de las condiciones de registro se presenta en d) Relación I-V característica de las corrientes de  $K^+$  dependientes del voltaje. Los \* indican los valores significativamente distintos del control ( $n = 6$   $p < 0,05$ ). En todos los ensayos los registros de corriente en condiciones de control y de lavado se realizaron en presencia del solvente de disolución de Genisteína (DMSO).

esto, realizamos ensayos en configuraciones de canal único con el objetivo de analizar si Genisteína, como fitoestrógeno, era capaz de mediar su acción activadora a través de este mecanismo.

La figura V.21 muestra un registro típico de la actividad de este canal  $BK_{Ca}$  (previamente caracterizados en este tipo celular en nuestro laboratorio, (Milesi y col., 2003) en configuración O-O donde la región extracelular de la membrana está en contacto con la solución de perfusión, luego de registrar la actividad del mismo en condiciones control se agregó Genisteína  $20 \mu\text{M}$  y se observó un inmediato aumento en

la probabilidad de apertura de los canales  $BK_{Ca}$  que se revierte por el lavado de Genisteína (aumento de  $7,1 \pm 2,5$  veces con respecto al control  $n = 4$   $p < 0,05$ ).

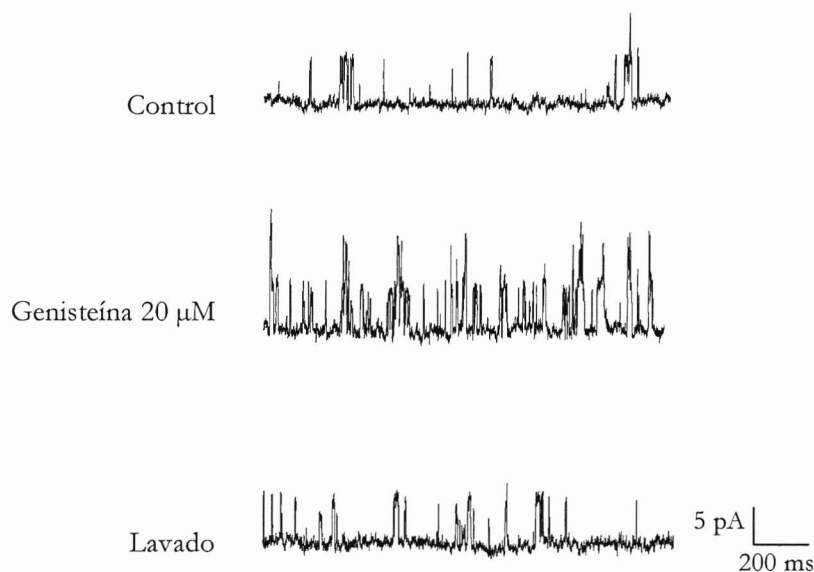


Figura V.21. Registro de corriente de canal único en configuración O-O. Se muestran corrientes de  $K^+$  a través del canal  $BK_{Ca}$  en forma previa (control), en presencia y luego del lavado de Genisteína  $20 \mu M$ .

Si embargo si este ensayo se realizaba en configuración I-O donde la región intracelular del segmento de membrana queda en contacto con la solución de perfusión, Genisteína no producía el efecto activador observado (Datos no mostrados). Este resultado sugiere que Genisteína actúa uniéndose en la región extracelular del canal posiblemente a la subunidad  $\beta$  reguladora del mismo. Esto plantea interesantes perspectivas desde el punto de vista del rol nutracéutico de las isoflavonas, ya que ha sido informado que ratones *knock-out* para dicha subunidad ( $\beta 1^{-/-}$  mice) presentan hipertensión y alteraciones en la reactividad vascular (Brenner y col., 2000; Plüger y col., 2000). Por lo tanto sustancias que puedan interactuar con dicha unidad podrían representar nuevas formas terapéuticas en el tratamiento de patologías cardiovasculares.

# Conclusiones

## VI. CONCLUSIONES

### *Análisis de la interacción entre proteínas de soja e isoflavonas de la serie Genisteína y su distribución durante el proceso de preparación de aislados proteicos*

Se desarrolló un **protocolo experimental** que permitió la determinación cualitativa y cuantitativa de **isoflavonas totales, libres y conjugadas**.

El estudio del efecto de las variables de proceso de obtención de aislados proteicos de soja mostró que el **contenido y el patrón de conjugación de las isoflavonas** de la serie de Genisteína **es dependiente** de dichas variables. En particular aquellas relacionadas con la **maceración de la harina** de partida y las **etapas de extracción alcalina y precipitación ácida** de las proteínas.

El mayor contenido de **Genisteína total** fue obtenido en aislados en los que las proteínas fueron extraídas a pH 8,0 y precipitadas a pH 3,5 o extraídas a pHs 10 -11 y precipitadas a pH 4,5. El incremento del tiempo de precipitación de las proteínas mejoró también la recuperación de isoflavonas en el aislado final.

El **patrón de conjugación** de las isoflavonas de la serie de Genisteína en el aislado proteico sufrió cambios al modificar el pH, el tiempo y la temperatura de precipitación. El **contenido de Malonil-genistina** fue mayor cuando la precipitación proteica se realizó a pHs próximos a 3,5. Los aislados obtenidos por precipitación a pHs 4,5 - 5,6 y 4 °C fueron más ricos en Malonil-genistina que aquellos obtenidos a 20°C. Este efecto no se verificó cuando la precipitación se llevó a cabo a pH 3,5. El contenido de **Genistina** en el aislado fue superior si la precipitación se realizó a baja temperatura. El estudio de los factores que afectan las **interacciones entre las globulinas de reserva de soja y las isoflavonas** mostró que la **Genisteína** presenta una mayor interacción con las proteínas a temperatura ambiente.

La **modificación del patrón de conjugación** de las isoflavonas **incide sobre la afinidad** isoflavonas – proteínas afectando el contenido total de isoflavonas en el producto final.

Se comprobó que la interacción proteínas - isoflavonas de la serie Genisteína es de distinta naturaleza para las formas conjugadas y para la aglucona. En el primer caso la asociación mostró una dependencia con el pH y la temperatura de precipitación proteica.

**Malonil-genistina** no ionizada interactuaría con las proteínas mediante **uniones puente hidrógeno** o interacciones de **naturaleza hidrofóbica dependiendo del grado de desplegamiento de la proteína**. La **aglucona** mostró una mayor afinidad por las proteínas insolubles estableciendo una interacción con las mismas a través de **interacciones hidrofóbicas**.

Las isoflavonas correspondientes a la serie Genisteína presentaron una **mayor afinidad por la fracción glicinina que por la fracción  $\beta$ -conglucina**. Esta asociación es reversible y dependiente del pH. La mayor afinidad con ambas proteínas de almacenamiento se detectó a pH 3,5 en particular para Malonil-genistina.

La aplicación de los conocimientos obtenidos referentes al efecto de las variables del proceso de preparación de aislados proteicos y su incidencia en la interacción proteínas de soja - isoflavonas permitió obtener un **aislado enriquecido en Genisteína total**, con un patrón de conjugación en el que **predominó Genisteína**, la isoflavona de esta serie con **mayor biodisponibilidad y acción biológica**. Este aumento se logró transformando los malonil-ésteres no biodisponibles.

#### *Análisis de los efectos biológicos de Genisteína y Daidzeína sobre el músculo liso como efector importante de los mecanismos de regulación de la presión arterial*

**Genisteína produjo vasorrelajación** en dos tipos de vasos de dos especies diferentes mediante mecanismos que directa o indirectamente disminuyen la  $[Ca^{2+}]_i$ :

En la **aorta de rata**, Genisteína posee un **inmediato e importante efecto vasorrelajante**, especialmente sobre las contracciones arteriales inducidas por el agonista endógeno serotonina. Se observaron efectos directos sobre el músculo liso arterial probablemente **independientes de la inhibición de enzimas tirosina-quinasa**, y de acciones sobre la expresión proteica inducidas por la acción sobre receptores de estrógeno. El mecanismo de acción de Genisteína que se puso en evidencia fue la **activación de canales de  $K^+$  y disminución de la frecuencia de oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$**  en las células se músculo liso estimuladas por dicho agonista. Ambos efectos podrían ser responsables, al menos en parte, de la relajación arterial que produce la Genisteína en la

aorta de rata.

En la **arteria umbilical humana**, Genisteína mostró un **efecto relajante** sobre contracciones inducidas por serotonina y por despolarización. Se observaron efectos directos sobre el músculo liso arterial, probablemente **dependientes de la inhibición de enzimas tirosina-quinasa** ya que en este tejido Daidzeína no mostró efectos significativos. En cuanto a los mecanismos de acción que podrían estar involucrados en su efecto vasodilatador hemos encontrado que Genisteína produce **inhibición sobre mecanismos intracelulares de regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$** ; así como de estructuras presentes en la membrana celular que median directa o indirectamente la entrada de  $Ca^{2+}$  externo – **inhibición de canales selectivos al  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje y canales catiónicos no selectivos** -, estos últimos podrían representar la vía de entrada del influjo capacitativo de  $Ca^{2+}$  **inhibido por Genisteína**. Además, Genisteína presentó un efecto **activador importante sobre los canales de  $K^+$** , mediante un mecanismo que sugiere propiedades similares a otros análogos de estrógenos, y cuyo efecto es la vasorrelajación.

Estos resultados, en su conjunto, muestran que un componente de un producto natural de consumo humano, como es la soja, produce efectos relevantes sobre la contractilidad arterial, lo cual plantea interesantes perspectivas en el campo de la investigación de nutraceuticos. Las posibilidades tecnológicas actuales de analizar la composición de un producto, separar sus componentes, analizar la interacción de los mismos con otras sustancias y sus efectos biológicos *in vitro* e *in vivo*, sin duda incrementará nuestro conocimiento de las propiedades de las sustancias elegidas para la alimentación, así como la generación de dietas o suplementos dietarios que permitan mejorar la calidad de vida del ser humano.

# **Referencias Bibliográficas**



- Adachi, M., J. Kanamori, T. Masuda, K. Yagasaki, K. Kitamura, B. Mikami y S. Utsumi (2003). "Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homo-hexamer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(12): 7395-7400.
- Adachi, M., Y. Takenaka, A. B. Gidamis, B. Mikami y S. Utsumi (2001). "Crystal Structure of Soybean Proglycinin A1aB1b Homotrimer,." *Journal of Molecular Biology* 305(2): 291-305.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya y Y. Fukami (1987). "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases." *Journal of Biological Chemistry* 262(12): 5592-5595.
- Akiyama, T. y H. Ogawara (1991). "Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases." *Methods in Enzymology* 201: 362-370.
- Albert, A. P., A. S. Aromolaran y W. A. Large (2001). "Agents that increase tyrosine phosphorylation activate a non-selective cation current in single rabbit portal vein smooth muscle cells." *Journal of Physiology* 530(2): 207-217.
- Alles, M. S., P. A. M. J. Scholtens y J. G. Bindels (2004). "Current trends in the composition of infant milk formulas." *Current Paediatrics* 14(1): 51-63.
- Anthony, M. S., T. B. Clarkson, C. L. Hughes Jr, T. M. Morgan y G. L. Burke (1996). "Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys." *Journal of Nutrition* 126(1): 43-50.
- AOCS (1996). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes. EEUU, Association of Official Analytical Chemists.
- Barnes, S. (2004). "Soy Isoflavones-Phytoestrogens and What Else?" *Journal of Nutrition* 134(5): 1225S-1228S.
- Barrit, G. J. (1999). "Receptor-activated  $Ca^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $Ca^{2+}$  signalling requirements." *Biochem J* 337: 153-169.
- Berry, C. (2002). "Functional foods." *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians* 95(9): 639-640.
- Bölter, B. y J. Soll (2001). "Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: Open doors or regulated gates?" *EMBO Journal* 20(5): 935-940.

- Brenner, R., G. J. Perez, A. D. Bonev, D. M. Eckman, J. C. Kosek, S. W. Wiler, A. J. Patterson, M. T. Holson y R. W. Aldrich (2000). "Vasoregulation by the  $\beta 1$  subunit of the calcium-activated potassium channel." *Nature* 407(6806): 870-876.
- Brierley, G. P., K. Baysal y D. W. Jung (1994). "Cation transport systems in mitochondria:  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  uniports and exchangers." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26(5): 519-526.
- Carrasco, G., M. A. Cruz, V. Gallardo, A. Dominguez, C. González y P. Miguel (2000). "Transport and Metabolism of Serotonin in the human placenta from normal and severely pre-eclamptic pregnancies." *Gynecologic and Obstetric Investigation* 49(3): 150-155.
- Carrasco, G., M. A. Cruz, V. Gallardo, C. S. González, P. Miguel y M. Lagos (1998). "Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normal and pre-eclamptic pregnancies." *Life Sciences* 62(15): 1323-1332.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels y C. Strübing (2001). "The TRP ion channel family." *Nature Reviews Neuroscience* 2(6): 387-396.
- Coates, J. B., J. S. Medeiros, V. H. Thanh y N. C. Nielsen (1985). "Characterization of the subunits of beta-conglycinin." *Archives of biochemistry and biophysics* 243(1): 184-194.
- Costa, R. S. A. y J. Assrey (2005). "Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation." *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 13(2): 145-151.
- Cotran, R. S., V. Kumar y T. Collins (2000). Patología estructural y funcional de Robbins. Madrid, España, McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U.
- Coward, L., Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S (1993). "Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1961-1967.
- Coward, L., M. Smith, M. Kirk y S. Barnes (1998). "Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing." *American Journal of Clinical Nutrition* 68(6 SUPPL.).
- Cox, D. A. y M. A. Matlib (1993). "A role for the mitochondrial  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* 268(2): 938-947.
- Creighton, T. (1993). Proteins. Structures and Molecular Properties. Nueva York, EEUU, W. H. Freeman & Co.

- Crisafulli, A., D. Altavilla, H. Marini, A. Bitto, F. Squadrito, D. Cucinotta, N. Frisina, G. Squadrito, A. Romeo, M. Buemi, F. Corrado, R. D'Anna, F. Cancellieri, E. B. Adamo y R. Marini (2005). "Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women." *Menopause* 12(2): 186-192.
- Cruz, M. A., V. Gallardo, G. Carrasco, C. González y P. Miguel (1998). "Mediation by 5-HT<sub>2</sub> receptors of 5-hydroxytryptamine-induced contractions of human placental vein." *General Pharmacology* 30(4): 483-488.
- Charalampopoulos, D., R. Wang, S. S. Pandiella y C. Webb (2002). "Application of cereals and cereal components in functional foods: a review." *International Journal of Food Microbiology* 79(1-2): 131-141.
- Chipperfield, A. R. y A. A. Harper (2000). "Chloride in smooth muscle." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 74(3-5): 175-221.
- Dean, W. L., D. Chen, P. C. Brandt y T. C. Vanaman (1997). "Regulation of platelet plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 272(24): 15113-15119.
- Desroches, S., J.-F. Mauger, L. M. Ausman, A. H. Lichtenstein y B. Lamarche (2004). "Soy Protein Favorably Affects LDL Size Independently of Isoflavones in Hypercholesterolemic Men and Women." *Journal of Nutrition* 134(3): 574-579.
- Dick, G. M., C. F. Rossow, S. Smirnov, B. Horowitz y K. M. Sanders (2001). "Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory beta 1 subunit." *Journal of Biological Chemistry* 276(37): 34594-34599.
- Dick, G. M. y K. M. Sanders (2001). "(Xeno)estrogen Sensitivity of Smooth Muscle BK Channels Conferred by the Regulatory  $\beta$ 1 Subunit: A study of  $\beta$ 1 knockout mice." *Journal of Biological Chemistry* 276(48): 44835-44840.
- Dixon, R. A. y D. Ferreira (2002). "Genistein." *Phytochemistry* 60(3): 205-211.
- Dogan, N., E. Cicek, A. G. Cenik, E. Singirik, M. Kilic y A. S. Ozcan (1991). "5-Hydroxytryptamine-induced contraction of human isolated umbilical artery and its dependence on cellular and extracellular Ca<sup>++</sup>." *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 312: 79-85.
- Drewnowski, A. y C. Gomez-Carneros (2000). "Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review." *Am. J. Clinical Nutrition* 72(6): 1424-1435.
- Duranti, M., V. Dani, A. Barbiroli, A. Scarafoni, M. R. Lovati, S. Castiglioni, C. Ponzzone y P. Morazzoni (2004). "The  $\alpha'$  subunit from soybean 7S globulin lowers plasma

- lipids and upregulates liver  $\beta$ -VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet." *Journal of Nutrition* 134(6): 1334-1339.
- Erickson, D. R. (1995). Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization. Champaign, Illinois, AOCS Press & United Soybean Board.
- Fanchaouy, M., K. Serir, J. L. Beny, R. Bychkov y J. J. Meister (2005). "Intercellular communication: Role of gap junctions in establishing the pattern of ATP-elicited  $Ca^{2+}$  oscillations and  $Ca^{2+}$ -dependent currents in freshly isolated aortic smooth muscle cells." *Cell Calcium* 37(1): 25-34.
- Fang, N., S. Yu y T. M. Badger (2004). "Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12): 4012-4020.
- Finley, J. W. (2005). "Proposed Criteria for Assessing the Efficacy of Cancer Reduction by Plant Foods Enriched in Carotenoids, Glucosinolates, Polyphenols and Selenocompounds." *Ann. Bot.* 95(7): 1075-1096.
- Fox, S. B. y T. Y. Khong (1990). "Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study." *Placenta* 11(1): 59-62.
- Franke, A. A., J. H. Hankin, G. Maskarinec, L. J. Custer, M. C. Yu y S. H. Low (1999). "Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(3): 977-986.
- Fukui, K., N. Tachibana, S. Wanezaki, S. Tsuzaki, K. Takamatsu, T. Yamamoto, Y. Hashimoto y T. Shimoda (2002). "Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(20): 5717-5721.
- Fukushima, D. (1991). "Recent Progress of Soybean Proteins Foods: Chemistry, Technology, and Nutrition." *Food Reviews International* 7(3): 323-351.
- Gardner, C., M. Messina, L. D. Lawson y J. W. Farquhar (2003). "Soy, garlic, and ginkgo biloba: Their potential role in cardiovascular disease prevention and treatment." *Current Atherosclerosis Reports* 5(6): 468-475.
- Garland, C. J. (1987). "The role of membrane depolarization in the contractile response of the rabbit basilar artery to 5-hydroxytryptamine." *Journal of Physiology* 392: 333-348.
- Gibbs, B. F., R. Masse, A. Zougman y C. Mulligan (2004). "Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food." *Food Research International* 37(2): 123-131.

- Gidley, M. J. (2004). "Naturally functional foods - challenges and opportunities." *Asia Pac J Clin Nutr* 13(Suppl): S31.
- Gincel, D. y V. Shoshan-Barmatz (2004). "Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36(2): 179-186.
- Grace, P. B., J. I. Taylor, Y.-L. Low, R. N. Luben, A. A. Mulligan, N. P. Botting, M. Dowsett, A. A. Welch, K.-T. Khaw, N. J. Wareham, N. E. Day y S. A. Bingham (2004). "Phytoestrogen Concentrations in Serum and Spot Urine as Biomarkers for Dietary Phytoestrogen Intake and Their Relation to Breast Cancer Risk in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(5): 698-708.
- Gudbrandsen, O. A., H. Wergedahl, R. K. Berge, B. Liaset y M. Espe (2005). "Dietary proteins with high isoflavone content or low methionine-glycine and lysine-arginine ratios are hypocholesterolaemic and lower the plasma homocysteine level in male Zucker fa/fa rats." *British Journal of Nutrition* 94(3): 321-330.
- Guerini, D. (1998). "The  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and the  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchangers." *BioMetals* 11(4): 319-330.
- Haddock, R. E. y C. E. Hill (2005). "Rhythmicity in arterial smooth muscle." *Journal of Physiology* 566(3): 645-656.
- Hamill, O. P., A. Marty y E. Neher (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 391(2): 85-100.
- Hasler, C. M. (2000). "The Changing Face of Functional Foods." *J. Am. Coll. Nutr.* 19(90005): 499S-506.
- Hasler, C. M. (2002). "The cardiovascular effects of soy products." *The Journal of cardiovascular nursing* 16(4): 50-63; quiz 75.
- Hasler, C. M., S. Kundrat y D. Wool (2000). "Functional foods and cardiovascular disease." *Curr Atheroscler Rep* 2(6): 467-75.
- Heinonen, S. M., H. Adlercreutz y K. Wähälä (2004). "Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(22): 6802-6809.
- Honore, E. K., J. K. Williams, M. S. Anthony y T. B. Clarkson (1997). "Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques." *Fertility and Sterility* 67(1): 148-154.

- Hungria, M., A. W. Johnston y D. A. Phillips (1992). "Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli." *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 5(3): 199-203.
- Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito y Y. Mori (2001). "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular  $\alpha_1$ -adrenoceptor-activated  $Ca^{2+}$ -permeable cation channel." *Circulation Research* 88(3): 325-332.
- Ismail, B. y K. Hayes (2005). " $\beta$ -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(12): 4918-4924.
- Jackson, C. J. C., J. P. Dini, C. Lavandier, H. P. V. Rupasinghe, H. Faulkner, V. Poysa, D. Buzzell y S. DeGrandis (2002). "Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu." *Process Biochemistry* 37(10): 1117-1123.
- Jeffery, E. (2005). "Component Interactions for Efficacy of Functional Foods." *J. Nutr.* 135(5): 1223-1225.
- Jenkins, D. J. A. y C. W. C. Kendall (1999). "Plant Sterols, Health Claims and Strategies to Reduce Cardiovascular Disease Risk." *J. Am. Coll. Nutr.* 18(6): 559-562.
- Jenkins, D. J. A., C. W. C. Kendall, C. J. C. Jackson, P. W. Connelly, T. Parker, D. Faulkner, E. Vidgen, S. C. Cunnane, L. A. Leiter y R. G. Josse (2002). "Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women." *American Journal of Clinical Nutrition* 76(2): 365-372.
- Jones, P. J. (2002). "Clinical nutrition: 7. Functional foods -- more than just nutrition." *Can. Med. Assoc. J.* 166(12): 1555-1563.
- Kang, T. M., M. K. Park y D. Y. Uhm (2003). "Effects of hypoxia and mitochondrial inhibition on the capacitative calcium entry in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells." *Life Sciences* 72(13): 1467-1479.
- Kao, F. J., N. W. Su y M. H. Lee (2004). "Effect of Water-to-Bean Ratio on the Contents and Compositions of Isoflavones in Tofu." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(8): 2277-2281.
- Karaki, H., H. Ozaki, M. Hori, M. Mitsui-Saito, K. I. Amano, K. I. Harada, S. Miyamoto, H. Nakazawa, K. J. Won y K. Sato (1997). "Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle." *Pharmacological Reviews* 49(2): 157-230.

- Kaur, I. P., K. Chopra y A. Saini (2002). "Probiotics: potential pharmaceutical applications." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15(1): 1-9.
- Kawakami, Y., W. Tsurugasaki, S. Nakamura y K. Osada (2005). "Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol." *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(4): 205-212.
- Kerckhoffs, D. A. J. M., F. Brouns, G. Hornstra y R. P. Mensink (2002). "Effects on the human serum lipoprotein profile of  $\beta$ -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols." *Journal of Nutrition* 132(9): 2494-2505.
- Kim, K. S., S. Kim, H. J. Yang y D. Y. Kwon (2004). "Changes of glycinin conformation due to pH, heat and salt determined by differential scanning calorimetry and circular dichroism." *International Journal of Food Science and Technology* 39(4): 385-393.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky y D. E. Clapham (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." *Nature* 427(6972): 360-364.
- Kitamura, K. y J. Yamazaki (2001). "Chloride channels and their functional roles in smooth muscle tone in the vasculature." *Japanese Journal of Pharmacology* 85(4): 351-357.
- Klump, S. P., M. C. Allred, J. L. MacDonald y J. M. Ballam (2001). "Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: Collaborative study." *Journal of AOAC International* 84(6): 1865-1883.
- Kris-Etherton, P. M., K. D. Hecker, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, A. E. Griel, T. D. Etherton y A. Bonanome (2002). "Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer." *American Journal of Medicine* 113(9 SUPPL. 2).
- Kuiper, G. G. J. M., J. A. Gustafsson, B. Carlsson, J. G. Lemmen, P. T. Van Der Saag, B. Van Der Burg, J. C. Corton y S. H. Safe (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ " *Endocrinology* 139(10): 4252-4263.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-685.
- Lakemond, C. M. M., H. H. J. De Jongh, M. Hessing, H. Gruppen y A. G. J. Voragen (2000). "Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and

- molecular structure at ambient temperatures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 1985-1990.
- Lakemond, C. M. M., M. Hessing, H. Gruppen, A. G. J. Voragen y H. H. J. De Jongh (2000). "Heat denaturation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on molecular structure." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 1991-1995.
- Lee, C. H., R. Rahimian, T. Szado, J. Sandhu, D. Poburko, T. Behra, L. Chan y C. Van Breemen (2002). "Sequential opening of IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels and SOC during  $\beta$ -adrenergic activation of rabbit vena cava." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282(5 51-5).
- Levy, J. (1998). "Immunonutrition: the pediatric experience." *Nutrition* 14(7-8): 641-647.
- Li, H. F., S. Y. Qu y L. D. Wang (2004). "Phytoestrogen genistein decreases contractile response of aortic artery in vitro and arterial blood pressure in vivo." *Acta Pharmacologica Sinica* 25(3): 313-318.
- Lichtenstein, A. H. (2000). "Soy Protein, Isoflavones and Cardiovascular Disease Risk." *Journal of Nutrition* 130(1 SUPPL.): 1589-1592.
- Liu, H., K. Li y N. Sperelakis (1997). "Tyrosine kinase inhibitor, genistein, inhibits macroscopic L-type calcium current in rat portal vein smooth muscle cells." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75(9): 1058-1062.
- Liu, H. y N. Sperelakis (1997). "Tyrosine kinases modulate the activity of single L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells from rat portal vein." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75(9): 1063-1068.
- Liu, J., S. K. C. Chang y D. Wiesenborn (2005). "Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 2333-2340.
- Lo, W. M. Y. y E. C. Y. Li-Chan (2005). "Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(9): 3369-3376.
- Lobatón, C. D., L. Vay, E. Hernández-SanMiguel, J. SantoDomingo, A. Moreno, M. Montero y J. Alvarez (2005). "Modulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by estrogen receptor agonists and antagonists." *British Journal of Pharmacology* 145(7): 862-871.
- Lovati, M. R. M., C.; Corsini, A.; Granata, A.; Frattini, y R. S. R.; Fumagalli (1992). "Low-density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture." *Journal of Nutrition* 122: 1971-1978.



- Luo, D., M. Nakazawa, Y. Yoshida, J. Cai y S. Imai (2000). "Effects of three different  $\text{Ca}^{2+}$  pump ATPase inhibitors on evoked contractions in rabbit aorta and activities of  $\text{Ca}^{2+}$  pump ATPases in porcine aorta." *Vascular Pharmacology* 34(3): 211-220.
- MacDonald, R. S., J. Guo, J. Copeland, J. D. Browning, Jr., D. Sleper, G. E. Rottinghaus y M. A. Berhow (2005). "Environmental Influences on Isoflavones and Saponins in Soybeans and Their Role in Colon Cancer." *J. Nutr.* 135(5): 1239-1242.
- Mannella, C. A. (1997). "Minireview: On the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29(6): 525-531.
- Marcus, Y. (1993). "The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents." *Chemical Society Reviews* 22(6): 409-416.
- Maruyama, Y., N. Maruyama, B. Mikami y S. Utsumi (2004). "Structure of the core region of the soybean beta-conglycinin alpha' subunit." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 2): 289-97.
- Matsuura, M., A. Obata y D. Fukushima (1989). "Objectionable Flavor of Soy Milk Developed during the Soaking of Soybeans and its Control." *Journal of Food Science* 54(3): 602-605.
- Mazur, W. M., H. Adlercreutz, J. A. Duke, K. Wähälä y S. Rasku (1998). "Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans." *Journal of Nutritional Biochemistry* 9(4): 193-200.
- McIntosh, G. H. y R. K. Le Leu (2001). "The influence of dietary proteins on colon cancer risk." *Nutr Res* 21(7): 1053-1066.
- McLeod, G. S. y M. J. Shepherd (2000). "Determination of the ionisation constants of isoflavones by capillary electrophoresis." *Phytochemical Analysis* 11(5): 322-326.
- Messina, M. (2003). "Soyfoods and disease prevention: Part II - Osteoporosis, breast cancer, and hot flushes." *Agro Food Industry Hi-Tech* 14(6): 11-13.
- Michalak, M., E. F. Corbett, N. Mesacli, K. Nakamura y M. Opas (1999). "Calreticulin: One protein, one gene, many functions." *Biochemical Journal* 344(2): 281-292.
- Milner, J. A. (1999). "Functional foods and health promotion." *Journal of Nutrition* 129(7 SUPPL.): 1395S-1397S.
- Montero, M., C. D. Lobatón, E. Hernández-Sanmiguel, J. Santodomingo, L. Vay, A. Moreno y J. Alvarez (2004). "Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids." *Biochemical Journal* 384(1): 19-24.

- Moriyama, T., K. Kishimoto, K. Nagai, R. Urade, T. Ogawa, S. Utsumi, N. Maruyama y M. Maebuchi (2004). "Soybean  $\beta$ -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of  $\beta$ -oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68(2): 352-359.
- Nagano, T., M. Hirotsuka, H. Mori, K. Kolyama y K. Nishinari (1992). "Dynamic Viscoelastic Study on the Gelation of 7S Globulin from Soybeans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(6): 941 - 944.
- Naim, M., B. Gestetner, A. Bondi y Y. Birk (1976). "Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones." *Journal of agricultural and food chemistry* 24(6): 1174-1177.
- Nakamura, Y., A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, S. Ishimitsu y Y. Tonogai (2001). "Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan." *Journal of Health Science* 47(4): 394-406.
- Nelson, M. T. y J. M. Quayle (1995). "Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 268(4 37-4).
- Nelson, S. R., T. Chien y J. Di Salvo (1997). "Genistein sensitivity of calcium transport pathways in serotonin- activated vascular smooth muscle cells." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 345(1): 65-72.
- Nestel, P. J., T. Yamashita, T. Sasahara, S. Pomeroy, A. Dart, P. Komesaroff, A. Owen y M. Abbey (1997). "Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17(12): 3392-3398.
- Nevala, R., M. Lassila, P. Finckenberg, K. Paukku, R. Korpela y H. Vapaatalo (2002). "Genistein treatment reduces arterial contractions by inhibiting tyrosine kinases in ovariectomized hypertensive rats." *European Journal of Pharmacology* 452(1): 87-96.
- Nevala, R., K. Paukku, R. Korpela y H. Vapaatalo (2001). "Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro." *Life Sciences* 69(12): 1407-1417.
- Nicholls, J. A., J. R. Greenwell y J. I. Gillespie (1995). "Agonist concentration influences the pattern and time course of intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations in human arterial smooth muscle cells." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 429(4): 477-484.

- Nielsen, N. C. (1985). "The Structure and Complexity of the 11S Polypeptides in Soybeans." *62*(12): 1680-1686.
- Ohta, T., W. Yasuda, A. Hasegawa, S. Ito y Y. Nakazato (2000). "Effects of inhibitors for tyrosine kinase and non-selective cation channel on capacitative  $Ca^{2+}$  entry in rat ileal smooth muscle." *European Journal of Pharmacology* *387*(2): 211-220.
- OMS, (2004). "Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases." *Technical Report Series* 916.
- Otsuka, K., H. Tanaka, K. Shigenobu, Y. Tanaka, T. Horinouchi y K. Koike (2002). "Functional contribution of voltage-dependent and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  (BKCa) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides." *Journal of Smooth Muscle Research* *38*(4-5): 117-129.
- Parekh, A. B. y R. Penner (1997). "Store depletion and calcium influx." *Physiological Reviews* *77*(4): 901-930.
- Pereira, D. I. A. y G. R. Gibson (2002). "Effects of Consumption of Probiotics and Prebiotics on Serum Lipid Levels in Humans." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* *37*(4): 259-281.
- Periti, P. y F. Tonelli (2002). "Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies." *Digestive and Liver Disease* *34*(Supplement 2): S87-S97.
- Piiper, A. y S. Zeuzem (2004). "Receptor tyrosine kinases are signaling intermediates of G protein-coupled receptors." *Current Pharmaceutical Design* *10*(28): 3539-3545.
- Piskula, M. K. (2000). "Factors affecting flavonoids absorption." *BioFactors* *12*(1-4): 175-180.
- Piskula, M. K., J. Yamakoshi y Y. Iwai (1999). "Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach." *FEBS Letters* *447*(2-3): 287-291.
- Plant, T. D. y M. Schaefer (2005). "Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* *371*(4): 266-276.
- Platt, R. (2000). "Current concepts in optimum nutrition for cardiovascular disease." *Prev Cardiol* *3*(2): 83-87.
- Plüger, S., J. Faulhaber, M. Fürstenau, M. Löhn, R. Waldschütz, M. Gollasch, H. Haller, F. C. Luft, H. Ehmke y O. Pongs (2000). "Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal  $Ca^{2+}$  spark/STOC coupling and elevated blood pressure." *Circulation research* *87*(11).
- Quinn, T., M. Molloy, A. Smyth y A. W. Baird (2004). "Capacitative calcium entry in guinea pig gallbladder smooth muscle in vitro." *Life Sciences* *74*(13): 1659-1669.

- Raingo, J., A. Rebolledo, F. Iveli, A. O. Grassi de Gende y V. Milesi (2004). "Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries." *Placenta* 25(8-9): 723-729.
- Rickert, D. A., M. A. Meyer, J. Hu y P. A. Murphy (2004). "Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production." *Journal of Food Science* 69(8).
- Rosell, M. S., P. N. Appleby, E. A. Spencer y T. J. Key (2004). "Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *The American journal of clinical nutrition* 80(5): 1391-1396.
- Saini, H. K., S. K. Sharma, P. Zahradka, H. Kumamoto, N. S. Dhalla y N. Takeda (2003). "Attenuation of the serotonin-induced increase in intracellular calcium in rat aortic smooth muscle cells by sarpogrelate." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81(11): 1056-1063.
- Schaible, U. E. y S. H. E. Kaufmann (2005). "A nutritive view on the host-pathogen interplay." *Trends in Microbiology* 13(8): 373-380.
- Setchell, K. D. R. (2001). "Soy isoflavones - Benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs)." *Journal of the American College of Nutrition* 20(5 SUPPL.).
- Simons, A. L., M. Renouf, S. Hendrich y P. A. Murphy (2005). "Human gut microbial degradation of flavonoids: Structure-function relationships." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4258-4263.
- Sivesind, E. y P. Seguin (2005). "Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(16): 6397-6402.
- Song, M. S., D. Wang y K. H. Row (2004). "Protein binding study of isoflavones by high-performance frontal analysis." *Chromatographia* 59(7-8): 437-441.
- Song, T., S. O. Lee, P. A. Murphy y S. Hendrich (2003). "Soy protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen plasma cholesterol levels in golden Syrian hamsters." *Experimental Biology and Medicine* 228(9): 1063-1068.
- Spivack, M. (1946). "The anatomic peculiarities of the human umbilical cord and their clinical significance. ." *Am J Obstet Gynecol* 52: 387-401.

- Squadrito, F., D. Altavilla, N. Morabito, A. Crisafulli, R. D'Anna, F. Corrado, P. Ruggeri, G. M. Campo, G. Calapai, A. P. Caputi y G. Squadrito (2002). "The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women." *Atherosclerosis* 163(2): 339-347.
- Steinberg, D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance." *Journal of Biological Chemistry* 272(34): 20963-20966.
- Steusloff, A., E. Paul, L. A. Semenchuk, J. Di Salvo y G. Pfitzer (1995). "Modulation of Ca<sup>2+</sup> sensitivity in smooth muscle by genistein and protein tyrosine phosphorylation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320(2): 236-242.
- Szado, T., K. H. Kuo, D. Poburko, C. H. Lee, C. Seow, C. Van Breemen, K. Bernard-Helary y U. T. Ruegg (2003). "Agonist-induced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle." *FASEB Journal* 17(1): 28-37.
- Tachibana, N., K. Fukui, K. Takamatsu, I. Matsumoto, H. Kato, K. Abe y S. Arai (2005). "Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4253-4257.
- Takahashi, N., H. Aizawa, S. Fukuyama, H. Inoue, S. Nishima y N. Hara (2000). "Thapsigargin, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor, relaxes guinea pig tracheal smooth muscle by producing epithelium-dependent relaxing factors." *European Journal of Pharmacology* 410(1): 61-68.
- Thanh, V. H. y K. Shibasaki (1976). "Heterogeneity of beta-conglycinin." *Biochimica et Biophysica Acta*. 439: 326-338.
- Thanh, V. H. y K. Shibasaki (1977). "Beta conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms." *Biochimica et Biophysica Acta* 490(2): 370-384.
- Thanh, V. H. y K. Shibasaki (1978). "Major Proteins of Soybean Seeds. Subunit Structure of B-Conglycinin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3): 692-695.
- Tikkanen, M. J., V. Vihma, K. Wähälä, S. Ojala y H. Adlercreutz (1998). "Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3106-3110.
- Tjoelker, L. W., C. E. Seyfried, R. L. Eddy Jr, M. G. Byers, T. B. Shows, J. Calderon, R. B. Schreiber y P. W. Gray (1994). "Human, mouse, and rat calnexin cDNA

- cloning: Identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5." *Biochemistry* 33(11): 3229-3236.
- Tsai, M. H. y M. J. Jiang (2005). "Extracellular signal-regulated kinase1/2 in contraction of vascular smooth muscle." *Life Sciences* 76(8): 877-888.
- Tsumura, K., W. Kugimiya, M. Kuwada, Y. Shimura y H. Hasumi (2004). "Kinetic study on conformational change in a single molecular species,  $\beta_3$ , of  $\beta$ -conglycinin in an acidic ethanol solution." *Protein Journal* 23(6): 361-369.
- Tsumura, K., T. Saito, K. Tsuge, H. Ashida, W. Kugimiya y K. Inouye (2005). "Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis." *Food Science and Technology* 38(3): 255-261.
- Tuohy, K. M., H. M. Probert, C. W. Smejkal y G. R. Gibson (2003). "Using probiotics and prebiotics to improve gut health." *Drug Discovery Today* 8(15): 692-700.
- Turner, N. J., B. M. Thomson y I. C. Shaw (2003). "Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability." *Nutr Rev* 61(6 Pt 1): 204-13.
- Uenishi, K. (2005). "Recommended soy and soy products intake to prevent bone fracture and osteoporosis." *Clinical calcium* 15(8): 1393-1398.
- Utsumi, S. (1992). Plant Food Protein Engineering. Advances in Food and Nutrition Research. J. E. Kinsella. San Diego, CA, USA., Academic Press. **36**: 89-208.
- Utsumi, S., Y. Matsumura y T. Mori (1997). Structure-function relationships of soy proteins. Food Proteins and Their Applications. Damodaran S and Paraf A. New York., Marcel Dekker: 257-291.
- Valverde, M. A., P. Rojas, J. Amigo, D. Cosmelli, P. Orio, M. I. Bahamonde, C. Vergara, R. Latorre y G. E. Mann (1999). "Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit." *Science* 285(5435): 1929-1931.
- Vega-López, S., K. J. Yeum, J. L. Lecker, L. M. Ausman, E. J. Johnson, S. Devaraj, I. Jialal y A. H. Lichtenstein (2005). "Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones." *The American journal of clinical nutrition* 81(1): 43-49.
- Vis, E. H., G. J. Geerse, E. S. Klaassens, G. M. Alink y M. A. J. S. Van Boekel (2005). "Possible mechanisms behind the differential effects of soy protein and casein feedings on colon cancer biomarkers in the rat." *Nutrition and Cancer* 51(1): 37-44.
- Wagner, J. D., L. Zhang, M. S. Anthony, R. M. Blair, M. K. Shadoan, J. K. Williams, D. C. Schwenke y K. A. Greaves (2003). "Soy Protein with Isoflavones, but not an

- Isoflavone-Rich Supplement, Improves Arterial Low-Density Lipoprotein Metabolism and Atherogenesis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23(12): 2241-2246.
- Wagner, J. R., D. A. Sorgentini y M. C. Anon (2000). "Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8): 3159-3165.
- Walker, H. A., T. S. Dean, T. A. B. Sanders, G. Jackson, J. M. Ritter y P. J. Chowienczyk (2001). "The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17 $\beta$ estradiol." *Circulation* 103(2): 258-262.
- Walker, W. A. y L. C. Duffy (1998). "Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9(12): 668-675.
- Wallace, P., S. Ayman, I. McFadzean y A. Gibson (1999). "Thapsigargin-induced tone and capacitance calcium influx in mouse anococcygeus smooth muscle cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 360(4): 368-375.
- Wang, H. J. y P. A. Murphy (1996). "Mass Balance Study of Isoflavones during Soybean Processing." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(8): 2377-2383.
- Wansink, B., R. E. Westgren y M. M. Cheney (2005). "Hierarchy of nutritional knowledge that relates to the consumption of a functional food." *Nutrition* 21(2): 264-8.
- Weaver, C. M. y J. M. K. Cheong (2005). "Soy Isoflavones and Bone Health: The Relationship Is Still Unclear." *J. Nutr.* 135(5): 1243-1247.
- Wijetunge, S., C. Aalkjaer, M. Schachter y A. D. Hughes (1992). "Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(3): 1620-1623.
- Zafar, T. A., C. M. Weaver, K. Jones, S. Barnes y D. R. Moore II (2004). "Inulin Effects on Bioavailability of Soy Isoflavones and Their Calcium Absorption Enhancing Ability." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(10): 2827-2831.
- Zubillaga, M., R. Weill, E. Postaire, C. Goldman, R. Caro y J. Boccio (2001). "Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases." *Nutrition Research* 21(3): 569-579.

