



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE AMPK POR GENISTEÍNA INDEPENDIENTE
DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN LA LÍNEA CELULAR C2C12.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MC BERENICE PALACIOS GONZÁLEZ

DR. ARMADO R. TOVAR PALACIO

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN

Dra. Martha Menjivar Iraheta, Facultad de Química

Dr. Ángel Zarain Herzberg, Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. 8 de enero de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
Leptina	3
Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK por sus siglas en inglés (<i>Adenin Monophosphate activated Protein-Kinase</i>)).	5
Adiponectina	9
Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PGC-1 α por sus siglas en inglés: <i>PPARγ coactivator- 1α</i>).	10
SIRT1 (homólogo del regulador de silenciamiento de información).	12
Gasto energético	12
ANTECEDENTES DEL PROYECTO	13
Contenido de isoflavonas.	14
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
DIAGRAMA DE FLUJO	
Estudio piloto in vivo	20
Estudio piloto in vitro	21
Estudio piloto in vivo (crónico)	22
Estudio piloto in vivo (agudo)	22
METODOLOGÍA	
1. Estudio piloto in vivo	
1.1. Obtención de muestras y tejidos	23
1.2. Determinación de glucosa en suero	24
1.3. Determinación de la fosforilación de AMPK por medio de la técnica Inmunoblot	24
1.4. Determinación de la acetilación de PGC1 α por medio de la técnica Inmunoblot	25
1.5. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real)	
2. Estudios in vitro	
2.1. Producción de la línea celular C2C12 que exprese de manera estable el shRNA del receptor de leptina (sh ObR).	25
2.2. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real).	26
2.3. Determinación de la proteína ObR mediante de la técnica de inmunoblot.	
3. Estimulación de miotúbulos con genisteína.	
3.1. Determinación de las proteínas AMPK y AMPK (pT172AMPK) mediante de la técnica de inmunoblot.	28
3.2. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real).	28
3.3. Determinación de la acetilación de PGC1 α por medio de la técnica inmunoblot.	28
3.4. Determinación de la concentración de AMPc	29
3.5. Determinación de la oxidación de palmitato [C ¹⁴].	29
4. Estimulación de miotúbulos con genisteína e inhibidores o activadores.	30
5. Estudio in vivo del consumo crónico de genisteína	30

5.1. Prueba de tolerancia a la glucosa	31
5.2. Gasto energético	31
5.3. Parámetros bioquímicos, expresión de genes y fosforilación de AMPK	31
6. Estudio in vivo inyección intraperitoneal de genisteína	
6.1. Gasto energético	

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 32

RESULTADOS

1. Estudio piloto in vivo	
1.1. Ganancia de peso de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína	33
1.2. Determinación del estado de fosforilación de la AMPK en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína	33
1.3. Determinación de la expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1 en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína.	34
1.4. Determinación de la desacetilación de PGC1 α en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína	35 36
2. Producción de la línea celular C2C12 ^{sh ObR} .	37
2.1. Selección de células transformantes estables con fármaco (G418).	38
2.2. Inmunoblot de ObR en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} .	39
3. Curva temporal, para determinar el tiempo y dosis adecuadas de estimulación con isoflavonas en células C2C12 ^{silvestres} diferenciadas.	
3.1. Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína, leptina o leptina y genisteína.	41
4. Vía SIRT1	
4.1. Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína, sirtinol, o Compuesto C.	42
5. Vía inhibidor de fosfodiesterasas (PDE)	
5.1. Determinación de la acumulación de AMPc en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína.	46
5.2. Inmunoblot de pJAK2y JAK2 total en músculo esquelético de ratas Zucker <i>fa/fa</i> alimentadas con aislado de proteína de soya.	47
5.3. Inmunoblot de pJAK2, JAK2, pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} tratadas con genisteína.	48
5.4. Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o AG490.	49
5.5. Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o U73122.	51
5.6. Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o Dantroleno.	52
5.7. Inmunoblot de pJAK2, JAK2, pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o el agonista de epac1	53
6. Efecto de la genisteína sobre la oxidación de ácidos grasos en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR}	
6.1. Determinación de la oxidación de palmitato [¹⁴ C] en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína	54
6.2. Determinación de la oxidación de palmitato [¹⁴ C] en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o con inhibidor de SIRT1 o de la actividad cinasa de AMPK	55

7.	Efecto sobre la expresión de genes	
7.1.	Determinación de la expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α , SIRT1 en células C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR} tratadas con genisteína.	57
7.2.	Determinación de la expresión génica de CPT1 en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR} tratadas con genisteína, resveratrol o sirtinol.	57
7.3.	Determinación de la expresión génica de SIRT1 en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR} tratadas con Genisteína, Resveratrol o sirtinol	
7.4.	Determinación de la expresión génica de CPT1 en células C2C12 ^{silvestre} tratadas con Genisteína, AICAR y Compuesto C.	58
8.	Efecto de la genisteína en un modelo de obesidad.	59
8.1.	Determinación de la ganancia de peso y de las concentraciones de glucosa y de triglicéridos en suero de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.	60
8.2.	Determinación de la expresión de genes y de la fosforilación de AMPK en músculo esquelético de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.	60
8.3.	Determinación del gasto energético de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.	61
8.4.	Determinación del la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.	62
9.	Efecto agudo de genisteína.	
9.1.	Determinación de la ganancia de peso y el gasto energético de ratones inyectados intraperitonealmente con genisteína durante 5 días.	63
	DISCUSIÓN	65
	CONCLUSIÓN	71
	BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Señalización de leptina	5
Fig. 2. Estructura y activación de la AMPK.	6
Fig. 3. Funciones de AMPK.	7
Fig.4. Activadores de AMPK	8
Fig.5. Activación de la AMPK mediante adiponectina.	9
Fig. 6. Activación de AMPK	11
Fig.7. Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (<i>Vastus lateralis</i>) de ratas Zucker <i>fa/fa</i> .	13
Fig. 8 Activación de AMPK mediante resveratrol.	16
Fig. 9 Expresión del receptor de leptina (ObR) de ratón en extractos de C2C12 silvestres y C2C12 ^{sh ObR}	39
Fig. 10. Efecto de la genisteína sobre receptores de tirosina cinasa	40
Fig 11. Mecanismo de activación de AMPK independiente del receptor de leptina mediado por genisteína	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP-3, CPT1, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético de ratas Zucker <i>fa/fa</i> .	12
Tabla 2. Composición porcentual de la dieta (AIN-93).	23
Tabla 3. Composición porcentual de la dieta	30
Tabla 4. Concentración de plásmidos que codifican para el shRNA del receptor de leptina.	36
Tabla 5. Efecto del consumo de genisteína (0.2%) con una dieta alta en grasa en la peso, el consumo de alimento, y las concentraciones de glucosa y triglicéridos en suero de ratones macho C57BL6.	60

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker <i>fa/fa</i>	14
Gráfica 2. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el peso de ratas Wistar	33
Gráfica 3. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Wistar	34
Gráfica 4. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la expresión génica de PGC1 α , SIRT1, PPAR δ , UCP3 y CPT1 en músculo esquelético de ratas Wistar	35
Gráfica 5. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la acetilación de PGC1 α en músculo esquelético de ratas Wistar	35
Gráfica 6. Determinación del % de silenciamientos en células C2C12 transfectadas con los diferentes plásmidos del shRNA del receptor de leptina (sh ObR).	36
Gráfica 7. Curva dosis respuesta de neomicina en células C2C12 para conocer la concentración efectiva de medicamento para generar transfectantes estables	37
Gráfica 8. Determinación del % de eficiencia de silenciamiento en células C2C12	

transfectadas con el plásmido 2 y 3 del shRNA del receptor de leptina (sh ObR).	38
Gráfica 9. Determinación del % de eficiencia de silenciamiento en células C2C12 seleccionadas mediante dilución (clona 4.1, 4.4 y 32.1) transfectadas con el plásmido 2 y 3 del shRNA del receptor de leptina (sh ObR)	39
Gráfica 10. Efecto de diferentes concentraciones (5, 10 o 20 μ M) de isoflavonas a los tiempos 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestre}	40
Gráfica 11. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 ng de leptina y 10 ng de leptina + 10 μ M de genisteína a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	41
Gráfica 12. Efecto de 10 μ M de genisteína, 40 μ M de Sirtinol, 10 μ M de genisteína con 40 μ M de Sirtinol, 20 μ M de Compuesto C y 10 μ M de genisteína con 20 μ M de Compuesto C a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	44
Gráfica 13. Efecto de 10 μ M de genisteína, 50 μ M Resveratrol, 10 μ M de genisteína con 40 μ M de Sirtinol, 50 μ M Resveratrol con 40 μ M de Sirtinol y 40 μ M de Sirtinol, 10 μ M de genisteína, 2mM de AICAR, 10 μ M de genisteína con 20 μ M de Compuesto C, a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	45
Gráfica 14. Efecto de 10 μ M de genisteína 0.125 mM de IBMx a los 0, 30, 45 y 60 min sobre el incremento en la acumulación de AMPc en las líneas celulares C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	46
Gráfica 15. Efecto del consumo de proteína de soya sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker fa/fa.	47
Gráfica 16 Efecto de 10 μ M de genisteína sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	48
Gráfica 17. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 μ M de AG490, 10 μ M de AG490 + 10 μ M de genisteína, 1 μ M de U73122, 1 μ M de U73122 + 10 μ M de genisteína, 5mM de dantroleno y 5mM de dantroleno + 10 μ M de genisteína a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	50
Gráfica 18. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 μ M de agonista de epac1 a los 60 min y 4 hrs respectivamente sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	53
Gráfica 19. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 μ M de agonista de epac1 a los 60 min y 4 hrs respectivamente sobre la fosforilación de AMPK en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	53
Gráfica 20. Efecto de 10, 50, 100 y 500 μ M de palmitato marcado a los 30, 60, 120, 240 y 480 min sobre la liberación de ¹⁴ CO ₂ en la línea celular C2C12 ^{silvestre}	54
Gráfica 21. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 ng de leptina, 10 μ M de genisteína+ 10 ng de leptina, 80 μ M de etomoxir y 10 μ M de genisteína+ 80 μ M de etomoxir sobre la liberación de ¹⁴ CO ₂ en la línea celular C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	55
Gráfica 22. Efecto de 10 μ M de genisteína, 40 μ M de Sirtinol, 10 μ M de genisteína con 40 μ M de Sirtinol, 20 μ M de Compuesto C y 10 μ M de genisteína con 20 μ M de Compuesto C a los 60 min sobre la liberación de ¹⁴ CO ₂ en la línea celular C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	56
Gráfica 23. Efecto de 10 μ M de genisteína sobre la expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α , SIRT1 en células C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR}	57
Gráfica 24. Efecto de 10 μ M de genisteína y 50 μ M Resveratrol sobre la expresión génica de CPT1, en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}	58

Gráfica 25. Efecto de 10 μ M de genisteína y 50 μ M Resveratrol sobre la expresión génica de SIRT1, en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR}	59
Gráfica 26. Efecto de 10 μ M de genisteína, 20 μ M de Compuesto C, 10 μ M de genisteína y 20 μ M de Compuesto C o 2mM de AICAR sobre la expresión génica de CPT1, en células C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{sh ObR}	60
Gráfica 27 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre la expresión génica de PPAR δ , UCP3, PGC1 α y CPT1 en músculo esquelético de ratones macho C57BL6.	61
Gráfica 28 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratones macho C57BL6.	61
Gráfica 29 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre el gasto energético y coeficiente respiratorio de ratones macho C57BL6.	62
Gráfica 30 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre una prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal (IPGTT) de ratones macho C57BL6.	63
Gráfica 31 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el consumo de oxígeno de ratones macho C57BL6.	64
Gráfica 32 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el gasto energético y coeficiente respiratorio de ratones macho C57BL6.	64

RESUMEN

La obesidad es un problema de salud pública que contribuye al desarrollo de la resistencia a la insulina, la cual se ha asociado con la acumulación excesiva de lípidos en el músculo esquelético. Existe evidencia de que el consumo de proteína de soya puede disminuir la acumulación ectópica de lípidos y mejorar la sensibilidad a la insulina, sin embargo, se desconoce si las isoflavonas de la soya, en específico la genisteína, es capaz de estimular la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. El objetivo del presente estudio fue estudiar el mecanismo por el cual la genisteína estimula la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. Se demostró que la genisteína, induce la expresión de los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético de ratas y en miotúbulos silenciados para el receptor de leptina (ObR) mediante un incremento en la fosforilación de AMPK, la cual se llevo a cabo a través de JAK2, posiblemente mediado por AMPc. Adicionalmente, se observó que la genisteína mediante una disminución en el coeficiente respiratorio es capaz de incrementar la oxidación de lípidos en un modelo *in vivo*.

SUMMARY

Obesity is a public health problem that contributes to the development of insulin resistance, which is associated with an excessive accumulation of lipids in skeletal muscle tissue. There is evidence that soy protein can decrease the ectopic accumulation of lipids and improves insulin sensitivity; however, it is unknown whether soy isoflavones, particularly genistein, can stimulate fatty acid oxidation in the skeletal muscle. Thus, we studied the mechanism by which genistein stimulates fatty acid oxidation in the skeletal muscle. We showed that genistein induced the expression of genes of fatty acid oxidation in the skeletal muscle of Zucker *fa/fa* rats and in leptin receptor (ObR)-silenced C2C12 myotubes through AMPK phosphorylation. Furthermore, the genistein-mediated AMPK phosphorylation occurred via JAK2, which was possibly activated through a mechanism that involved cAMP. Additionally, the genistein-mediated induction of fatty acid oxidation genes involved PGC1 α and PPAR δ . As a result, we observed that genistein increased fatty acid oxidation in both the control and silenced C2C12 myotubes, as well as a decrease in the RER in mice.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La obesidad es un problema de salud pública que ha sido relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina, la cual se define como la incapacidad de los tejidos de responder a la acción de esta hormona. La presencia de resistencia a la insulina, se ha asociado a: un mayor acumulo de lípidos en el interior de tejidos no adiposos (lipotoxicidad) como el músculo esquelético, y a una mayor inflexibilidad metabólica la cual se define como: la incapacidad del músculo esquelético de responder o cambiar de sustrato energético (glucosa/lípidos) en diferentes estados fisiológicos (ayuno/posprandio), dicha inflexibilidad se ha relacionado a que la oxidación de los ácidos grasos por parte de la mitocondria es incompleta lo que ocasiona un incremento en la acumulación de acil-carnitinas en el músculo esquelético ^(1; 2; 3; 4), las cuales han sido asociadas al desarrollo de resistencia a la insulina.

La relevancia del músculo esquelético durante el desarrollo de resistencia a la insulina reside en que representa el 40% del peso corporal en mamíferos, y ha sido identificado como el mayor sitio de utilización de glucosa, oxidación de lípidos y de la acción periférica de la insulina ⁽⁵⁾. El mecanismo por el cual se produce esta asociación (resistencia a la insulina → acumulación de lípidos) incluye una alteración en el metabolismo de los ácidos grasos, especialmente en las rutas de oxidación, que ocasiona una disminución en el uso y un incremento en el almacenamiento de lípidos dentro del músculo esquelético ⁽⁶⁾. Así, la incapacidad del músculo esquelético para oxidar ácidos grasos puede contribuir de manera importante al deterioro en el metabolismo de lípidos ocasionado la disfunción mitocondrial, que se refiere, en especial, a la incapacidad de la mitocondria para oxidar los ácidos grasos ⁽⁷⁾. La disminución en la capacidad muscular de oxidar a los ácidos grasos, se ha asociado a varios aspectos entre ellos a la inadecuada síntesis por parte de los adipocitos en algunas adipocitocinas y hormonas encargadas de incrementar la oxidación de ácidos grasos. Una de estas hormonas es la leptina.

Leptina

La leptina es una hormona de 16 kDa secretada por los adipocitos, la cual estimula la oxidación de ácidos grasos ^{(8), (9)} y la captación de glucosa en las células que contienen su receptor llamado “*ObR*”, el cual es miembro de la familia de receptores de citocina I y es activado por cambios conformacionales inducidos por la unión con el

ligando. La señalización intracelular originada por la unión de leptina al receptor Ob-Rb está asociada con el sistema JAK (Janus Tirosina Cinasa) – STAT (activador de la transcripción 3). Las JAK son una familia de tirosina cinasas intracelulares que presentan dos sitios activos y son activadas principalmente por receptores de tipo citocina. El Ob-R activa de manera preferencial a JAK2 e induce la autofosforilación del complejo Lep-ObR-JAK2. Este evento da inicio a una cascada de fosforilaciones que involucra diversos sistemas enzimáticos; entre ellas está JAK2, que como todas las tirosina cinasas, fosforila a las proteínas con dominios SH2 como las proteínas STAT3, que una vez fosforiladas son translocadas al núcleo, donde funcionan como reguladoras transcripcionales (*Figura 1*) y de esta forma favorecen la expresión de genes involucrados en el crecimiento y en la diferenciación celular.

Recientemente, se demostró que la leptina puede incrementar la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético gracias a que de forma dependiente de la fosforilación de JAK2 induce la fosforilación de AMPK (proteína cinasa activada por adenosin monofosfato) ⁽¹⁰⁾ cinasa encargada de incrementar la oxidación de ácidos grasos, lo que conlleva a una menor acumulación de éstos en el músculo esquelético, con lo cual se reduce o se previene el desarrollo de lipotoxicidad. Sin embargo, los efectos de la leptina sobre la oxidación de ácidos grasos, se ven abatidos en el músculo esquelético de personas y ratones obesos ^{(11), (12)}. Una de las posibles causas puede deberse; 1) al incremento en la expresión de SOCS3 (*suppressor of the cytokine signaling*) ⁽¹³⁾ el cual inhibe la señalización de leptina mediante la unión a JAK2, lo que ocasiona que se inhiba la autofosforilación de JAK y la fosforilación del receptor ó 2) por la presencia de resistencia a la leptina la cual podría ocasionar una menor fosforilación de AMPK que conllevaría a un incremento en la lipotoxicidad.

La resistencia a la leptina puede ser ocasionada por obesidad inducida por dieta o por alguna mutación en su receptor ⁽¹⁴⁾. Un ejemplo de mutación en el receptor de leptina es la rata Zucker *fa/fa*, que ha sido utilizada ampliamente como un modelo de obesidad genética. Este modelo animal posee una mutación llamada *fa* en el receptor de leptina donde existe una sustitución de la glutamina-269 por prolina ⁽¹⁵⁾. El fenotipo de estos animales se caracteriza por una marcada obesidad, hiperfagia, hiperglicemia e hiperinsulinemia asociadas a un incremento en el número de células beta ⁽¹⁶⁾. Los animales *fa/fa* en la 2^{da} semana después de nacidos presentan un incremento en la concentración de insulina plasmática y en la 4^{ta} semana se hace evidente la hiperglicemia y la presencia de obesidad. De forma interesante, tanto las ratas obesas

(obesidad inducida por dieta) y las ratas Zucker *fa/fa* (obesidad genética) presentan una menor fosforilación de AMPK en el músculo esquelético y un mayor acumulo de lípidos en el interior del mismo. Dicha enzima ha sido llamada “sensor energético” de la célula, debido a que dependiendo de la relación AMP/ATP es capaz de inhibir vías anabólicas o activar vías catabólicas.

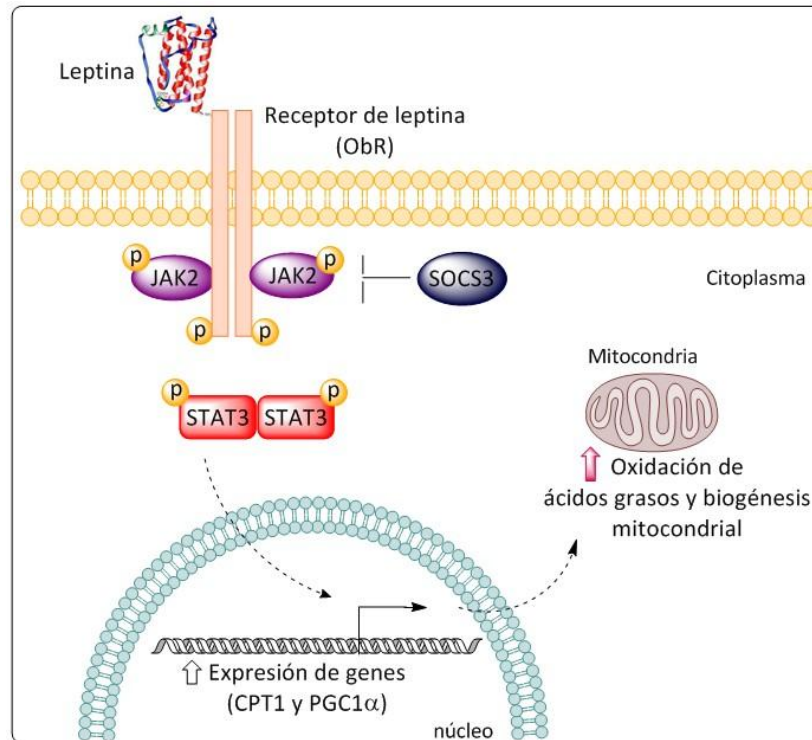


Fig. 1. Señalización de leptina

Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK por sus siglas en inglés (Adenosin Monophosphate activated Protein-Kinase).)

La enzima AMPK es una proteína heterotrimérica constituida de la subunidad catalítica α , y de dos subunidades regulatorias, llamadas β y γ . La subunidad β constituye el sitio de “anclaje” para el dominio cistación β -sintasa (CBS) y cada par de dominios CBS se conoce como un dominio Bateman, los cuales son fundamentales para que se lleve a cabo el proceso de fosforilación de la subunidad catalítica por la cinasa de residuos de serina/treonina LKB1 (supresor tumoral codificado por el gen *lkb1*, que codifica para LKB1 también llamado STK11) (Figura 2). La cinasa de residuos de serina/treonina LKB1, se considera una proteína activa de forma constitutiva, con un patrón de expresión ubicuo⁽¹⁷⁾ que bajo condiciones de estrés energético como la hipoxia, el ejercicio y el ayuno, entre otras, actúa como cinasa de AMPK a través de un mecanismo dependiente de AMP⁽¹⁸⁾. Bajo condiciones fisiológicas LKB1 se localiza en

el núcleo, formando un complejo heterotrimérico con la proteína adaptadora relacionada a Ste20 (STRADa/b) y a la proteína 25 de ratón (MO25a/b) o asociada con una proteína llamada (LIP1). La LKB1 es traslocada al citosol, donde ejerce sus funciones ⁽¹⁹⁾ de cinasa y activa a AMPK. Otra cinasa de AMPK, es la cinasa de la proteína cinasa dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} (CaMKK), que muestra una secuencia y estructura similar a LKB1 ⁽¹⁸⁾. De esta cinasa (CAMKK), existen dos isoformas; CaMKK α y CaMKK β , la cuales son codificadas por dos genes distintos, y comparten 70% de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos y tienen un amplio patrón de expresión en diversos tejidos ⁽²⁰⁾.

Dependiendo de la relación AMP/ATP, se unirá AMP o ATP a los dominios Bateman de la subunidad γ de AMPK ⁽²¹⁾. Si la concentración de AMP es elevada y éste se encuentra unido a la subunidad γ , se ocasiona un cambio conformacional en la subunidad α , que permite que el residuo T-172 de la enzima quede expuesto y pueda ser fosforilado y como consecuencia activada por la enzima LKB1 ⁽²²⁾. En caso de que se una ATP en los dominios Bateman, entonces no se llevará a cabo el cambio conformacional y la enzima permanecerá en su forma inactiva. Las concentraciones de ATP y AMP en la célula indican el estado energético de ésta, de tal forma que el sistema responde a cambios en la relación AMP:ATP, y es por eso que la AMPK se ha llamado el “sensor energético de la célula”.

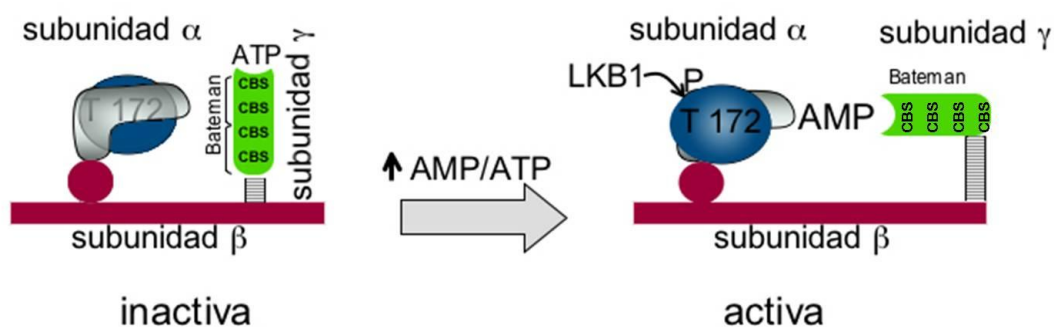


Fig. 2. Estructura y activación de la AMPK.

Una vez que la AMPK se encuentra fosforilada, ésta por su actividad de cinasa fosforila la Ser 79 de la acetil CoA carboxilasa (ACC) inactivándola, y fosforila en un residuo aún desconocido a la malonil CoA descarboxilasa (MCD) para activarla ⁽²³⁾. El efecto neto de la activación de la AMPK será disminuir la concentración de malonil CoA, que inicia la síntesis de ácidos grasos y que es un inhibidor de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), proteína encargada de permitir la entrada de los ácidos

grasos activados a la matriz mitocondrial para poder ser oxidados (Figura 3). La combinación de un incremento en la oxidación de los ácidos grasos y una disminución en su síntesis conlleva a una reducción del contenido de lípidos en la célula ⁽²⁴⁾.

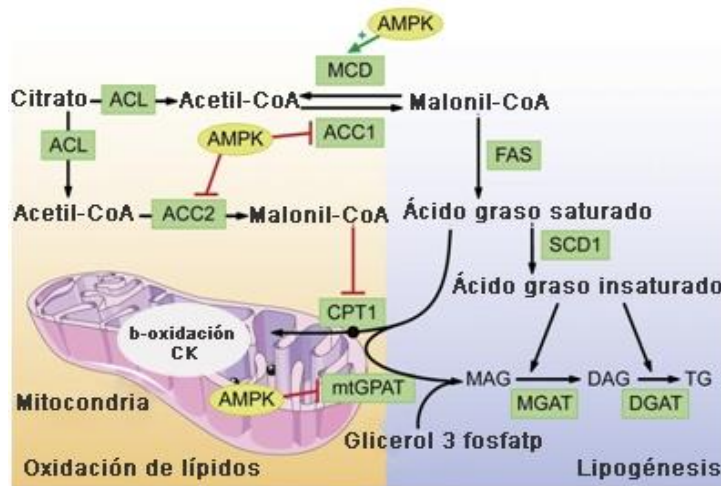


Fig. 3. Funciones de AMPK sobre la oxidación de lípidos y la lipogénesis.

La AMPK además de su actividad de cinasa también tiene efectos a nivel transcripcional ⁽²⁵⁾, activando genes como PPAR α (Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa) y reprimiendo la expresión de genes como las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles (SREBP1c). De esta forma incrementa la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y disminuye la expresión de genes involucrados en la síntesis de estos. Por otro lado, se sabe que AMPK puede incrementar la transcripción de enzimas mitocondriales involucradas en la β -oxidación y en la biogénesis mitocondrial mediante la activación del coactivador PGC1 α (Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (*PGC-1 α* por sus siglas en inglés: *PPAR γ coactivator-1 α*)) ⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾.

La AMPK puede ser activada por condiciones de ayuno, hipoxia, ejercicio, y por el tratamiento con sustancias como AICAR (*5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosyl 5'-monophosphate*). Por otra parte, se ha reportado un gran número de hormonas y de fármacos como activadores de AMPK, pero los mecanismos de acción aún no se encuentran del todo delineados. Se dice, que pueden actuar de una forma indirecta cambiando el acople de la mitocondria y el estado energético de la célula. Para el caso de la metformina (antihiperlipicemiante) se sabe que activa a AMPK de forma indirecta debido a que ocasiona una inhibición moderada del complejo 1 de la

cadena respiratoria, lo cual incrementa la relación celular de AMP:ATP. Se ha reportado que muchos de los activadores de AMPK, tienen la habilidad de causar inhibición en la producción de ATP mitocondrial ^{(28), (29)}. (Figura 4)

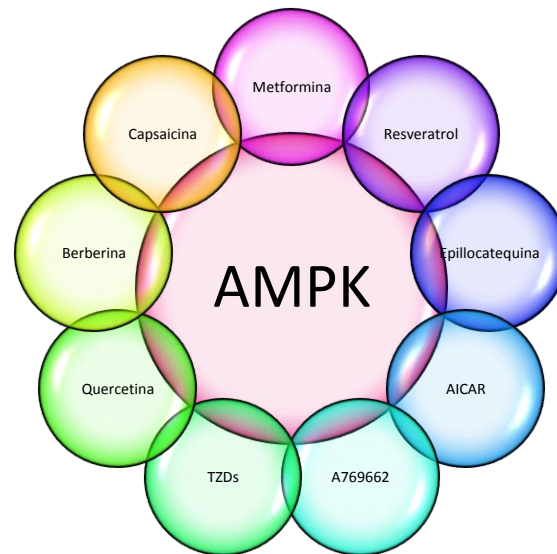


Fig. 4. Activadores de AMPK.

En el caso de las hormonas que activan a AMPK en músculo esquelético se encuentran como ya se mencionó la leptina ⁽³⁰⁾, así como también a la adiponectina ⁽³¹⁾. Existen diversos mecanismos por los cuales se cree que dichas hormonas activan a AMPK. Un estudio mostró en mioblastos C2C12 de ratón que la leptina produce una activación bifásica de la subunidad α AMPK ⁽³²⁾. En principio activa a la subunidad α -2AMPK que contiene a las subunidades α 2 y α 1 lo que resulta en la estimulación de la oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación de ACC y MCD abatiendo la concentración de la malonil CoA, que inicia la síntesis de ácidos grasos y que es un inhibidor de la proteína CPT1 encargada de transportar a los ácidos grasos activados a la mitocondria para poder ser oxidados. El efecto posterior de la leptina, que hace que la oxidación de los lípidos trascienda, se debe a que α 2AMPK es translocada al núcleo gracias a la señal de localización nuclear (NLS) que posee dentro de la subunidad α 2. Una vez en el núcleo la α 2AMPK induce la transcripción de PPAR α . La activación de AMPK permite el incremento de la proteína desacoplante 3 (UCP3) pero el mecanismo por el cual UCP3 es regulado por AMPK aún se desconoce. Por otro lado Acin et al. ⁽³³⁾ identificaron un elemento de respuesta para los PPARs en el gen de UCP. Una posibilidad para el incremento de la UCP3 en músculo esquelético mediada por AMPK podría ser que AMPK aumente la transcripción de PPAR. Pero esto es sólo una

hipótesis, aún falta comprobar si la leptina a través de AMPK también incrementa la transcripción de PPAR δ y que este factor incremente la transcripción de UCP3.

Recientemente se mostró que la leptina de forma dependiente de la fosforilación de JAK2 induce la fosforilación de AMPK (proteína cinasa activada por adenosin monofosfato) ⁽¹⁰⁾, lo que permite que la leptina pueda llevar a cabo sus efectos en el músculo esquelético.

Adiponectina

Otra hormona que es capaz de activar a la AMPK en músculo esquelético es la adiponectina, la cual es una adipocitocina de 30 kDa secretada principalmente por el tejido adiposo que se ha asociado mediante estudios *in vivo* e *in vitro* con un incremento en la sensibilidad a la insulina y efectos anti-inflamatorios ⁽³⁴⁾. Se sabe que la adiponectina permite la activación de AMPK debido a que induce la translocación de LKB1 del núcleo al citoplasma de forma dependiente de APPL(Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif), lo que permite la activación de AMPK. Por otro lado, la adiponectina también activa a CaMKK, mediante la estimulación de la liberación de Ca²⁺ por un mecanismo dependiente de la fosfolipasa C para producir inositol-3-fosfato (IP3) en el citosol ⁽³⁵⁾ (Figura 5).

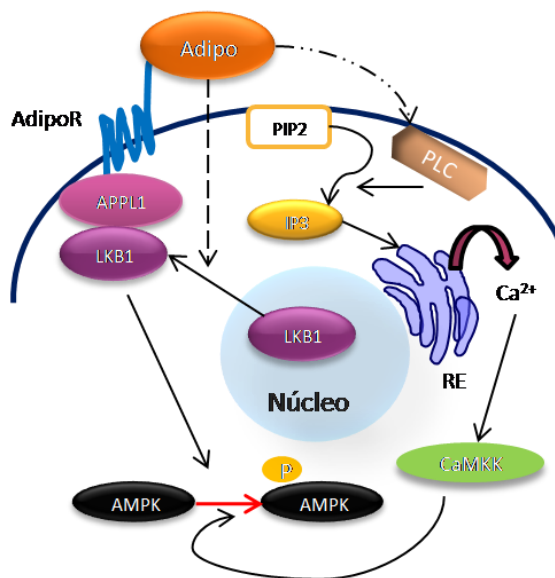


Fig.5 Activación de la AMPK mediante adiponectina.

Como se mencionó anteriormente la AMPK puede ser activada por condiciones que generen un cambio en la relación AMP/ATP, indicativo de que la energía celular

está comprometida. Generalmente, esto ocurre en periodos de alta demanda de energía y bajo diferentes tipos de estrés celular, los cuales causan, entre otros fenómenos, depleción de ATP, algunos ejemplos que ocasionan la depleción de ATP son la deprivación de glucosa, el ayuno, la hipoxia, la isquemia y el ejercicio, por lo que la finalidad de activar a AMPK es dar paso a las rutas metabólicas que permitan la generación de ATP, es decir que AMPK estimula rutas catabólicas (que producen ATP) e inhibe las vías anabólicas (que consumen ATP). En la siguiente figura se resumen algunas de sus acciones. (*Figura 6*)

Por otro lado, se sabe que la AMPK permite la activación de ciertas proteínas como es el caso del coactivador PGC1 α involucrado principalmente en la biogénesis mitocondrial. A continuación se describirá muy brevemente a este coactivador.

Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (*PGC-1 α* por sus siglas en inglés: *PPAR γ* coactivator- 1 α).

PGC-1 α pertenece a una familia de coactivadores transcripcionales que incluyen a PGC-1 α y a PRC (PGC-1 α related coactivator). PGC-1 α fue el primer miembro identificado como un cofactor del receptor PPAR γ , que se requiere para la respuesta de termogénesis adaptativa en condiciones de baja temperatura ⁽³⁶⁾. En el músculo esquelético PGC-1 α promueve la oxidación mitocondrial mediante la inducción de la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos, además está involucrado en la biogénesis mitocondrial ⁽³⁷⁾, ⁽³⁸⁾, y ha sido asociado en la promoción del incremento de las fibras tipo I (oxidativas) ⁽³⁹⁾. Los mecanismos a través de los cuales PGC-1 α activa la expresión de genes son poco conocidos, se piensa que su función coactivadora se debe a la habilidad de PGC-1 α para unirse a dos coactivadores con actividad de acetil transferasa como los son SRC-1 y CBP/p300. Una de las formas por las cuales se activa PGC-1 α es por un mecanismo de desacetilación mediado por SIRT1 que ocasiona un incremento en la tasa transcripcional ⁽⁴⁰⁾. Recientemente, se demostró que la AMPK puede llevar a cabo sus efectos respecto a la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético gracias a la fosforilación (mediada por AMPK) y a la desacetilación de PGC-1 α mediada por SIRT1.

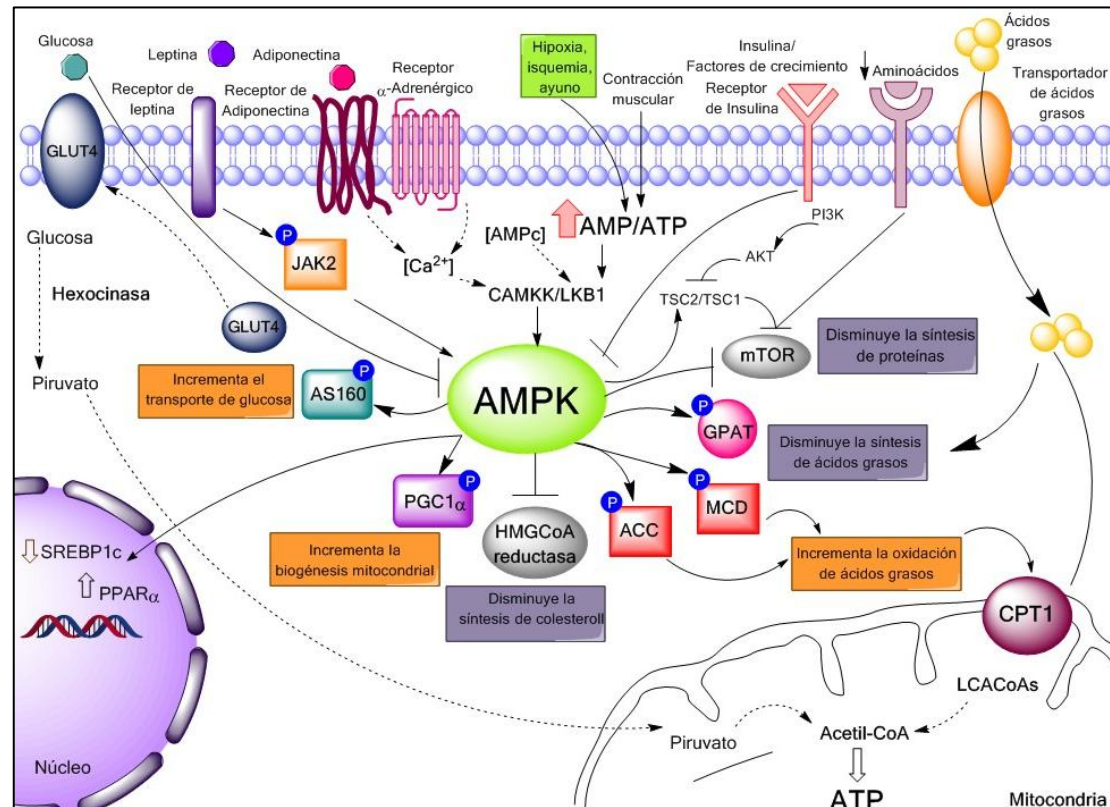


Figura 6. Activación de la AMPK. La AMPK puede ser activada por diversas situaciones entre las que se encuentran: la deprivación de nutrientes (ayuno); la contracción muscular; hormonas como, leptina, adiponectina; neurotransmisores; la hipoxia o la isquemia. Estas situaciones conllevan a un incremento en la relación AMP/ATP o en las concentraciones de Ca²⁺, o en las concentraciones de AMPc, que ocasionan a su vez un incremento en la actividad de las cinasas de AMPK (LKB1 y/o CAMKK). Una vez activa la AMPK mediante su actividad de quinasa es capaz de activar a TSC1/2 (*tuberous sclerosis complex*) e inhibir a la proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) para disminuir la síntesis de proteínas; fosforilar a las enzimas GPAT (Glicerol 3 fosfato acil-transferasa), ACC, MCD, HMGCoA reductasa para disminuir la síntesis de ácidos grasos, permitir un incremento en la oxidación de ácidos grasos y disminuir la síntesis de colesterol respectivamente. Favorece la actividad de PGC1α, lo que permite un incremento en la biogénesis mitocondrial. Incrementa la toma de glucosa al fosforilar a la proteína AS160. Por otro lado, la AMPK es capaz de incrementar la transcripción de PPARα y disminuir la transcripción de SREBP1c, lo que tiene como consecuencia el incremento en la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y la disminución de genes involucrados en vías lipogénicas). La AMPK puede ser inhibida por presencia de glucosa; factores de crecimiento; insulina o aminoácidos, estos mecanismos se describirán brevemente más adelante.

SIRT1 (homólogo del regulador de silenciamiento de información).

Las sirtuinas (SIRT1-7) son una familia de desacetilasas de histonas de la clase III, su nombre proviene de su similitud con el gen *Sir2 (silent information regulator 2)* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta clase de desacetilasas requieren NAD^+ como cofactor para poder llevar a cabo su función por lo que se sugiere que la actividad enzimática de esta proteína está regulada por la concentración de NAD^+ , la relación de NAD^+/NADH o por las concentraciones intracelulares de nicotinamida ⁽⁴¹⁾.

Mediante su actividad de desacetilasa, las sirtuinas regulan procesos importantes como la gluconeogénesis y la diferenciación del adipocito y del músculo esquelético, entre otros procesos. En el músculo esquelético la SIRT1 (homólogo del regulador de silenciamiento de información) ⁽⁴²⁾ es necesaria para regular la oxidación de ácidos grasos ⁽⁴³⁾. En ratones tratados con un activador (resveratrol) de la SIRT1 se ve incrementada la biogénesis mitocondrial y la capacidad oxidativa del músculo así como una disminución en la acetilación de PGC-1 α ⁽⁴⁴⁾. Por otro lado, la AMPK puede también incrementar los niveles celulares de NAD^+ e incrementar la actividad de la sirtuina 1 (SIRT1), lo que resulta en la desacetilación y activación de PGC1 α ⁽⁴⁵⁾, con la finalidad de fomentar las vías catabólicas y disminuir las vías anabólicas lo que por un lado permite un incremento en la oxidación de ácidos grasos y por supuesto regenerar las concentraciones de ATP en la célula.

Gasto energético.

El incremento en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético mediado por AMPK, es uno de los efectos que nos parece interesante evaluar dado que el acumulo de estos en el músculo esquelético, se ha relacionado con el desarrollo de disfunción mitocondrial, la cual como se mencionó en un principio, se asocia a la presencia de resistencia a la insulina ⁽⁴⁶⁾, lo que sugiere que un incremento en la oxidación de ácidos grasos que podría reducir la resistencia a esta hormona en el músculo esquelético.

Un incremento en la oxidación de ácidos se traduce en un mayor gasto energético y a una disminución en el coeficiente respiratorio ⁽²⁶⁾, los cuales pueden ser evaluados mediante el uso de calorimetría indirecta que mediante la cuantificación del VO_2 inhalado y el VCO_2 exhalado, nos permite conocer el sustrato energético que está

siendo utilizado, de tal forma que coeficientes respiratorios (RQ por sus siglas en inglés *Respiratory Quotient*) cercanos a 1 nos indican oxidación preferente de hidratos de carbono y RQ cercanos a 0.7 nos indican oxidación preferente de lípidos. Por otro lado, un incremento en la oxidación de lípidos que se correlaciona con una menor concentración de lípidos intramusculares se correlaciona con una mejor sensibilidad a la insulina ⁽²⁶⁾.

La búsqueda de tratamientos no farmacológicos para activar a la AMPK se fundamenta en el hecho de que al activar a AMPK se puede disminuir la resistencia a la insulina mediante la disminución de los lípidos intramusculares, y como se mencionó anteriormente una de las patologías asociadas a la obesidad es el desarrollo de resistencia a la insulina.

Antecedentes del proyecto

Estudios realizados en el laboratorio de Fisiología de la Nutrición han demostrado que el consumo de una dieta con 20% de proteína de soya en ratas que poseen una mutación en el receptor de leptina (ratas Zucker *fa/fa*), disminuye el acúmulo de lípidos en el interior del músculo esquelético (*Figura 7*), incrementa significativamente la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (PPAR δ , CPT1 y UCP3) y disminuye la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (SREBP1c) (Tabla 1) y se observó un aumento en la fosforilación de AMPK y ACC en los animales que consumieron una dieta con 20% de proteína de soya comparado con los animales alimentados con caseína (*Gráfica 1*) ⁽⁴⁷⁾.

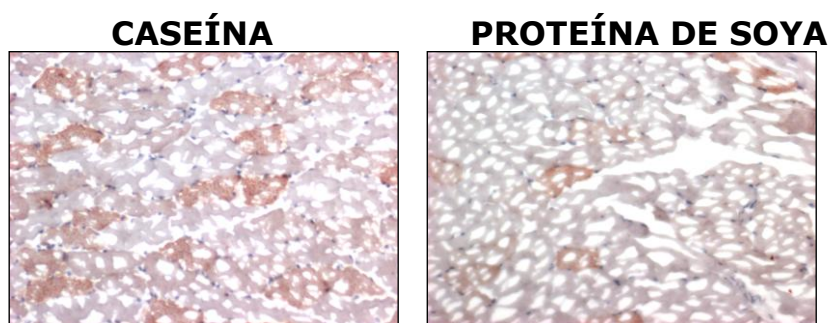
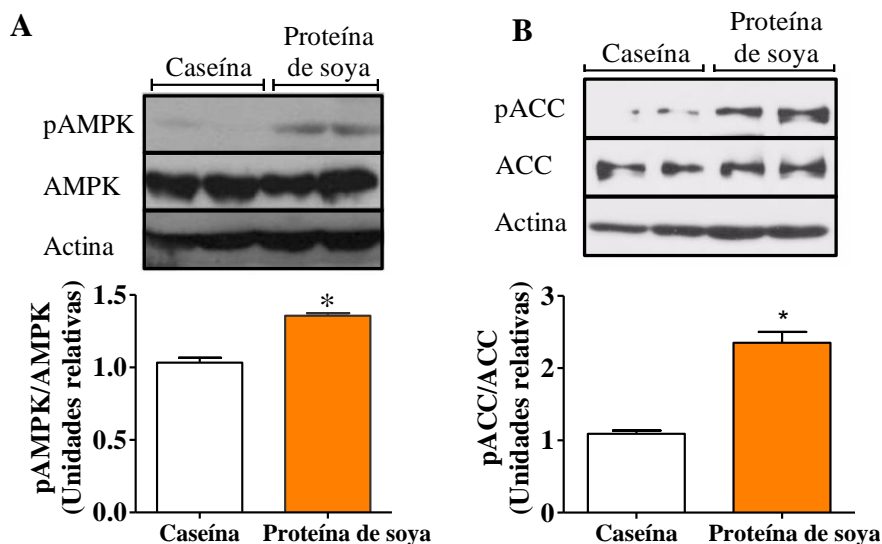


Fig. 7 Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya en la acumulación de lípidos en el interior del músculo esquelético (*Vastus lateralis*) de ratas Zucker *fa/fa*. Tinción de rojo oleoso. Cortes histológicos de 4 μ m de *Vastus lateralis* representativos de cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio. Aumento 10x. n=5.

Tabla 1. Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya en la expresión relativa de mRNA de PPAR δ , UCP-3, CPT1, SREBP1c y SCD1 de músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa*.

	20% de Caseína	20% de Proteína de soya
PPARδ	1.00 \pm 0.63 ^b	7.63 \pm 0.36 ^a
UCP3	1.00 \pm 0.67 ^b	8.77 \pm 0.37 ^a
CPT1	1.00 \pm 0.06 ^b	4.05 \pm 0.073 ^a
SREBP1c	1.00 \pm 0.04 ^a	0.18 \pm 0.073 ^b

Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de caseína fue utilizada como valor relativo para el grupo de proteína de soya y soya grasa. Los valores son expresados como promedios \pm el error estándar de la media. n=3. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos (p<0.05). a>b.



Gráfica 1. Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa*. A) Inmunoblot de AMPK y ACC total, Actina y la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² y ACCSer⁷⁹ B) Análisis de inmunoblots se presentan unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, n=5. El * indica diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

Con estos antecedentes se estableció que el consumo de una dieta con 20% de proteína de soya incrementa la fosforilación de AMPK en músculo esquelético. Esta activación podría estar mediada a través del contenido de isoflavonas que posee la proteína de soya, lo anterior se sugiere debido a que los polifenoles (clasificación a la cual pertenecen las isoflavonas) son la fuente más importante de compuestos bioactivos y se ha observado que en caso de algunos de ellos son capaces de permitir la activación de AMPK (48; 49; 50).

El contenido de isoflavonas del aislado de proteína de soya.

Los polifenoles se encuentran en su mayoría en frutas y verduras y son la fuente más importante de compuestos bioactivos en la dieta humana. Se han identificado 8000 compuestos polifenólicos y alrededor de 2000 se localizan en las plantas. Los polifenoles son necesarios en las plantas para permitir su pigmentación, su crecimiento y reproducción y les confieren resistencia a patógenos (bacterias, hongos y luz ultra violeta). Los polifenoles pueden dividirse por su estructura en: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, coumestranos y stilbenos ⁽⁵¹⁾.

Las isoflavonas pertenecen al grupo de los flavonoides, son compuestos no esteroideos de origen natural con función estrogénica, contienen uno o varios grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático. Se encuentran naturalmente en forma de glucósidos (genistina, daidzina y glicitina) también pueden encontrarse como precursores de la genisteína y daidzeína como la biochanina A y la formononetina respectivamente, y son las bacterias del intestino delgado que las metabolizan a sus formas activas *equol*, *o-desmetilangolensina*, dihidrogenisteína y p-etilfenol.

Las isoflavonas de mayor abundancia en la proteína de soya son la genisteína y la daidzeína. Estos compuestos presentan una estructura similar a la de ciertos esteroides lo que permitiría su interacción con receptores huérfanos nucleares como PPAR δ que regula el metabolismo de ácidos grasos ⁽⁵²⁾. Por otro lado, se conoce que PGC1 α (coactivador de PPAR δ) que está involucrado en la biogénesis mitocondrial, se activa por un mecanismo de desacetilación mediado por SIRT1 (homólogo del regulador de silenciamiento de información, con función desacetilasa dependiente de NAD⁺ ⁽⁵³⁾, ⁽⁵⁴⁾). Un estudio *in vitro* mostró que las isoflavonas en particular la genisteína es capaz de activar a SIRT1, y de ahí promover la activación de PGC1 α a través de su desacetilación ⁽⁵⁵⁾, lo que podría incrementar la actividad de PPAR δ y la biogénesis mitocondrial, y de ahí que se modifique la capacidad oxidativa del músculo esquelético lo que podría modificar de manera indirecta la actividad de AMPK, efecto que no ha sido demostrado.

Un estudio realizado por Timmer S ⁽⁵⁶⁾, mostró que el consumo de 150 mg/día de resveratrol (polifenol) en pacientes obesos incrementa la actividad de AMPK, los niveles de proteína de SIRT1 y de PGC1 α , y mejora la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Recientemente Park SJ ⁽⁵⁷⁾ mostró un mecanismo probable por el

cual el resveratrol realiza las funciones antes mencionadas en el músculo esquelético; los autores concluyen que el resveratrol actúa como un inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) que degradan al AMPc, lo que permite la acumulación de éste dentro de la célula, esto resulta en la activación de PKA que permite la activación de LKB1 la cual como se ha mencionado activa a AMPK y por otro lado en la activación de Epac1 (proteína efectora de AMPc) y en consecuencia un incremento en la concentraciones intracelulares de Ca^{2+} lo que puede activar la vía a CAMKK β -AMPK (Figura 8).

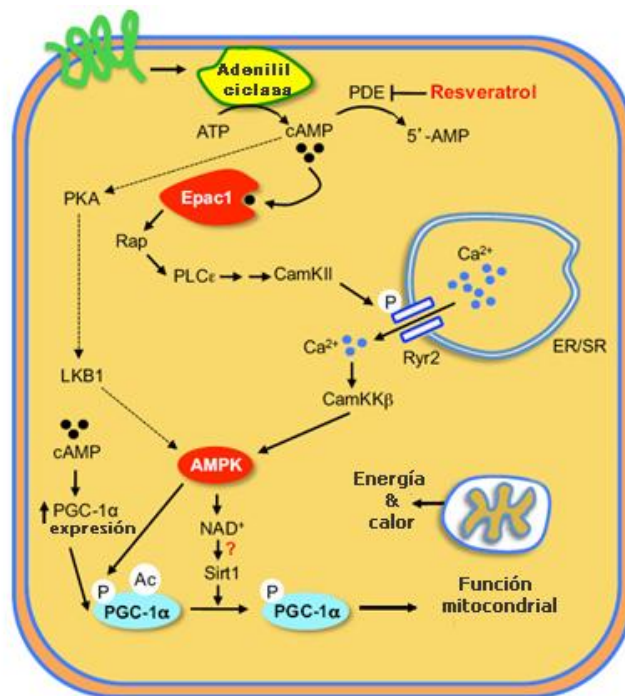


Fig. 8 Activación de AMPK en C2C12 mediante resveratrol

Se piensa que las isoflavonas pueden compartir el mecanismo de acción del resveratrol dado que pertenecen ambos al grupo de los polifenoles. El presente estudio busca establecer el o los posibles mecanismos por los cuales la genisteína incrementa la fosforilación de AMPK en músculo esquelético por un mecanismo independiente del receptor de leptina.

JUSTIFICACIÓN

La obesidad se asocia con la presencia de resistencia a la insulina, la cual se ha relacionado con un exceso de lípidos en el tejido muscular. Por otro lado, alteraciones en la activación de la enzima AMPK pueden afectar la acumulación de ácidos grasos en el músculo esquelético.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que en músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa*, el consumo de un aislado de proteína de soya con isoflavonas incrementa la fosforilación de AMPK y disminuye el acúmulo de lípidos en el músculo esquelético por un mecanismo independiente de leptina. Este mecanismo aún no ha sido estudiado, y se piensa puede estar mediado por las isoflavonas. Por lo que es importante conocer el posible o los posibles mecanismos por los que las isoflavonas de la proteína de soya activan la oxidación de ácidos grasos mediados por AMPK y de esta forma reducir el acumulo de lípidos en el tejido muscular, que ha sido relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina.

HIPÓTESIS

La genisteína activará de forma independiente del receptor de leptina a AMPK en miotúbulos C2C12, mediante la activación de SIRT1 y/o la acumulación de AMPc.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo a través del cual la genisteína activa de forma independiente del receptor de leptina a AMPK en miotúbulos C2C12.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto *in vivo* de la genisteína en músculo esquelético (*vastus lateralis*) de ratas cepa Wistar macho inyectadas intraperitonealmente con genisteína durante 5 días sobre:
 - 1.1 El peso corporal y las concentraciones en suero de glucosa.
 - 1.2 El grado de fosforilación de AMPK.
 - 1.3 La expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1.
 - 1.4 La actividad desacetilasa de SIRT1 sobre PGC1 α .

Para conocer el mecanismo por el cual genisteína activa de forma independiente de leptina a AMPK en miotúbulos C2C12.

2. Producción de una línea celular derivada de células C2C12 que exprese de manera estable el short harpin del receptor de leptina (sh ObR).
3. Determinar el efecto de la genisteína en la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR} sobre:
 - 3.1 El grado de fosforilación de AMPK y JAK2.
 - 3.2 La expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1.
 - 3.3 La concentración AMPc.
 - 3.4 La oxidación de palmitato [C¹⁴].
4. Determinar el efecto de activadores e inhibidores específicos de SIRT1 en la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR} tratados con genisteína sobre:
 - 4.1 El grado de fosforilación de AMPK.
 - 4.2 La expresión génica de CPT1.
 - 4.3 La oxidación de palmitato [C¹⁴].
5. Determinar el efecto de activadores o inhibidores específicos de EPAC, PLC y JAK2 en la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR} tratados con genisteína sobre:
 - 5.1 El grado de fosforilación de AMPK y JAK2.
6. Determinar el efecto del inhibidor específico CPT1 en línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR} tratados con genisteína sobre:
 - 6.1 La oxidación de palmitato [C¹⁴].

Para conocer si la genisteína es capaz de incrementar el gasto energético y mejorar la sensibilidad a la insulina en un modelo de obesidad.

7. Determinar en ratones alimentados durante 60 días con una dieta alta en grasa con y sin genisteína (0.2%):
 - 7.1 El peso corporal y las concentraciones en suero de glucosa y triglicéridos.
 - 7.2 El grado de fosforilación de AMPK.
 - 7.3 La expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α .
 - 7.4 El gasto energético y el coeficiente respiratorio.
 - 7.5 La sensibilidad a la insulina.

Para conocer si la genisteína de forma aguda (inyección intraperitoneal) es capaz de incrementar el gasto energético

8. Determinar el gasto energético y el coeficiente respiratorio en ratones alimentados con una dieta de caseína durante 4 días con la administración de 10 mg/kg de peso de genisteína vía intraperitoneal.

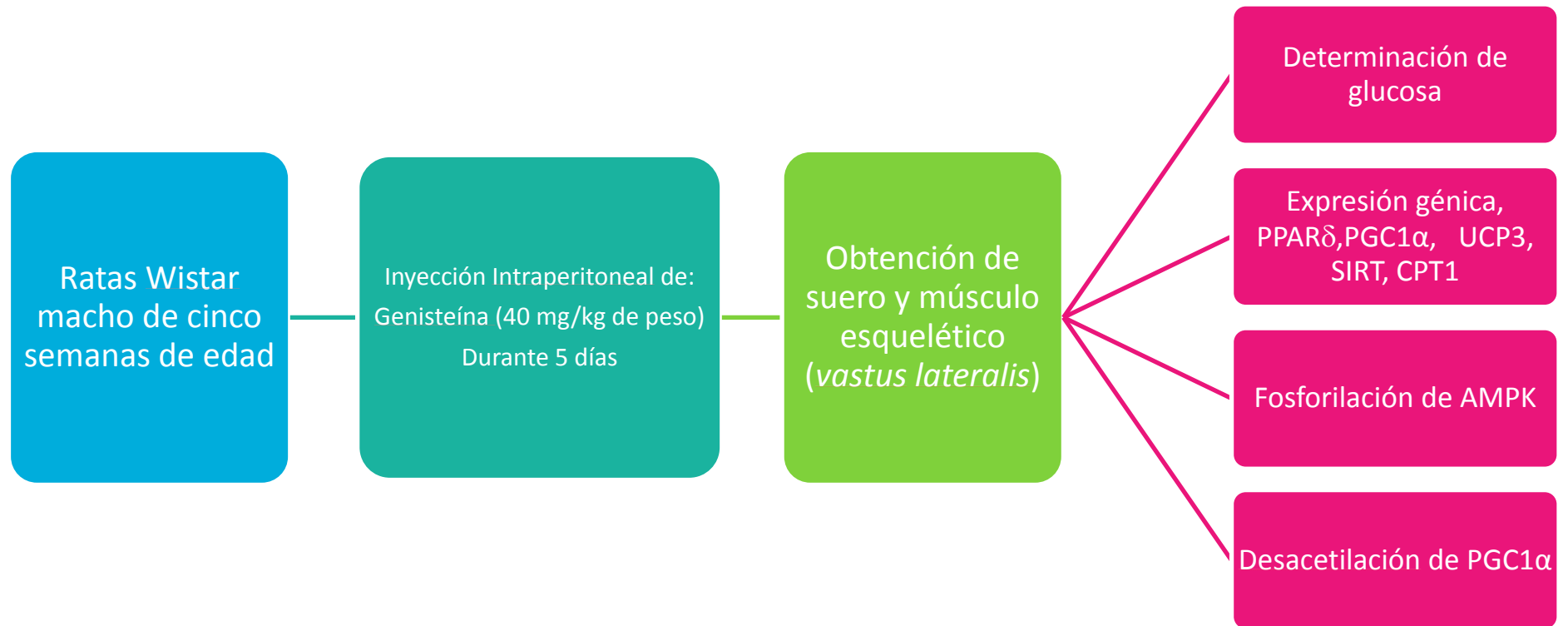
DIAGRAMA DE FLUJO**Estudio piloto *in vivo***

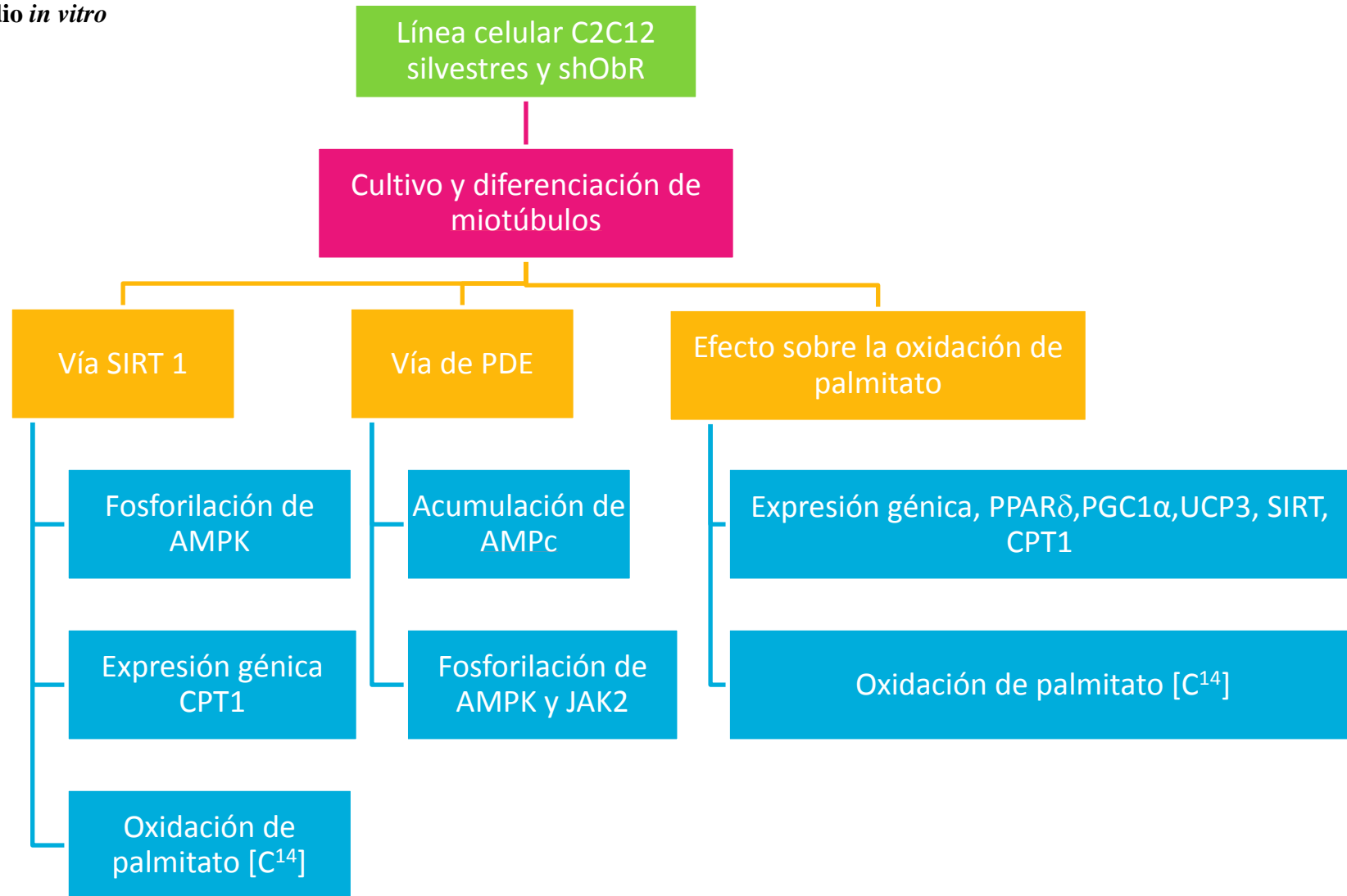
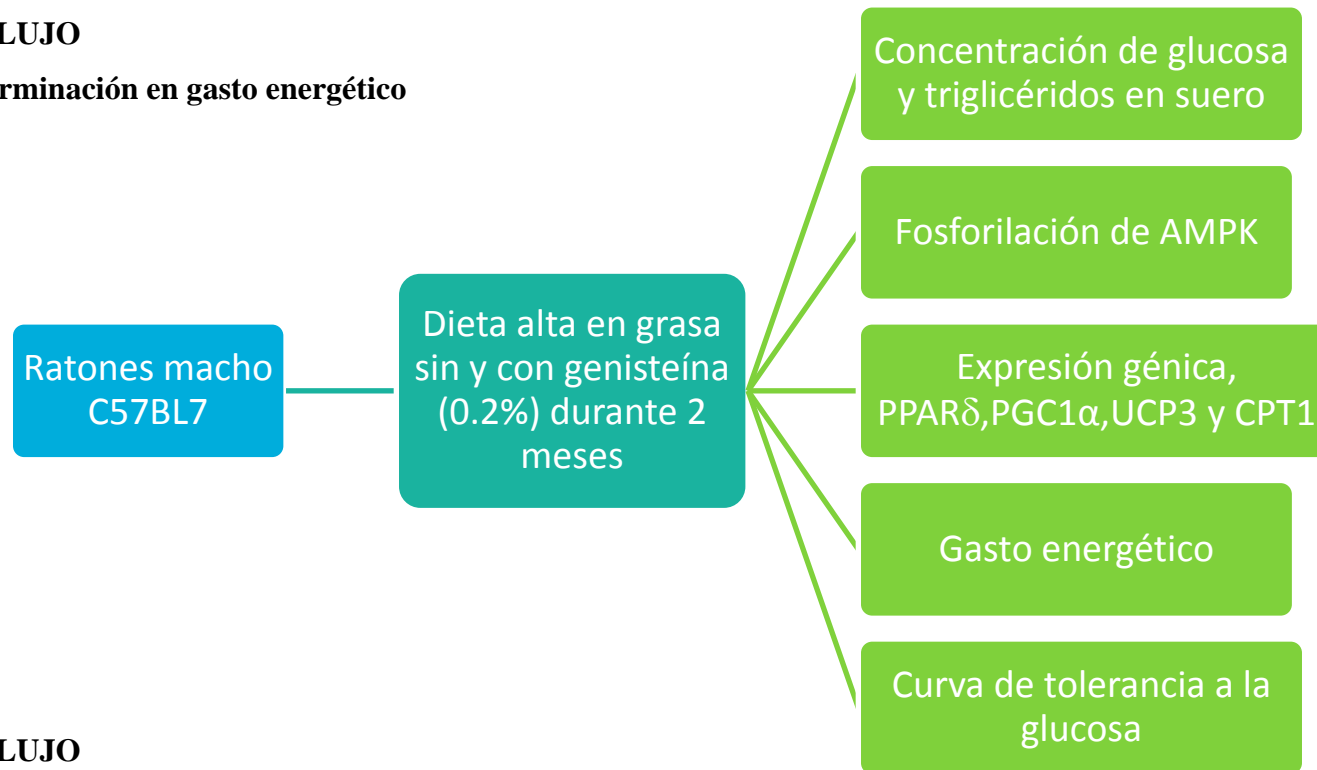
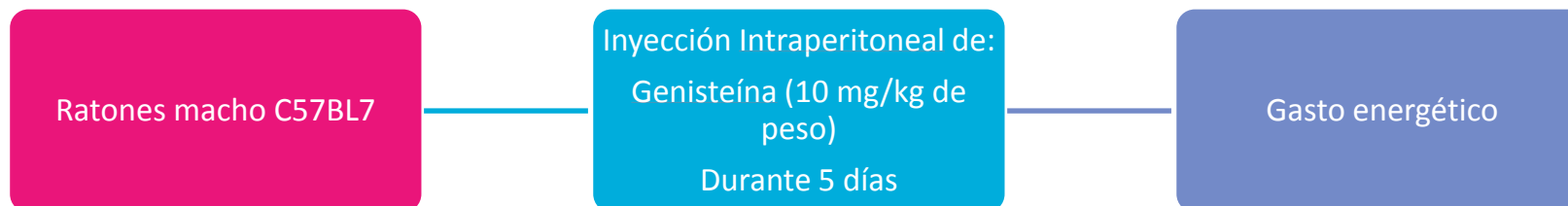
DIAGRAMA DE FLUJO**Estudio *in vitro***

DIAGRAMA DE FLUJO**Estudio *in vivo* determinación en gasto energético****DIAGRAMA DE FLUJO****Estudio *in vivo* para determinación de efecto agudo de genisteína**

METODOLOGÍA.

1. Estudio piloto *in vivo*.

Para conocer si la fosforilación de AMPK en las ratas alimentadas con un aislado de proteína de soya mencionado en un principio, se debía en parte al contenido de la genisteína, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de cinco semanas de edad a las cuales durante cuatro días se les administró de forma intraperitoneal : DMSO como vehículo o genisteína (40 mg/kg de peso) con la finalidad de obtener las concentraciones en suero observadas después del consumo de un aislado de proteína de soya. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta y al agua. Los animales fueron alimentados con 20% de caseína como fuente de proteína y 5% de lípidos provenientes de aceite de maíz. En la tabla 2 se muestra la composición de la dieta que se administró a los animales. Todos los nutrimentos utilizados en la elaboración de las dietas se obtuvieron de Harlan Teklad

Tabla 2. Composición porcentual de la dieta (AIN-93).

Ingrediente	%
Caseína	20
Aceite de maíz	7
Celulosa	5
Mezcla de minerales AIN-93M-MX (Rogers Harper)	3.5
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan Teklad)	1
Citrato de colina	0.025
Dextrosa anhidra	13.2
Almidón de maíz	39.74
Sacarosa	10.00

Con la finalidad de conocer el efecto de las isoflavonas, se registró diariamente la ganancia de peso y el consumo de alimento durante los días de estudio.

1.1 Obtención de muestras y tejidos.

Después de cumplir con el respectivo tiempo de estudio, a las ratas con ayuno de 12 horas, se les practicó eutanasia con CO₂. Posteriormente se decapitaron y se recolectó la sangre en tubos con gel separador y activador de coagulación para la determinación de glucosa. De estos mismos animales se extrajo el músculo esquelético (*vastus lateralis*) para la extracción del RNA total, obtención de extractos totales y

mitocondrias. El tejido inmediatamente se depositó en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes.

1.2 Determinación de glucosa en suero.

La concentración de glucosa se analizó por el método de glucosa oxidasa con un estuche de diagnóstico *in vitro* (Bayer Corporation).

1.3 Determinación de la fosforilación de AMPK por medio de la técnica inmunoblot.

Se utilizaron 100 mg de tejido el cual se homogenizó en amortiguador de lisis que contenía 0.25 M de sacarosa, 10 mM Tris HCl, 3 mM MgCl_2 y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Para la obtención de extractos citoplasmáticos, el homogenizado se centrifugó a 3,000 rpm a 2°C durante 15 min. La determinación de la concentración de proteínas en el extracto citoplasmático se hizo por medio del estuche para análisis de proteínas DC (Bio-Rad.) Posteriormente se determinó la fosforilación de AMPK, como se mencionará más adelante.

1.4 Determinación de la acetilación de PGC1 α por medio de la técnica inmunoblot.

Se obtuvieron los extractos citoplasmáticos como se mencionó anteriormente. Se inmunoprecipitaron 500 μg de homogenizado con 2 μg de anticuerpo PGC1 α , (H-300 Santa Cruz) durante 1h a 4°C , posteriormente se agregaron 50 μl de proteína A agarosa y se incubó en agitación durante 12 h a 4°C . Se centrifugó a 3000 rpm 5 min a 4°C , se lavó cuatro veces la pastilla con amortiguador PBS, se resuspendió en 40 μl de amortiguador de carga, se calentó la muestra a 95°C durante 3 min. Para la determinación de la acetilación de PGC1 α y proteína total de PGC1 α se colocaron 20 μl de inmunoprecipitado en un gel SDS-PAGE al 12%. El gel se sometió a una electroforesis de 70V por 30 min y posteriormente a 100 V por 240 min, las proteínas se electrotransfirieron (15 V por 30 min) a una membrana de PVDF, que posteriormente se colocó en solución de bloqueo (TBS [10 mmol/l Tris, 0.25 mol/l NaCl, pH 7.5], 5% de leche descremada en polvo y 0.05% Tween 20), durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana se incubó durante 16 h a 4°C con los anticuerpos policlonales para la detección de Lys-Ac y PGC1 α (Santa Cruz Biotechnology) a las siguiente diluciones: 1:1000, 1:1500, respectivamente. Posteriormente, las membranas

se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-Lys-Ac y anti-PGC1 α . Después de revelarse con luminol, se procedió a la cuantificación de Lys-Ac y PGC1 α , la cual se realizó por exposición de la membrana a una película de autorradiografía Kodak MIN-R2000 y la cuantificación de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa SigmaScan Image Measurement Software Versión 1.20.09.

1.5 Determinación de expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real).

Se realizó la cuantificación de la expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α , SIRT1 y AMPK2, usando un equipo de PCR de tiempo real (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Se obtuvo el RNA total del músculo esquelético por el método de Chomczynski *et al.* (1987). Posteriormente 5 μ g de RNA se sometieron a electroforesis en un gel de formaldehído-agarosa al 1% para comprobar su integridad. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 250 nm; a esta longitud de onda 1 unidad de densidad óptica es igual 40 μ g/ μ l, la pureza se determinó óptima cuando la relación de la absorbencia a 260 y 280 nm era mayor a 1.8. El RNA obtenido se sometió al análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de dos pasos.

Una vez determinado el efecto *in vivo* de la genisteína, se procedió al efecto *in vitro* para conocer el o los posibles mecanismo de acción de activación de AMPK de forma independiente del receptor de leptina.

2. Estudios *in vitro*.

2.1 Producción de la línea celular C2C12 que exprese de manera estable el shRNA del receptor de leptina (sh ObR).

Con la finalidad de obtener la línea celular C2C12 que expresará de forma estable el shObR. Los mioblastos de ratón C2C12 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), fueron cultivados en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Para inducir la diferenciación (70-80% de confluencia) se colocaron las células en medio DMEM con 2% de suero de caballo. Una vez diferenciadas las células estas fueron transfectadas con el plásmido de shRNA del receptor de leptina (SABioscience).

Para establecer el o los plásmidos más eficaces en disminuir la expresión de ObR, transcurridas 24 h se obtuvo RNA de las células transfectadas y se realizó el PCR-Tiempo Real para calcular el % de Eficiencia de silenciamiento mediante la siguiente ecuación: Porcentaje de silenciamiento = $100 - (100 \times 2^{(-\Delta\Delta Ct)})$.

- Intervalo de confianza inferior 95 % = $100 - (100 \times 2^{(-\Delta\Delta Ct + \Delta\Delta Ct \text{ STDEV}))}$.
- Intervalo de confianza superior 95 % = $100 - (100 \times 2^{(-\Delta\Delta Ct - \Delta\Delta Ct \text{ STDEV}))}$.

Para conocer si el silenciamiento fue exitoso, se toman los siguientes criterios:

Diseño exitoso: Eficiencia de silenciamiento $\geq 70\%$ y un IC 95% superior de $\geq 55.5\%$.

Diseño fallido: Eficiencia de silenciamiento < 33.3 y un IC 95% inferior del $< 55.5\%$.

Posteriormente de la transfección se seleccionaron a las células que expresaban el shRNA del receptor de leptina de manera estable a través diluciones en medio selectivo con neomicina, esto con la finalidad de obtener monoclonas. Este procedimiento se realizó durante cuatro semanas y transcurrido este tiempo, se obtuvo RNA y se realizó el PCR-Tiempo Real para calcular el % Eficiencia de silenciamiento.

Para confirmar la presencia o ausencia del receptor de leptina (ObR) tanto en las C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR}, se obtuvo proteína y se realizó un inmunoblot para ObR.

Todos los medios utilizados poseen penicilina G (200 U/ml) y estreptomycin (200ug/ml) así como 0.002% de Fungizone (GIBCO). Las células crecieron en una incubadora a 37°C en 5% de CO₂.

2.2 Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real).

Se obtuvo el RNA total de los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR} mediante una digestión con TRIzol, seguida de una extracción clorofórmica y una precipitación con isopropanol. El RNA obtenido se sometió al análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de dos pasos. La detección se realizó utilizando sonda Taqman para ObR y actina como control endógeno para normalizar los valores de expresión. Anteriormente se realizó el rango dinámico de cada gen con el fin de conocer la concentración ideal de amplificación de los mismos.

2.3 Determinación de la proteína ObR mediante de la técnica de inmunoblot.

Se obtuvieron extractos totales de los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR}, como se describe a continuación, se eliminó el medio de las células y se lavaron con

PSB1x, posteriormente se rasparon las cajas de cultivo y el homogenizado se centrifugó a 1,600 rpm a 4°C durante 7 min, se eliminó el sobrenadante, a la pastilla celular se agregó amortiguador de lisis que contenía 0.25 M de sacarosa, 10 mM Tris HCl, 3 mM MgCl₂ y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 30 min. La determinación de la concentración de proteínas en el extracto se hizo por medio del estuche para análisis de proteínas DC (Bio-Rad.). Para la determinación de la proteína total de ObR, se colocaron 40 µg de proteína en un gel SDS-PAGE al 8%. El gel se sometió a una electroforesis de 70V por 30 min y posteriormente a 100 V por 120 min, las proteínas se electrotransferieron (15 V por 30 min) a una membrana de PVDF, que posteriormente se colocó en solución de bloqueo (TBS [10 mmol/l Tris, 0.25 mol/l NaCl, pH 7.5], 5% de leche descremada en polvo y 0.05% Tween 20), durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana se incubó durante 16 h a 4 °C con el anticuerpo policlonal para la detección de ObR y Actina (Santa Cruz Biotechnology) a las siguientes diluciones: 1:500 y 1:3000, respectivamente. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-ObR y anti-actina. Después de revelarse con luminol, se procedió a la cuantificación de ObR y actina, la cual se realizó por exposición de la membrana a una película de autorradiografía Kodak MIN-R2000 y la cuantificación de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa SigmaScan Image Measurement Software Versión 1.20.09.

Una vez confirmado el silenciamiento del receptor de leptina mediante las técnicas de PCR-Tiempo Real e inmunoblot. Se procedió a conocer el o los mecanismos por los cuales la genisteína permite la activación de AMPK de forma independiente del receptor de leptina en células de músculo esquelético.

3. Estimulación de miotúbulos con genisteína.

Para determinar si la genisteína pueden incrementar la fosforilación de AMPK. Los miotúbulos silvestres y los C2C12^{sh ObR} se incubaron durante 60 min con:

- 10 µM de Genisteína.
- 2mM de AICAR como control positivo de la activación de AMPK.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la:

3.1 *Determinación de las proteínas AMPK y AMPK (pT172AMPK) mediante de la técnica de inmunoblot.*

Se obtuvieron extractos totales de los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR}, como se describió anteriormente. Para la determinación de la proteína total de AMPK y de la fosforilación de la subunidad alfa de AMPK (pT172AMPK), se colocaron 20 µg de proteína en un gel SDS-PAGE al 7%. El gel se sometió a una electroforesis de 70V por 30 min y posteriormente a 100 V por 70 min, las proteínas se electrotransfirieron (15 V por 30 min) a una membrana de PVDF, que posteriormente se colocó en solución de bloqueo (TBS [10 mmol/l Tris, 0.25 mol/l NaCl, pH 7.5], 5% de leche descremada en polvo y 0.05% Tween 20), durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez bloqueada la membrana se incubó durante 16 h a 4 °C con los anticuerpos policlonales para la detección de AMPK, pT172AMPK y Actina (Santa Cruz Biotechnology) a las siguiente diluciones: 1:500, 1:5000 y 1:3000 respectivamente. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 de anticuerpo anti-AMPK, anti-pT172AMPK y anti-actina. Después de revelarse con luminol, se procedió a la cuantificación de AMPK, pT172AMPK y actina, la cual se realizó por exposición de la membrana a una película de autorradiografía Kodak MIN-R2000 y la cuantificación de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa SigmaScan Image Measurement Software Versión 1.20.09.

3.2 *Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativo (tiempo real).*

Se obtuvo el RNA total de los miotúbulos, el RNA obtenido se sometió al análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de dos pasos, como se mencionó anteriormente y se llevo a cabo la amplificación de los genes PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1. La detección se realizó utilizando sondas Taqman para cada gen y actina como control endógeno para normalizar los valores de expresión.

3.3 *Determinación de la concentración de AMPc.*

Se determinó la acumulación de AMPc en los miotúbulos de los diferentes tratamientos mediante radioinmunoensayo. Las células fueron lisadas y posteriormente acetiladas en un volumen de anhídrido acético con dos volúmenes de trietilamina, el ensayo se realizó con 50 µl de muestra acetilada, 50 µl de 50 mM de acetato de sodio a pH 6.2. 100µl de anti-AMPc (1:75,000) y 100 µl de AMPc [I^{125}]. Las muestras fueron

incubadas a 4°C durante 12 hrs. Se realizó una precipitación con etanol al 100% y los tubos fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 30 min a 4°C, los sobrenadantes fueron aspirados y los pelles se contaron en un contador Wallac gamma.

3.4 Determinación de la oxidación de palmitato [^{14}C].

Para la evaluación del metabolismo de ácidos grasos se empleó palmitato marcado con ^{14}C . La oxidación de ácidos grasos se determinó cuantificando la producción de $^{14}\text{CO}_2$. Las células fueron preincubadas durante 30 min con DMEM y 250 μM de palmitato (Sigma-Aldrich) en conjunto con 10 μM de genisteína ó 2 nM de leptina o 80 μM de etomoxir o la mezcla entre genisteína y leptina o genisteína y etomoxir. Posterior a la preincubación se agregó durante 30 min el palmitato 1- ^{14}C (1 $\mu\text{Ci}/\text{ul}$).

La reacción se detuvo con la adición de 70% de ácido perclórico, el papel Whatman #3 humedecido con etanolamina/metilselolve se utilizó como trampa para atrapar el $^{14}\text{CO}_2$. Transcurridas tres horas el papel whatman se retiró y se colocó en un vial con 5 ml de líquido de centelleo, para posteriormente contar la cantidad de radioactividad ^{14}C .

4. Estimulación de miotúbulos con genisteína e inhibidores o activadores.

Con el objetivo de conocer la posible vía o vías a través de las cuales la genisteína activan de forma independiente de leptina a AMPK. Los miotúbulos C2C12 silvestre y C2C12^{sh ObR}, se incubaron durante una hora con 10 μM de genisteína y con los inhibidores específicos de SIRT1 (40 μM de Sirtinol⁽⁵⁸⁾), AMPK (20 μM de Compuesto C⁽⁵⁹⁾), CPT1 (80 μM de Etomoxir⁽⁶⁰⁾), JAK2 (5 μM de AG490⁽⁶¹⁾), PLC (0.5 μM de U73122⁽⁶²⁾), Ca^{2+} (5mM de Dantroleno⁽⁶³⁾), o los activadores específicos de SIRT1 (50 μM de Resveratrol⁽⁴⁵⁾), Epac (10 μM de “007”⁽⁵⁷⁾) ó AMPK (2 mM de AICAR⁽⁶⁴⁾) y 10 ng de leptina.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la: 1) Determinación del grado de fosforilación de AMPK y JAK2, 2) La expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1, 3) La actividad desacetilasa de SIRT1 sobre PGC1 α ., 4) La concentración de ATP y AMPc y 5) La oxidación de palmitato [C^{14}].

Para determinar el efecto *in vivo* de la activación de AMPK mediado por genisteína en un modelo de obesidad.

5. Estudios *in vivo* consumo crónico de genisteína.

Para conocer el efecto fisiológico de la genisteína en un modelo de obesidad, se alimento durante dos meses a ratones macho de la cepa C57BL6 con un peso entre 27-29 g los cuales se alojaron en jaulas, con un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad a 22 ° C, y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: dieta alta en grasas (HF) o dieta alta en grasas con 0.2% de genisteína (HF + G) (la genisteína se obtuvo de LC Laboratories). Los ratones tuvieron libre acceso a sus dietas experimentales durante 58 días y el consumo de agua fue *ad libitum*. Las dietas se administraron en forma seca, y la composición de cada dieta se describe en la Tabla 3. Los animales se pesaron cada semana, y el consumo de alimentos se determinó cada día.

Tabla 3. Composición porcentual de la dieta

Ingrediente (%)	HF	HF+ G
Caseína	25	25
Dextrosa	30	30
Sacarosa	10	10
Aceite de maíz	5	5
Celulosa	1.8	1.6
Mezcla de minerales AIN-93M-MX	5	5
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX	3	3
Citrato de colina	0.2	0.2
Manteca	20	20
Genisteína	0	0.2

3.1 Prueba de tolerancia a la glucosa (inyección intraperitoneal)

El día 48, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal (IPGTT). Para lo cual los ratones se mantuvieron en ayuno de 6 horas antes de cada prueba. El IPGTT se inició mediante la inyección intraperitoneal de 2 mg de glucosa / kg. Se obtuvieron muestras de sangre de la cola y la glucosa se midió con un medidor de glucosa OneTouch UltraTM (Accu-Check sensor, Roche Diagnostics). El área bajo la curva (AUC) se calculó como sigue:

$$(\text{AUC}) = \frac{c_0+c_1}{2}(t_1 - t_0) + \frac{c_1+c_2}{2}(t_2 - t_1) + \frac{c_2+c_3}{2}(t_3 - t_2) + \dots \frac{c_6+c_7}{2}(t_6 - t_7).$$

5.1 Gasto energético

El día 58, se llevó a cabo la determinación del gasto energético por calorimetría indirecta. Los ratones fueron alojados individualmente y se mantuvieron a 22 ° C bajo un ciclo de luz-oscuridad 12-h/12-h. La comida estuvo disponible de 19:00-07:00 h y el consumo de agua fue *ad libitum*. Todos los ratones fueron aclimatados por 24 hrs a las

jaulas del calorímetro de antes del comienzo del estudio que fue de 48 h de monitoreo continuó del consumo de oxígeno y de la producción de dióxido de carbono. Los resultados se muestran como el promedio de un ciclo de luz (07:00-19:00 h) y un ciclo de oscuridad (19-7:00 h). Todas las mediciones metabólicas se obtuvieron usando un sistema de calorimetría indirecta de circuito abierto (Sistema Integral Animal de laboratorio Monitoreo, Columbus Instruments, OH). Los análisis se realizaron utilizando el software CLAX según las instrucciones provistas por el fabricante. El coeficiente respiratorio (RER) se calculó como VCO_2/VO_2 .

5.2 *Parámetros bioquímicos, expresión de genes y fosforilación de AMPK*

Transcurrido el tiempo de estudio (día 60) se recolectó la sangre para la determinación de glucosa y triglicéridos. Se obtuvo músculo esquelético el cual se depositó inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes de expresión de genes y extracción de proteínas.

6. Estudio *in vivo* de genisteína (administración aguda).

Para conocer el efecto agudo de la genisteína, se inyectó (10 mg/kg) a ratones macho de la cepa C57BL6 con un peso entre 27-29 g los cuales se alojaron en jaulas, con un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad a 22°C , y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: control inyectados con DMSO (VEH) o genisteína (GEN). Los ratones se mantuvieron en horario restringido, así la dieta (Tabla 2) estuvo disponible de 19:00-07:00 h y el consumo de agua fue *ad libitum*. Los animales se pesaron cada día, y el consumo de alimentos se determinó diario.

6.1 Gasto energético

Durante el primer día los animales fueron adaptados a la inyección intraperitoneal, al segundo día los ratones fueron alojados en las cajas metabólicas y se administro la segunda inyección intraperitoneal, al tercer día los animales fueron alojados individualmente en las jaulas metabólicas como periodo de aclimatación (24 h) Durante todo el estudio los animales se mantuvieron a 22°C bajo un ciclo de luz-oscuridad 12-h/12-h. La comida estuvo disponible de 19:00-07:00 h y el consumo de agua fue *ad libitum*. Al cuarto día, se comenzó el monitoreo continuo (durante 48 h) del consumo de oxígeno y de la producción de dióxido de carbono. Los resultados se

muestran como el promedio de un ciclo de luz (07:00-19:00 h) y un ciclo de oscuridad (19-7:00 h).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

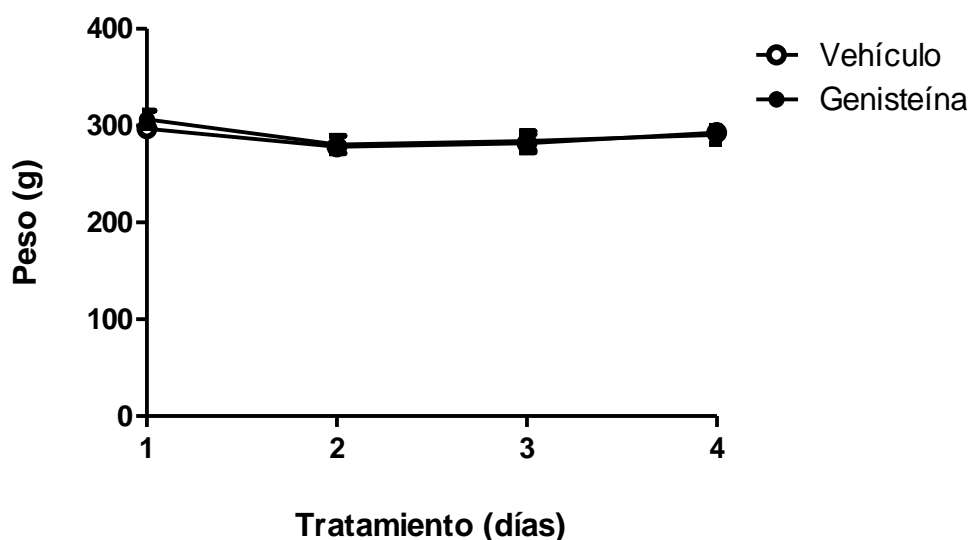
Los resultados se presentarán como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos se evaluarán por análisis de varianza (ANOVA) de una vía. El grado de significancia de las diferencias se determinará por medio de la prueba protegida de la diferencia de los cuadrados mínimos de Fisher (Fisher PLSD), usando el programa StatView (Abacus Concepts) para Macintosh. Las diferencias se consideran significativas con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio piloto *in vivo*.

1.1 Ganancia de peso en ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína.

En la gráfica 2 se observa que no se presentaron diferencias significativas en el peso en los diferentes tratamientos.

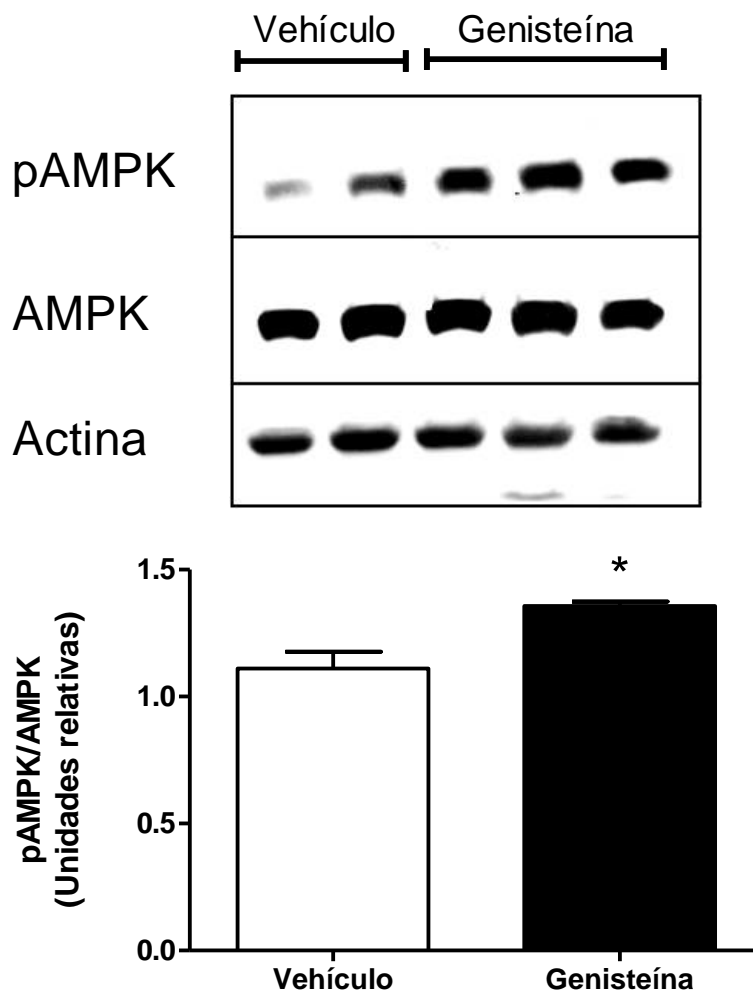


Gráfica 2. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el peso de ratas Wistar. Los valores representan la media \pm del error estándar del peso que presentaron cada uno de los grupos cada día durante el tratamiento.

Respecto a las concentraciones de glucosa no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos.

1.2 Determinación del estado de fosforilación de la AMPK en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína.

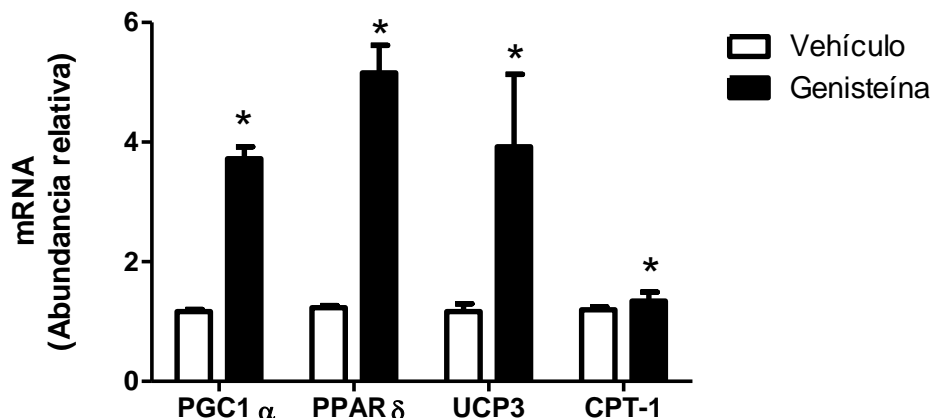
Se determinó la fosforilación de AMPK con la finalidad de conocer si la fosforilación de AMPK en las ratas alimentadas con una dieta con 20% de proteína de soya mencionado anteriormente, se debía al contenido de genisteína Gráfica 3. Observándose un incremento significativo en la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético de las ratas inyectadas IP con genisteína.



Gráfica 3 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Wistar. A) Inmunoblot de AMPK total, Actina y la fosforilación de AMPK Thr¹⁷², B) Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 4 días de estudio, n=5. (*) indica diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

1.3 Determinación de la expresión génica de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1 en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína.

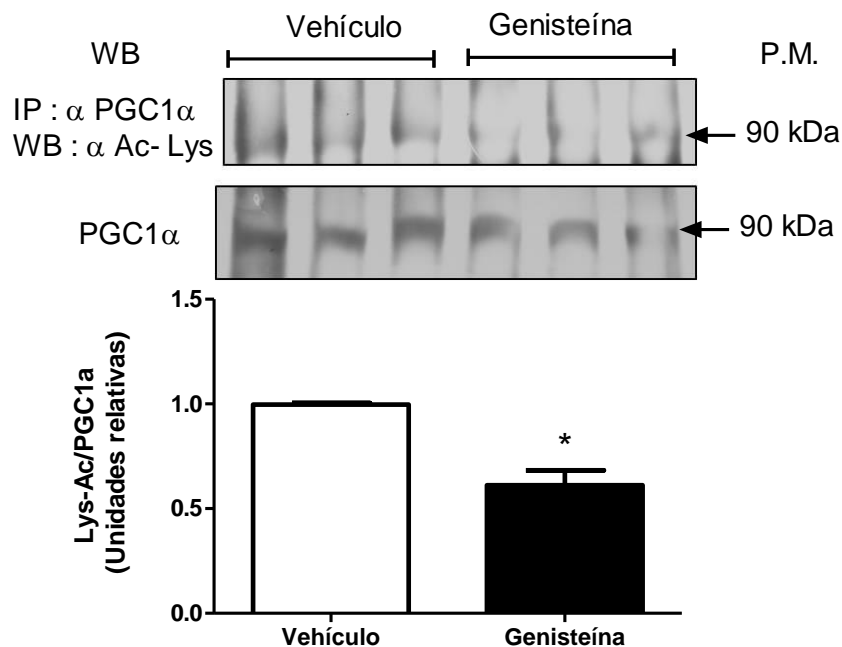
Se determinó la expresión génica mediante RT-PCR de PPAR δ , UCP3, CPT1, PGC1 α y SIRT1 en ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína. Con respecto a PGC1 α , PPAR δ , UCP3 y CPT1 se observa un incremento significativo en los animales inyectados con genisteína⁽⁶⁵⁾ comparado contra su control (DMSO). Gráfica 4.



Gráfica 4 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la expresión génica de PGC1 α , SIRT1, PPAR δ , UCP3 y CPT1 en músculo esquelético de ratas Wistar. Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de DMSO fue utilizada como valor relativo para la genisteína. n=3. (*) Indica diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

1.4 Determinación de la desacetilación de PGC1 α en músculo esquelético de ratas inyectadas intraperitonealmente (IP) con genisteína.

Se determinó el grado de acetilación de PGC1 α en el músculo esquelético de las ratas inyectadas con genisteína. La inyección de genisteína mostró un incremento significativo en la desacetilación de PGC1 α . (Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre la acetilación de PGC1 α en músculo esquelético de ratas Wistar. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades relativas de densidad por cada uno de los grupos. , n=3. (*) Indica diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

Una vez determinado el efecto *in vivo* de la genisteína, se procedió al efecto *in vitro* para conocer el o los posibles mecanismo de acción de activación de AMPK de forma independiente del receptor de leptina.

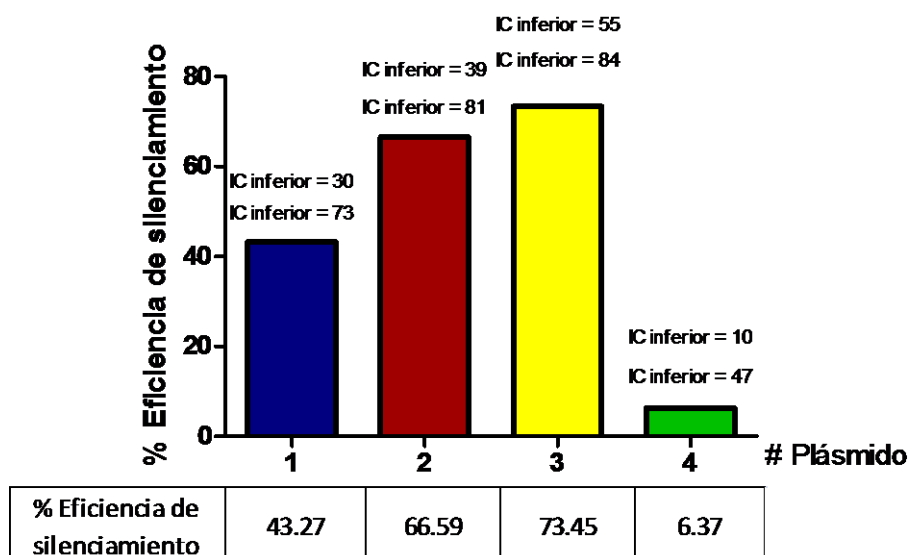
2. Producción de la línea celular C2C12^{sh ObR}.

Se clonó el plásmido de shRNA del receptor de leptina y se cuantificó el DNA

Tabla 4. Concentración de plásmidos que codifican para el shRNA del receptor de leptina.

Plásmido	Abs 260 nm	260 nm/ 280 nm	Concentración ng/ μ l
1	0.04845	1.8	605.62
2	0.4043	1.9	5053.75
3	0.30145	1.9	3768.12
4	0.3181	1.9	3976.25
Negativo	0.488	1.9	6110

Se realizó un rango dinámico para conocer las concentraciones de mRNA de ObR en células C2C12. Se transfectaron las células con los plásmidos, para establecer el o los plásmidos más eficaces en disminuir la expresión de ObR. Transcurridas 24 h después de la transfección se obtuvo RNA y se realizó el PCR-Tiempo Real para calcular el % de Eficiencia de silenciamiento. Gráfica 6.

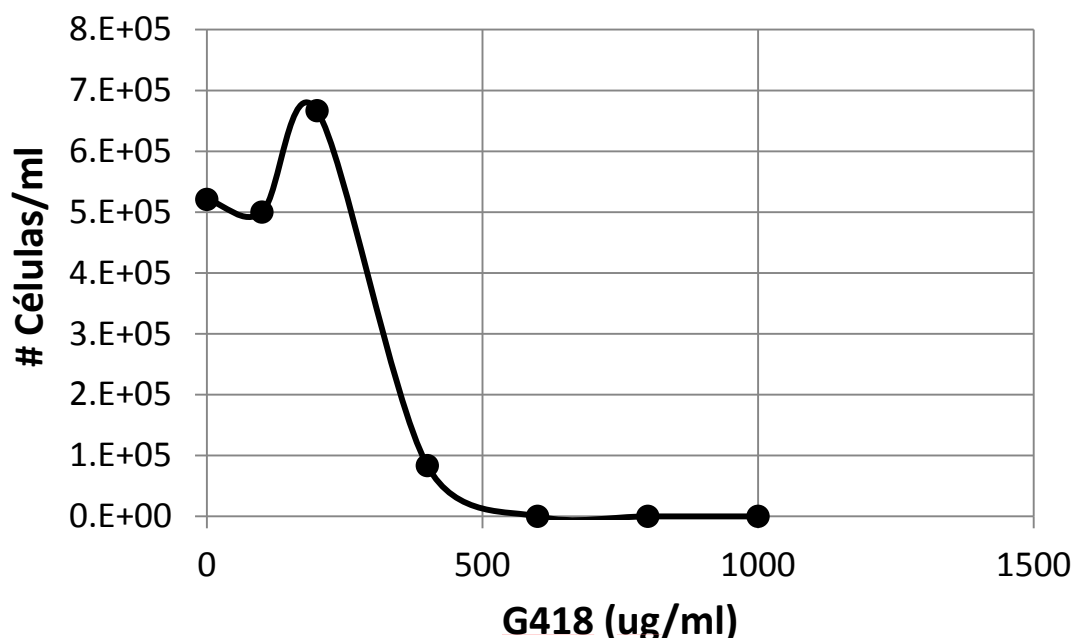


Gráfica 6. Determinación del % de silenciamientos en células C2C12 transfectadas con los diferentes plásmidos del shRNA del receptor de leptina (sh ObR). Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La eficiencia del silenciamiento se calculó en base a los $\Delta\Delta$ Ct obtenidos de la Δ Ct del PCR-tiempo real. n= 3.

En base a los resultados obtenidos (Ver interpretación de resultados en metodología) Se determinó que la siguiente transfección sería con el plásmido 2 y 3 (en conjunto) esto con la finalidad de obtener un mayor % de eficiencia de silenciamiento.

2.1 Selección de células transformantes estables con fármaco (G418).

Antes de la transfección para generar las células transformantes estables, se debe de conocer la concentración necesaria de antibiótico para matar a las células que no posean el plásmido, esta cantidad de antibiótico se determina generando una curva dosis respuesta. La concentración efectiva será la concentración mínima que mate a las células que no posean el plásmido. Gráfica 7.



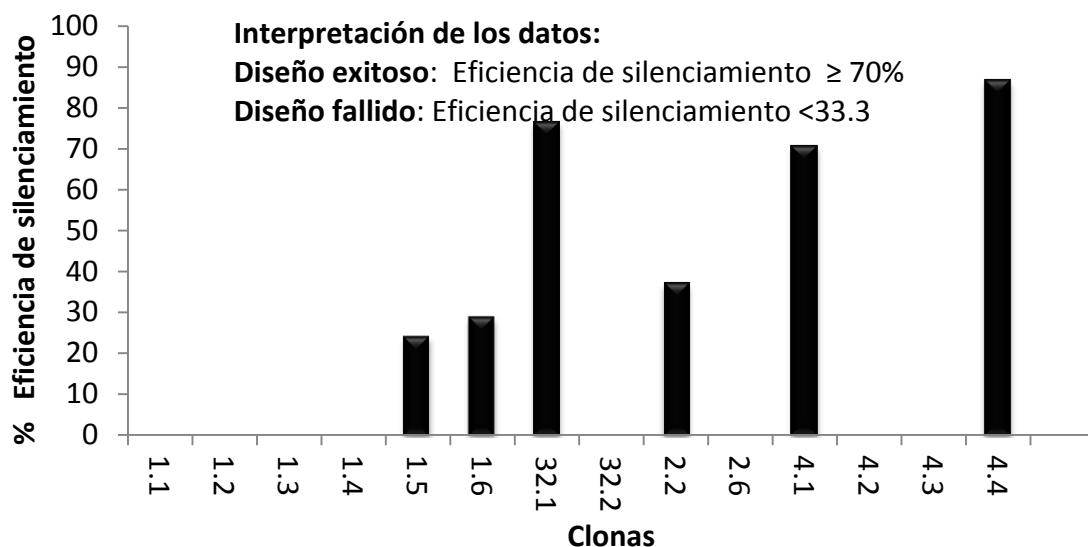
Gráfica 7 Curva dosis respuesta de neomicina en células C2C12 para conocer la concentración efectiva de medicamento para generar transfectantes estables. Se utilizó un rango de concentraciones de G418 0, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El experimento se realizó por triplicado.

En base a la curva dosis respuesta de neomicina se determinó que la concentración efectiva es de 600 ug/ml. Después de la transfección con los plásmidos 2 y 3 (en conjunto) a las células C2C12, fueron tripzinizadas y colocadas en medio D-MEM + 10% SFB con 600 ug/ml de G418.

Una vez transfectadas las células se procedió a realizar diluciones de los cultivos transfectados en medio selectivo con fármaco, esto con la finalidad de obtener monoclonas. Este procedimiento se realizó durante cuatro semanas y transcurrido, se

obtuvo RNA y se realizó el PCR-Tiempo Real para calcular el % Eficiencia de silenciamiento. Gráfica 8.

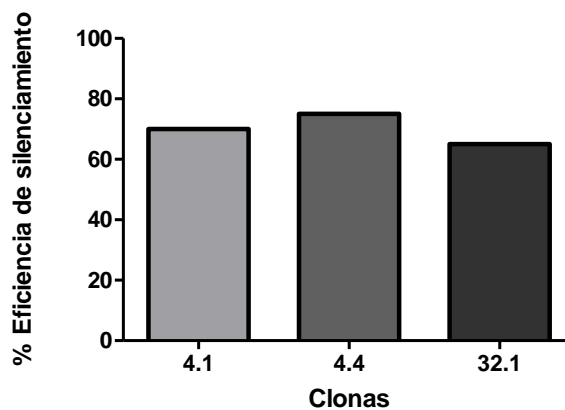
Se estableció que las clonas 32.1, 4.1 y 4.4 poseen un silenciamiento exitoso del receptor de leptina. Posteriormente se corroboraron las clonas, para lo cual se obtuvo RNA y se realizó el PCR-Tiempo Real para calcular el % de Eficiencia de silenciamiento (knockdown) de las clonas seleccionadas (32.1, 4.1, 4.4). Gráfica 9. Por % de eficiencia de silenciamiento se decidió trabajar con la clona 4.4 para los posteriores experimentos y de aquí en adelante se le conocerá como C2C12^{sh ObR}.



Gráfica 8 Determinación del % de eficiencia de silenciamiento en células C2C12 transfectadas con el plásmido 2 y 3 del shRNA del receptor de leptina (sh ObR). Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La eficiencia del silenciamiento se calculó en base a los $\Delta\Delta Ct$ obtenidos de la ΔCt del PCR-tiempo real. n= 3.

2.2 Inmunoblot de ObR en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR}.

Para conocer la presencia o ausencia del receptor de leptina (ObR) tanto en las C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR}. Se obtuvo proteína y se realizó un inmunoblot para ObR. Tanto las C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} se diferenciaron con suero de caballo 2% cuando se obtuvo 100% de confluencia, las células fueron puestas durante 1 hr en DMEM bajo en glucosa y suero, posterior a la hora se agregó DMEM con glucosa sin suero y se obtuvo la proteína. Figura 9.



Gráfica 9 Determinación del % de eficiencia de silenciamiento en células C2C12 seleccionadas mediante dilución (clona 4.1, 4.4 y 32.1) transfectadas con el plásmido 2 y 3 del shRNA del receptor de leptina (sh ObR). Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La eficiencia del silenciamiento se calculó en base a los $\Delta\Delta Ct$ obtenidos de la ΔCt del PCR-tiempo real. n= 3.

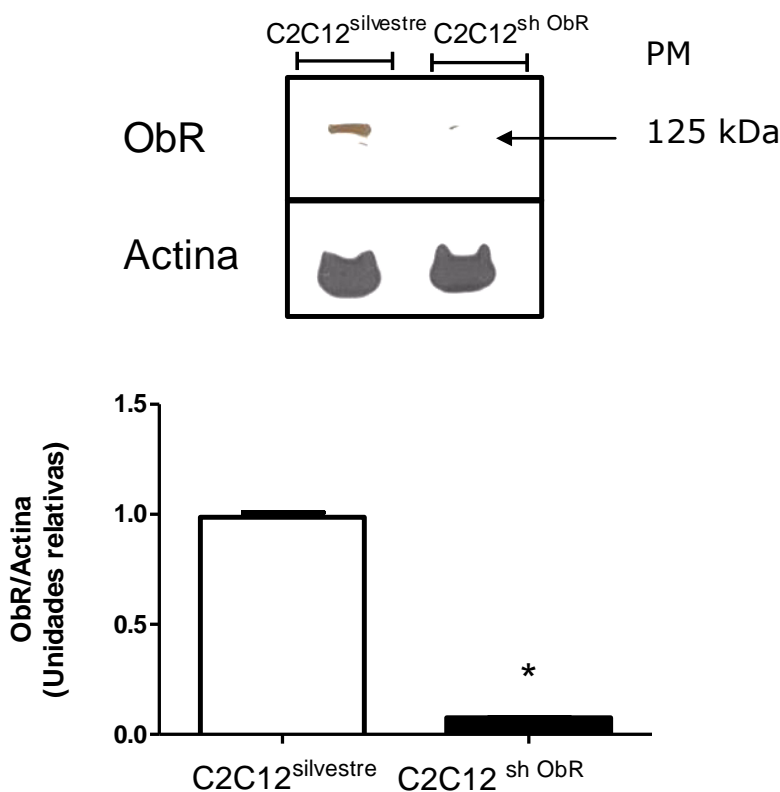


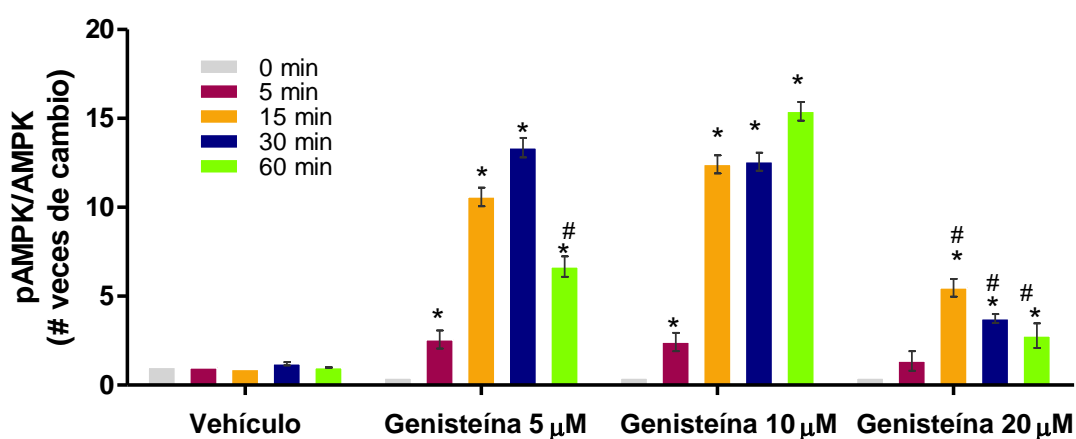
Fig. 9 Expresión del receptor de leptina (ObR) de ratón en extractos de C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} (* Indica diferencia entre C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} ($p < 0.05$)).

3. Curva temporal, para determinar el tiempo y dosis adecuados de estimulación con isoflavonas en C2C12^{silvestres} diferenciadas.

Para determinar si las isoflavonas pueden activar a la AMPK. Los miotúbulos C2C12^{silvestres} diferenciados se incubaron durante 5, 15, 30 y 60 min con: 5 μ M, 10 μ M ó

20 μ M de genisteína. Posterior a las incubaciones se obtuvieron extractos citoplasmáticos y se realizó un inmunoblot para conocer el grado de fosforilación de AMPK. Gráfica 10.

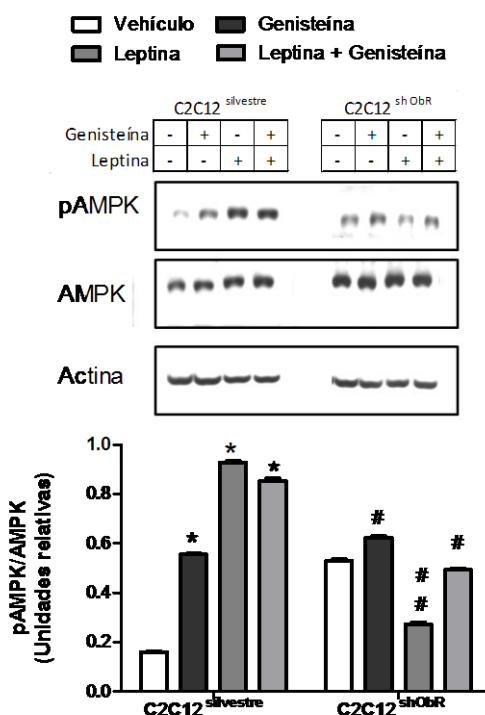
Se observó que la concentración de 5 μ M activaba la fosforilación de AMPK en la línea celular C2C12, sin embargo, estudios previos en el laboratorio ⁽⁴⁹⁾ habían mostrado que esta dosis es inferior a las concentraciones encontradas en suero (40-240 ng de genisteína/ml) en animales que consumen una dieta suplementada con genisteína ⁽⁵⁰⁾. Por el contrario, el uso de 20 μ M de genisteína mostró tener un efecto menor respecto a la fosforilación de AMPK, lo anterior pudo deberse posiblemente a los efectos inhibitorios que posee la genisteína sobre las proteínas con actividad de tirosina cinasa, como es el caso de la proteína JAK2 ⁽⁶⁶⁾, la cual como se mencionó en un principio es responsable de la fosforilación de AMPK mediada por leptina. Estudios realizados en la línea celular PaCa-2 han mostrado que la capacidad de la genisteína como inhibidor de la actividad de las proteínas tirosina-cinasas es dependiente de la dosis, así concentraciones mayores a 10 μ M, inhiben la fosforilación de STAT3 dependiente de JAK2 ⁽⁶⁷⁾ y por otro lado estudios en miotúbulos C2C12 muestran que la genisteína permite la fosforilación de JAK2 ⁽⁶⁸⁾. Lo anterior, nos condujo a utilizar una concentración menor de genisteína, y observamos que el uso de 10 μ M, permitía la fosforilación a los 60 min de AMPK en la línea celular C2C12. Así, se determinó utilizar el tiempo (60 min) y una concentración de 10 μ M de genisteína durante los siguientes experimentos.



Gráfica 10 Efecto de diferentes concentraciones (5, 10 o 20 μ M) de isoflavonas a los tiempos 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min sobre la fosforilación de AMPK Thr ¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestre}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades relativas al vehículo tiempo 0 de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas entre el vehículo ($p < 0.05$), (#) indica diferencias significativas entre la concentración 10 μ M vs 5 μ M o 20 μ M de genisteína ($p < 0.05$).

3.1 Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína, leptina o leptina y genisteína.

Para conocer y comprobar, si el receptor de leptina estaba involucrado en la fosforilación de AMPK que se observó al tratar a los miotúbulos con genisteína, se incubó durante 1 hr a los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} con 10 ng de leptina (concentraciones en suero encontradas en condiciones normales), 10 μ M de genisteína o 10 ng de leptina + 10 μ M de genisteína. (Gráfica 11) La genisteína, la leptina y la mezcla entre genisteína y leptina incrementaron la fosforilación de AMPK en la línea celular C2C12^{silvestre}, para el caso de los miotúbulos C2C12^{shObR} se observó que el vehículo, por sí sólo es capaz de incrementar la fosforilación de AMPK, sin embargo desconocemos la razón de este acontecimiento. Respecto a la genisteína comparado con el vehículo observamos que, esta fue capaz de incrementar significativamente la fosforilación de AMPK en “ausencia” del receptor de leptina. Para el caso de la leptina, en las C2C12^{shObR} esta disminuyó la fosforilación de AMPK comparado con el vehículo, lo que nos indica de forma indirecta el silenciamiento exitoso del receptor de leptina. Respecto a la mezcla entre genisteína y leptina, la genisteína recuperó en parte la fosforilación de AMPK, sin embargo no se restableció por completo.



Gráfica 11. Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 ng de leptina y 10 ng de leptina + 10 μ M de genisteína a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas entre el vehículo C2C12^{silvestre} ($p < 0.05$), (#) indica diferencias significativas entre el vehículo C2C12^{shObR} ($p < 0.05$). n=3

Con el objetivo de conocer la posible vía o vías a través de las cuales la genisteína activan de forma independiente de leptina a AMPK. Los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR}, se incubaron durante una hora con 10 μ M de genisteína y con los inhibidores específicos de SIRT1 (40 μ M de Sirtinol⁽⁵⁸⁾), AMPK (20 μ M de Compuesto C⁽⁵⁹⁾), CPT1 (80 μ M de Etomoxir⁽⁶⁰⁾), JAK2 (5 μ M de AG490⁽⁶¹⁾), PLC (0.5 μ M de U73122⁽⁶²⁾), Ca²⁺ (5mM de Dantroleno⁽⁶³⁾), o los activadores específicos de SIRT1 (50 μ M de Resveratrol⁽⁴⁵⁾), Epac (10 μ M de “007”⁽⁵⁷⁾) ó AMPK (2 mM de AICAR⁽⁶⁴⁾) o 10 ng de leptina.

4. VIA SIRT1.

Como se mencionó una de las posibles vías por la que la genisteína puede incrementar la fosforilación de AMPK es mediante la actividad de SIRT1 para comprobar lo anterior, se realizó lo siguiente:

4.1 Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} tratadas con genisteína, sirtinol, o Compuesto C.

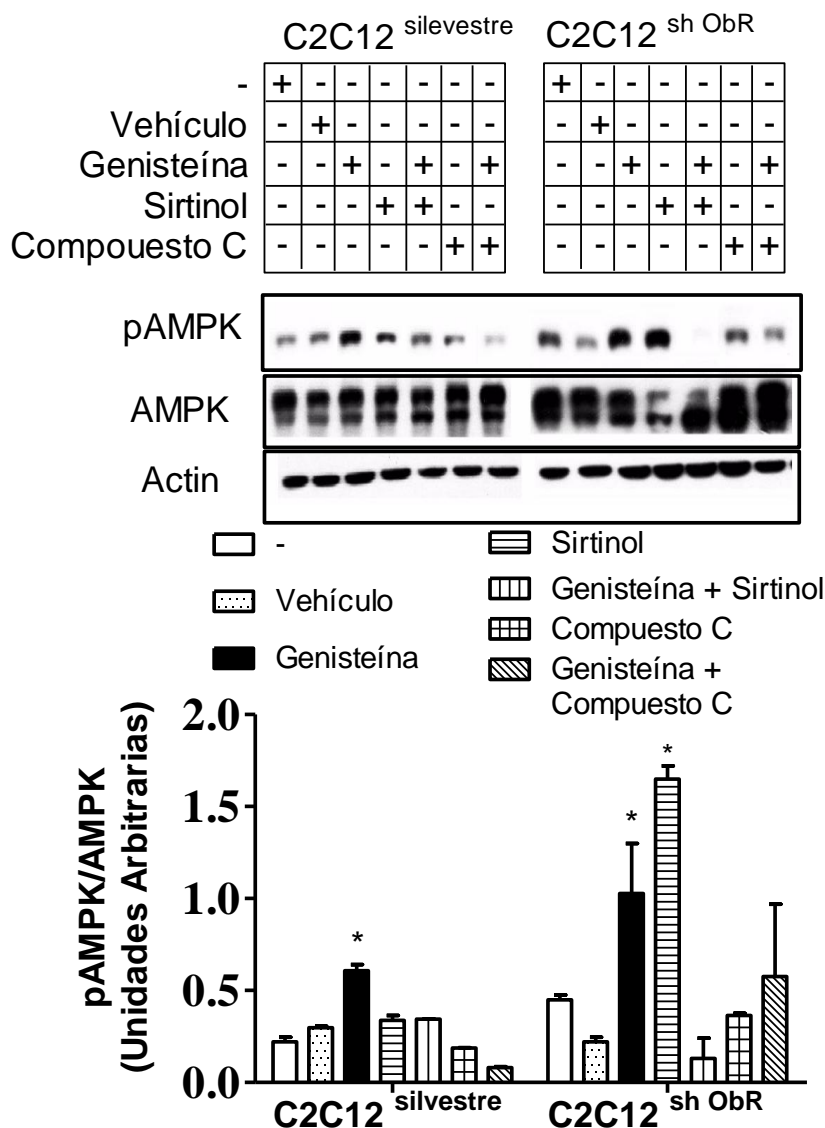
Para conocer si los efectos de la genisteína sobre la fosforilación de AMPK eran mediados por la actividad desacetilasa de SIRT1, los miotúbulos se incubaron durante 60 min con 10 μ M de genisteína o 40 μ M de sirtinol o 20 μ M de compuesto C (Gráfica 12).

Respecto a la fosforilación de AMPK se observó un incremento significativo en los miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} cuando estos fueron incubados con genisteína, cuando se agregó el sirtinol, en el caso de las C2C12^{silvestres}, se observa una ligera disminución comparado con la activación mediada por la genisteína. De forma interesante, cuando los miotúbulos C2C12^{shObR} fueron incubados con sirtinol se incrementó la fosforilación de AMPK, existen datos controversiales en el uso de sirtinol, algunos estudios indican que el sirtinol inhibe la proliferación en células cancerígenas y que dichos efectos son mediados en parte a la activación de AMPK⁽⁶⁹⁾, otros estudios⁽⁷⁰⁾ muestran que el uso de sirtinol es un inhibidor de AMPK y de la SIRT1. En nuestro caso observamos que el sirtinol en ambas líneas celulares al ser comparado con el vehículo incrementa la fosforilación de AMPK, sin embargo, cuando se incubó tanto a los miotúbulos C2C12^{silvestres} como a los miotúbulos C2C12^{shObR} con genisteína en conjunto con sirtinol, se observó que la fosforilación de AMPK disminuye

significativamente. Estos resultados indican que la genisteína mediante el incremento en la actividad de desacetilasa de la proteína SIRT1 es capaz de activar a AMPK. Estudios indican que las isoflavonas (genisteína o daidzeína) son capaces de incrementar la actividad desacetilasa de SIRT1, por otro lado, se ha demostrado que la SIRT1 mediante el incremento en la desacetilación de LKB1 permite la activación de AMPK, por lo que al inhibir a la actividad desacetilasa de SIRT1 mediante el uso de sirtinol, se podría estar inhibiendo una de las vías clásicas de activación de AMPK ($LKB1 \rightarrow AMPK$), y no así a la otra vía de activación ($CAMKK \rightarrow AMPK$), con los resultados obtenidos hasta el momento en el caso de los miotúbulos C2C12^{silvestres} el uso del sirtinol por sí solo no inhibe por completo la fosforilación de AMPK y para el caso de los miotúbulos C2C12^{shObR}, el uso del sirtinol incrementó significativamente la fosforilación de AMPK. Estos fenómenos pueden atribuirse a que la vía $CAMKK \rightarrow AMPK$ en ambas líneas celulares aún se encuentra activa, sin embargo, lo anterior es sólo una hipótesis, debido a que no se tienen los experimentos para avalar esta idea. Por otro lado, como se mencionó anteriormente algunos estudios mencionan que el sirtinol puede activar a AMPK.

De forma interesante, el uso de la genisteína en conjunto con el sirtinol en los miotúbulos C2C12^{silvestres} disminuyó la fosforilación de AMPK, sin que esta se viera inhibida por completo, lo anterior señala al que la vía $CAMKK \rightarrow AMPK$ como se observó en el caso del sirtinol aún se encuentra activa. En el caso de los miotúbulos C2C12^{shObR} el uso de genisteína en conjunto con el sirtinol sí inhibe la fosforilación de AMPK, indicando probablemente que el mecanismo por el cual se activa AMPK en esta línea celular depende en gran parte de la vía $SIRT1 \rightarrow LKB1 \rightarrow AMPK$, para afirmar lo anterior es necesario realizar más estudios al respecto.

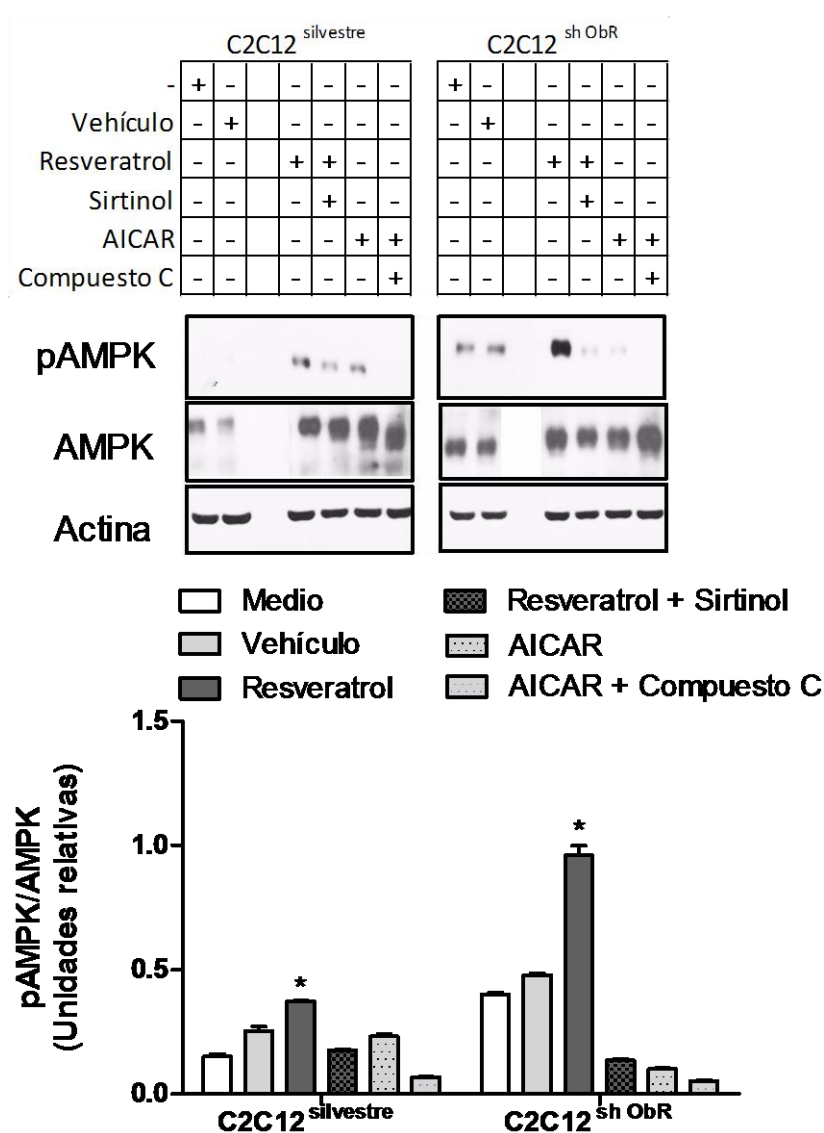
Respecto al efecto del compuesto C sobre la fosforilación de AMPK se observa que, tanto en miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} el compuesto C no permitió la activación de AMPK, resultado un tanto sorprendente debido a que el efecto inhibitorio del compuesto C sobre AMPK es sobre la actividad de cinasa de esta proteína, y no en la fosforilación de la misma. Al incubar a los miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} con el compuesto C en conjunto con la genisteína, no se permitió la fosforilación de AMPK (Gráfica 12). El uso del compuesto C nos indica que la acción de la genisteína sobre la fosforilación de AMPK es dependiente de una cascada de señalización río arriba de AMPK, que probablemente involucre a la vía $LKB1 \rightarrow AMPK$ o $CAMKK \rightarrow AMPK$.



Gráfica 12 Efecto de 10 μM de genisteína, 40 μM de Sirtinol, 10 μM de genisteína con 40 μM de Sirtinol, 20 μM de Compuesto C y 10 μM de genisteína con 20 μM de Compuesto C a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 *silvestre* y C2C12 *shObR*. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas entre el vehículo de la respectiva línea celular. ($p < 0.05$). $n=3$

En el presente estudio, se incubaron a ambas líneas celulares con los controles positivos de SIRT1 y de AMPK. El resveratrol fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK en ambos miotúbulos, la inclusión de sirtinol en los miotúbulos C2C12 *silvestres* y C2C12 *shObR* no afectó la capacidad del resveratrol sobre la fosforilación de AMPK. (Gráfica 13). Respecto al AICAR, este no fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK, lo anterior puede deberse a la concentración utilizada de AICAR, la cual se ha reportado en 5 mMol, sin embargo estas

concentraciones se sabe tienen efectos no sólo en la fosforilación de AMPK. Con la inclusión del compuesto C, el efecto sobre la fosforilación de AMPK se vio disminuido. Para el caso de los miotúbulos C2C12^{shObR}, el AICAR no fue capaz de incrementar la fosforilación. (Gráfica 13).



Gráfica 13 Efecto de 10 μ M de genisteína, 50 μ M Resveratrol, 10 μ M de genisteína con 40 μ M de Sirtinol, 50 μ M Resveratrol con 40 μ M de Sirtinol y 40 μ M de Sirtinol, 10 μ M de genisteína, 2mM de AICAR, 10 μ M de genisteína con 20 μ M de Compuesto C, a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas entre el vehículo C2C12^{silvestre} ($p < 0.05$), (#) indica diferencias significativas entre el vehículo C2C12^{shObR} ($p < 0.05$). n=3

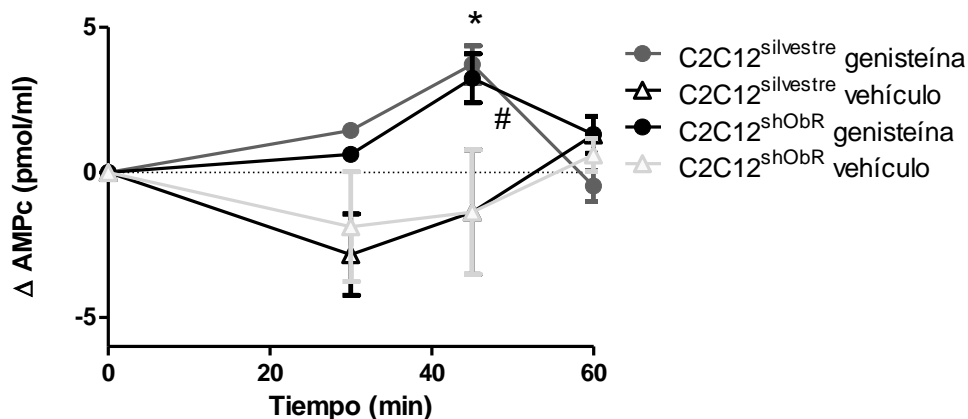
5. VÍA INHIBIDOR DE FOSFODIESTERASAS (PDE).

Como se mencionó anteriormente tanto el resveratrol como la genisteína pertenecen al grupo de polifenoles, recientemente se estudió el efecto del resveratrol como inhibidor de las fosfodiesterasas para la activación de AMPK, por lo que se quiso conocer si la genisteína era capaz de tener el mismo efecto sobre el acumulo de AMPc y de esta forma permitir la fosforilación de AMPK.

5.1 Determinación de la acumulación de AMPc en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína.

Se determinó la acumulación de AMPc en los miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} incubados con 10 μ M de genisteína durante 0, 30, 45 y 60 min. (Gráfica 14)

Observándose un incremento en las concentraciones de AMPc a los 45 min de incubación con genisteína comparados con el tiempo 0.



Gráfica 14 Efecto de 10 μ M de genisteína 0 0.125 mM de IBMx a los 0, 30, 45 y 60 min sobre el incremento en la acumulación de AMPc en las líneas celulares C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}(*) Indica diferencias significativas entre el tiempo 0 en C2C12^{silvestre} ($p < 0.05$), (#) indica diferencias significativas entre el tiempo 0 en C2C12^{shObR} ($p < 0.05$). $n = 3$

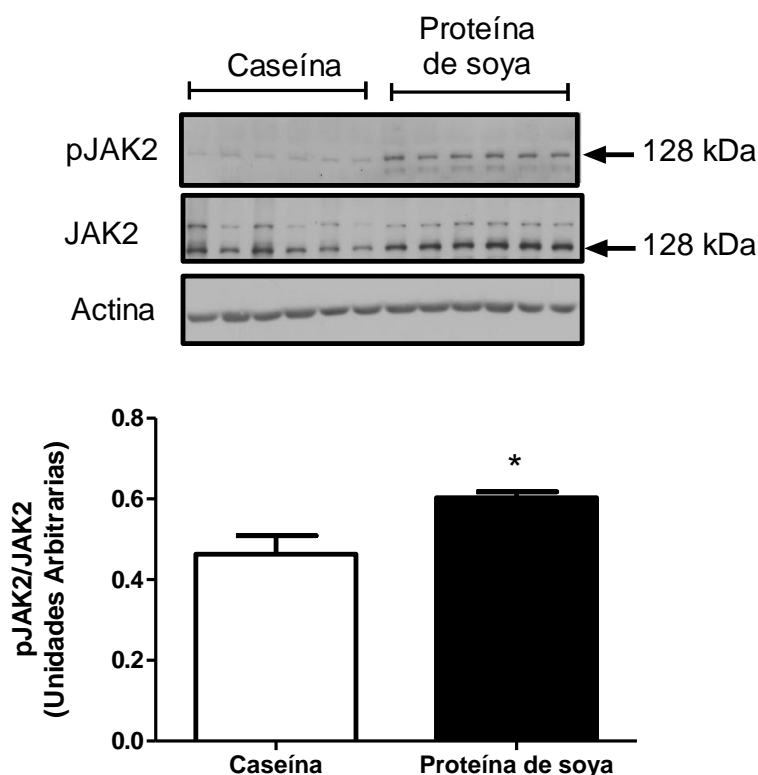
Lo anterior indicaba que la genisteína incrementa el AMPc en ambas células, de forma similar al resveratrol, por lo que este incremento podría ser el responsable en la fosforilación de AMPK observada en ambas líneas celulares. Sin embargo, de forma interesante, en el presente estudio observamos que los miotúbulos principalmente los C2C12^{shObR} mostraban respecto los miotúbulos C2C12^{silvestres} una mayor fosforilación mayor al ser tratados con genisteína, lo que llevo a pensar que la respuesta observada en estos miotúbulos estaba relacionada con la vía por la cual la leptina lleva a cabo sus

efectos sobre la oxidación de ácidos grasos que es dependiente de la activación de JAK2, en este sentido, se ha mostrado que JAK2 puede ser activado de forma indirecta por el incremento en las concentraciones de AMPc.

Con estos antecedentes, se investigó en primera instancia si las ratas Zucker *fa/fa* (ratas que poseen una mutación en el receptor de leptina, y una menor fosforilación de AMPK en el músculo esquelético) que consumieron una dieta con 20% de proteína de soya y que habían mostrado un incremento significativo en la fosforilación de AMPK y ACC en el músculo esquelético también presentaban un incremento en la fosforilación de JAK2.

5.2 Inmunoblot de pJAK2 y JAK2 total en músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa* alimentadas con aislado de proteína de soya.

Se observó que las ratas Zucker *fa/fa* que consumieron una dieta con 20% de proteína de soya tenían una mayor fosforilación de JAK2 en el músculo esquelético comparado con el grupo que consumió una dieta con 20% de caseína. (Gráfica 15).

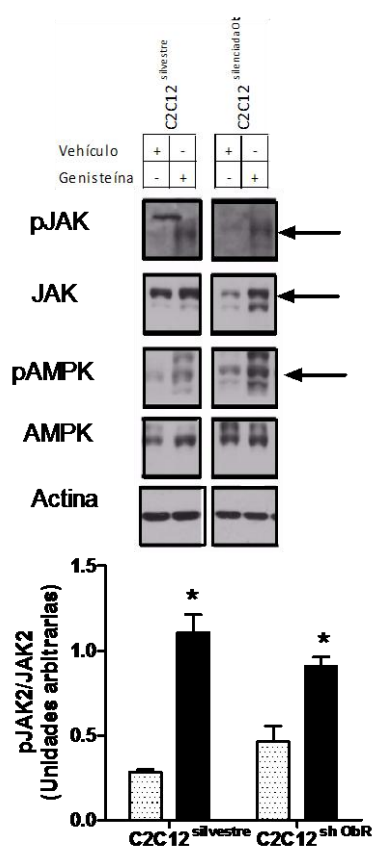


Gráfica 15. Efecto del consumo de una dieta con 20% de proteína de soya sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa*. A) Inmunoblot de JAK total, Actina y la fosforilación de JAK2 B) Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 160 días de estudio, (*) Indica diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), (#) $n = 5$. Para el caso de JAK2 y JAK2 fosforilado se indica mediante una flecha (\rightarrow) la banda que fue cuantificada.

Una diferencia a considerar entre la proteína de soya utilizada en este estudio y la caseína es el contenido de isoflavonas. Al tener como antecedente que la genisteína era capaz de permitir un incremento en la concentración de AMPc tanto en los miotúbulos silvestres como silenciados para el receptor de insulina, se investigó primero si los la genisteína era capaz de incrementar la fosforilación de JAK2 en ambas líneas celulares.

5.3 Inmunoblot de pJAK2, JAK2, pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} tratadas con genisteína.

Se observó que la genisteína es capaz de incrementar la fosforilación de JAK2 y de AMPK en ambos miotúbulos. (Gráfica 16).



Gráfica 16 Efecto de 10 µM de genisteína sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. (p<0.05). n=3. Para el caso de AMPK total, AMPK fosforilado y de JAK total y de JAK fosforilado se indica mediante una flecha (→) la banda que fue cuantificada.

La genisteína, es reconocida como un inhibidor inespecífico de las proteínas con actividad de tirosina cinasas (Figura 10) y de esta forma es utilizada como tratamiento para inhibir la proliferación celular de células tumorales, sin embargo, estudios

realizados en miotúbulos C2C12 donde utilizan genisteína como inhibidor de JAK2 (proteína con actividad de tirosina cinasa) demuestran que la genisteína no inhibe la actividad de JAK2 sobre una de sus proteínas blanco como STAT3, y que por el contrario la genisteína incrementa la fosforilación de JAK2 y no afecta la fosforilación de STAT3 ⁽⁶⁸⁾. Sin embargo, estudios realizados en líneas celulares de cáncer de páncreas (MIA PaCa-2), demuestran que el uso de 10 μ M de genisteína disminuye la fosforilación de STAT3, lo que inhibe la proliferación celular ⁽⁶⁷⁾. Es importante mencionar que, en el presente estudio la incubación con genisteína en ambos miotúbulos permitió la fosforilación de STAT3 (no se muestran los datos). Lo anterior, podría indicar que la acción de la genisteína como inhibidor de la actividad de proteínas tirosina cinasas depende de la línea celular empleada o por el contrario que esta concentración de genisteína en esta línea celular no inhibe a la actividad de tirosina cinasa de JAK2, debido al alcance del presente estudio, desconocemos si esta concentración de genisteína en esta línea celular inhibe a otras tirosinas cinasas.

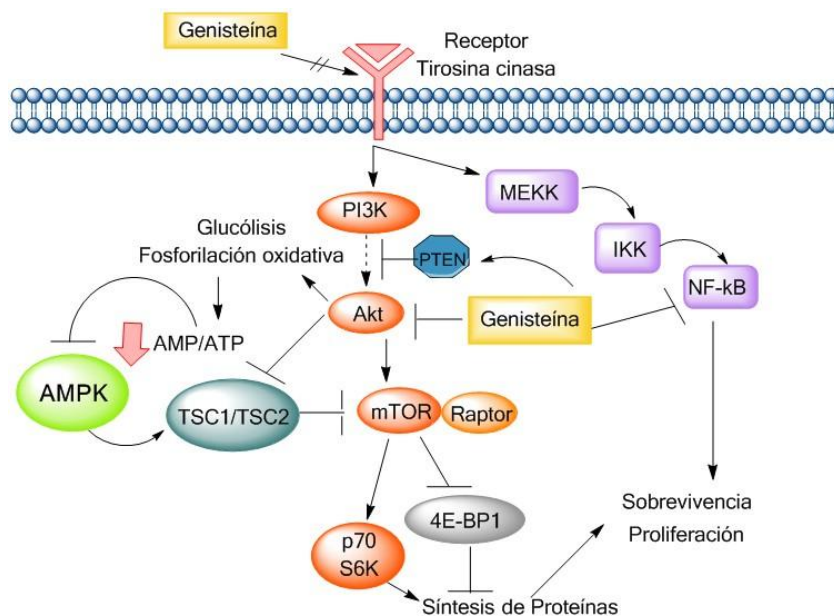


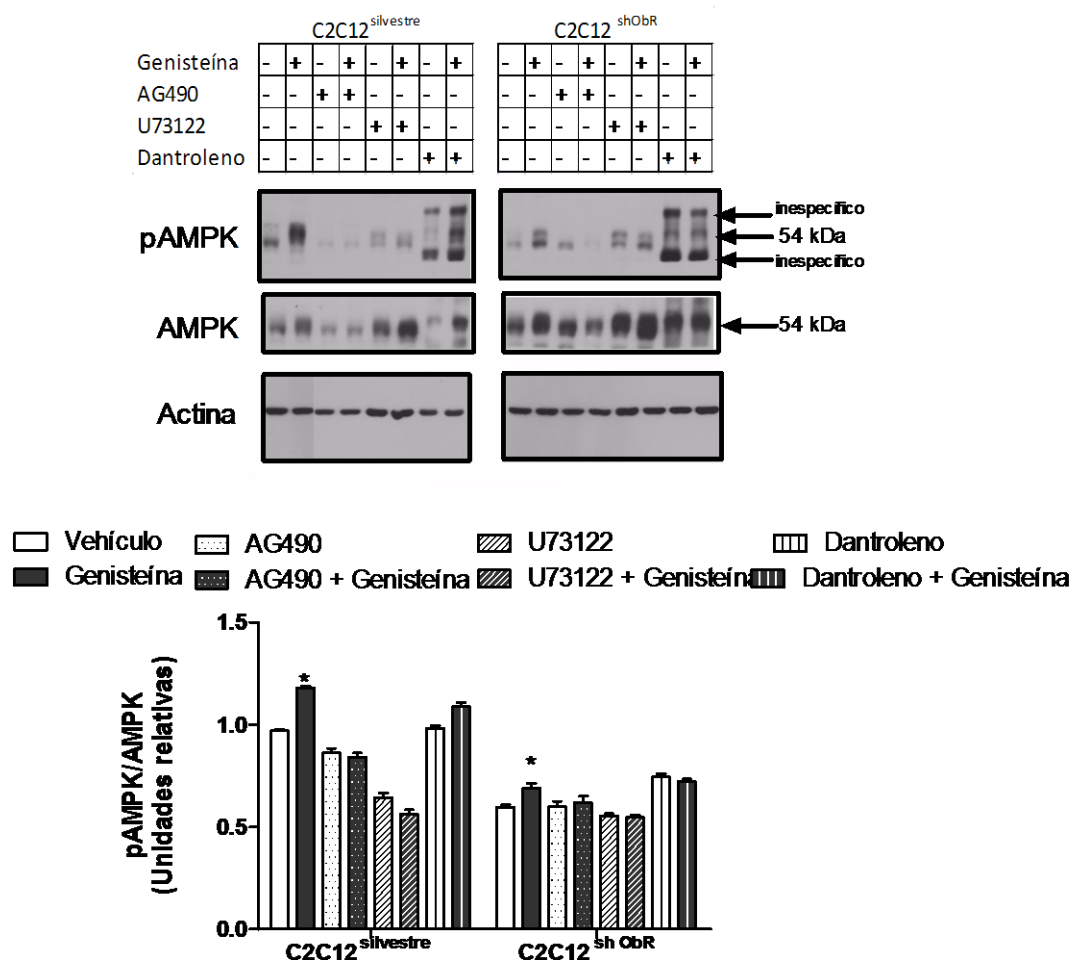
Figura 10. Efecto de la genisteína sobre receptores de tirosina cinasa. La genisteína es capaz de inhibir la actividad de los receptores de tirosina cinasa, la actividad de Akt, y de NF- κ B e incrementar la actividad de PTEN en células tumorales y de esta forma reducir la supervivencia y proliferación celular. Por otro lado, una vez que la genisteína activa a la AMPK esta es capaz de inhibir a la proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) lo que conlleva a una disminución en la síntesis de proteínas que se ve reflejado en una menor proliferación celular.

5.4 Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína o AG490.

Una vez determinado que la genisteína incrementaba la fosforilación de JAK2 en las células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina, se quiso comprobar si la

genisteína mediante la activación de la función de cinasa de la JAK2 ocasionaba la fosforilación de AMPK, para lo cual los miotúbulos C2C12 ^{silvestre} y C2C12 ^{shObR} se incubaron durante 60 min con 10 μ M de genisteína o 10 μ M de AG490 (inhibidor de la función cinasa de JAK2) o 10 μ M de AG490 + 10 μ M de genisteína. La genisteína en ambas líneas celulares fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK. Al inhibir la actividad cinasa de JAK2 no se observó la fosforilación de AMPK en ambas líneas celulares, lo que nos indica que parte de la fosforilación de AMPK es dependiente de la actividad de cinasa de JAK2.

Al incubar a las células con el inhibidor de la actividad cinasa de JAK2 en conjunto con genisteína se observa que, la genisteína no fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK. (Gráfica 17). Por lo que, la genisteína mediante la activación de la función de cinasa de JAK2 permite la activación de AMPK en ambas líneas celulares.



Gráfica 17 Efecto de 10 μ M de genisteína, 10 μ M de AG490, 10 μ M de AG490 + 10 μ M de genisteína, 1 μ M de U73122, 1 μ M de U73122 + 10 μ M de genisteína, 5mM de dantroleno y 5mM de dantroleno + 10 μ M de genisteína a los 60 min sobre la fosforilación de AMPK en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. (p<0.05). n=3

Al determinar que la genisteína era capaz de incrementar la fosforilación de JAK2 y en consecuencia incrementar la fosforilación de AMPK en los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}. Se estudió el posible mecanismo por el cual la genisteína, permitía la fosforilación de JAK2 en los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}.

Uno de los posibles mecanismos por los cuales JAK2 puede ser activado (fosforilado) es mediante la fosfolipasa C (PLC) y sus precursores, IP₃/ Ca²⁺ y diacilglicerol / PKC⁽⁶¹⁾. El mecanismo anterior (PLC, IP₃, Ca²⁺ y PKC) es similar al observado con el uso de resveratrol en miotúbulos C2C12 para la posterior activación de AMPK, de tal forma, que se consideró un posible mecanismo por el cual la genisteína podría mediante JAK2 activar a AMPK, lo anterior considerando que la genisteína al igual que el resveratrol pertenecen al grupo de polifenoles.

Para conocer si la genisteína activaba a la vía JAK2→AMPK en los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} era mediante la vía de PLC o dependía de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular se utilizaron diversos inhibidores, a continuación se muestra y se explican los resultados obtenidos.

5.5 Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína o U73122.

Para conocer si la activación de AMPK mediada por genisteína era por la vía de PLC, los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} se incubaron durante 60 min con 10 μM de genisteína o 1 μM de U73122 (inhibidor de la PLC) o 1 μM de U73122 + 10 μM de genisteína.(Gráfica 17). La genisteína incrementó la fosforilación de AMPK en las C2C12 silvestres como en las células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina. El uso del inhibidor de la PLC por si mismo fue incapaz de permitir la fosforilación de AMPK en ambas líneas celulares. Al inhibir a la fosfolipasa C tanto en las C2C12 silvestres como en las células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina se observó que la genisteína no fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK. (Gráfica 17). Este resultado sugiere que la actividad de la PLC se encuentra involucrada en la fosforilación de AMPK mediada por la genisteína. Por otro lado, se sabe que una consecuencia de la activación de PLC es el incremento en las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ lo que puede a su vez activar a JAK2⁽⁶¹⁾. Para conocer si la activación de AMPK mediada por genisteína dependía de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} se incubaron con genisteína o un inhibidor de la liberación de calcio.

5.6 Inmunoblot de pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína o Dantroleno.

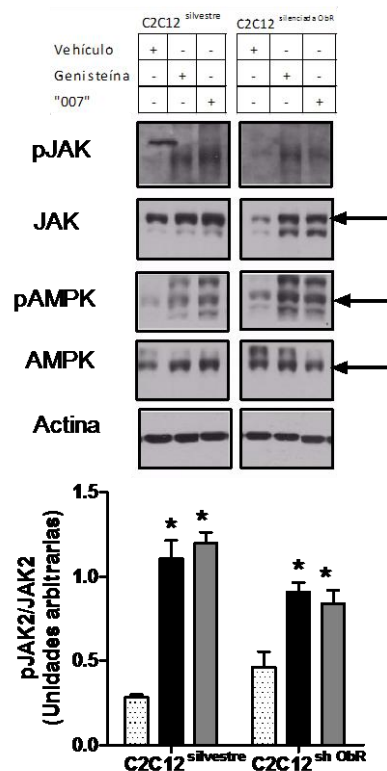
Para conocer si la activación de AMPK mediada por genisteína dependía de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} se incubaron durante 60 min con 10 µM de genisteína, 5mM de dantroleno (inhibidor de la liberación de calcio) o 5mM de dantroleno + 10 µM de genisteína. (Gráfica 17). Se observa que las C2C12^{silvestres} muestran una disminución significativa en la fosforilación de AMPK, al ser tratadas con dantroleno, y el efecto sobre AMPK de la genisteína se ve inhibido al incubar las células con dantroleno. Sin embargo, en los miotúbulos C2C12 silenciados para el receptor de leptina, no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de AMPK al inhibir la liberación de calcio intracelular y el efecto sobre AMPK observado con la incubación de genisteína no se disminuye al incubar las células con genisteína y dantroleno, indicando que en los miotúbulos C2C12 silenciados para el receptor de leptina existe otra posible vía mediante la cual la genisteína permite la fosforilación de AMPK.

5.7 Inmunoblot de pJAK2, JAK2, pAMPK y AMPK total en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína o el agonista de epac1.

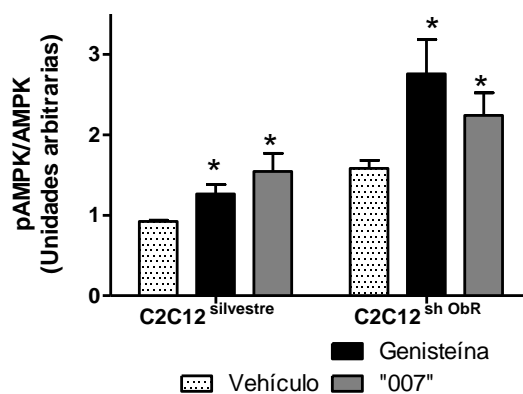
Como se mencionó anteriormente existe un polifenol ampliamente estudiado y se ha observado que permite la acumulación de AMPc dentro de la célula, lo que puede permitir la activación independiente de PKA y dependiente de Epac1 que conlleva a la activación de AMPK.

Para conocer si la activación de Epac1 permitía la fosforilación de JAK2 y AMPK en los miotúbulos C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} estos se incubaron durante 4 hrs con 10 µM del agonista de epac1 (“007”) o 10 µM de genisteína. (Gráfica 18 y19).

Se observó que el agonista de epac1 al igual que la genisteína fue capaz de incrementar la fosforilación de JAK2 y de AMPK tanto en los miotúbulos silvestres como en los miotúbulos silenciados para el receptor de leptina. Lo anterior, nos indica que al igual que el resveratrol la genisteína es capaz de incrementar la fosforilación de AMPK mediante la actividad de epac1.



Gráfica 18 Efecto de 10 μM de genisteína, 10 μM de agonista de epac1 a los 60 min y 4 hrs respectivamente sobre la fosforilación de JAK2 en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. ($p < 0.05$). $n=3$. Para el caso de JAK se indica mediante una flecha (\rightarrow) la banda que fue cuantificada.



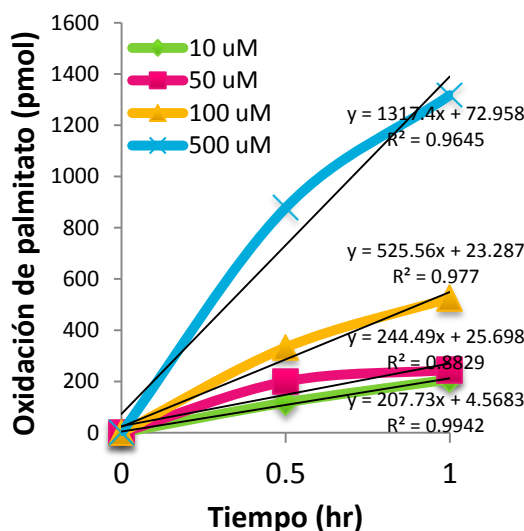
Gráfica 19 Efecto de 10 μM de genisteína, 10 μM de agonista de epac1 a los 60 min y 4 hrs respectivamente sobre la fosforilación de AMPK en extractos citoplasmáticos de la línea celular C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR}. Análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. ($p < 0.05$). $n=3$ Para el caso de AMPK fosforilado se indica mediante una flecha (\rightarrow) la banda que fue cuantificada.

6 EFECTO SOBRE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

Uno de los efectos de la activación de AMPK es el incremento en la oxidación de ácidos grasos, se quiso conocer si la genisteína era capaz de incrementar la oxidación de ácidos grasos.

6.1 Determinación de la oxidación de palmitato [C^{14}] en células C2C12 ^{silvestres} y C2C12 ^{sh ObR} tratadas con genisteína.

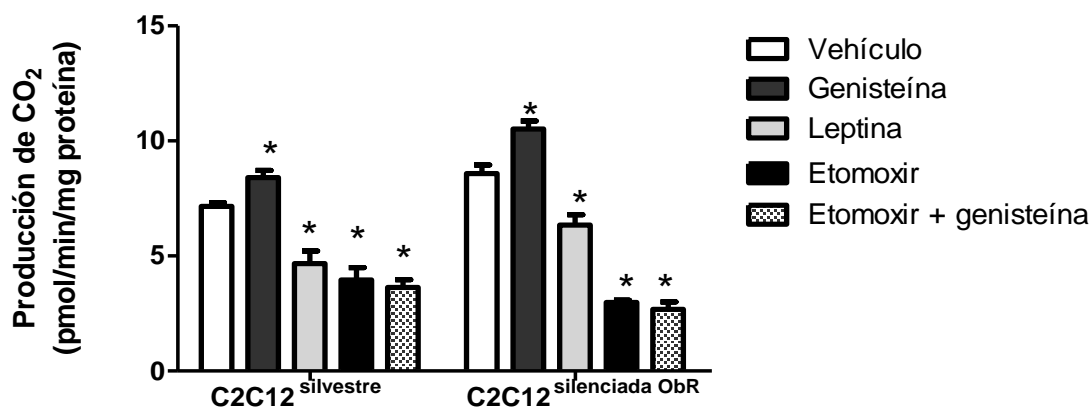
Para determinar las concentraciones y el tiempo de incubación de palmitato marcado, se realizaron curvas dosis/respuesta y temporales. (Gráfica 20). Se determinó utilizar 50 μ M de palmitato y 60 min.



Gráfica 20 Efecto de 10, 50, 100 y 500 μ M de palmitato marcado a los 30 y 60 min sobre la liberación de $^{14}CO_2$ en la línea celular C2C12 ^{silvestre}

Los miotúbulos se incubaron durante 60 min con 10 μ M de genisteína o 10 ng de leptina o 80 μ M de etomoxir o la mezcla de genisteína/leptina o genisteína/etomoxir en conjunto con 50 μ M de palmitato. La oxidación de ácidos grasos se determinó mediante la cuantificación de la producción de $^{14}CO_2$ (Gráfica 21). La genisteína incrementó de forma significativa la oxidación de palmitato marcado en ambas células, la leptina por el contrario no logró incrementar la oxidación e interesantemente la disminuyó al ser comparada con el vehículo en ambas líneas celulares, lo anterior puede atribuirse a que los efectos de la leptina sobre la oxidación de ácidos grasos se han establecido a largo plazo (mayor a 1 hora). Al juntar la genisteína con la leptina, la genisteína no fue capaz de recuperar la oxidación de palmitato en los miotúbulos

C2C12^{shObR} y C2C12^{silvestres}. Al agregar etomoxir el efecto sobre la oxidación de palmitato que se observó con la genisteína no se observa en ninguna de las dos líneas celulares, así se concluye que los efectos de la genisteína sobre la oxidación de ácidos grasos dependen de la actividad de CPT1, debido a que el etomoxir es un inhibidor de la actividad de CPT1, y de forma indirecta inhibe la actividad de la SIRT1 debido a que reduce la concentración de NAD⁺, al inhibir a la CPT1⁽⁴⁵⁾.



Gráfica 21 Efecto de 10 µM de genisteína, 10 ng de leptina, 10 µM de genisteína+ 10 ng de leptina, 80 µM de etomoxir y 10 µM de genisteína+ 80 µM de etomoxir sobre la liberación de ¹⁴CO₂ en la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. (p<0.05). n=3

Para conocer si la oxidación de palmitato observada en ambos miotúbulos tratados con genisteína dependía de la actividad de SIRT1 o de AMPK, se incubaron los miotúbulos con los inhibidores de SIRT1 (sirtinol) o de AMPK (compuesto C).

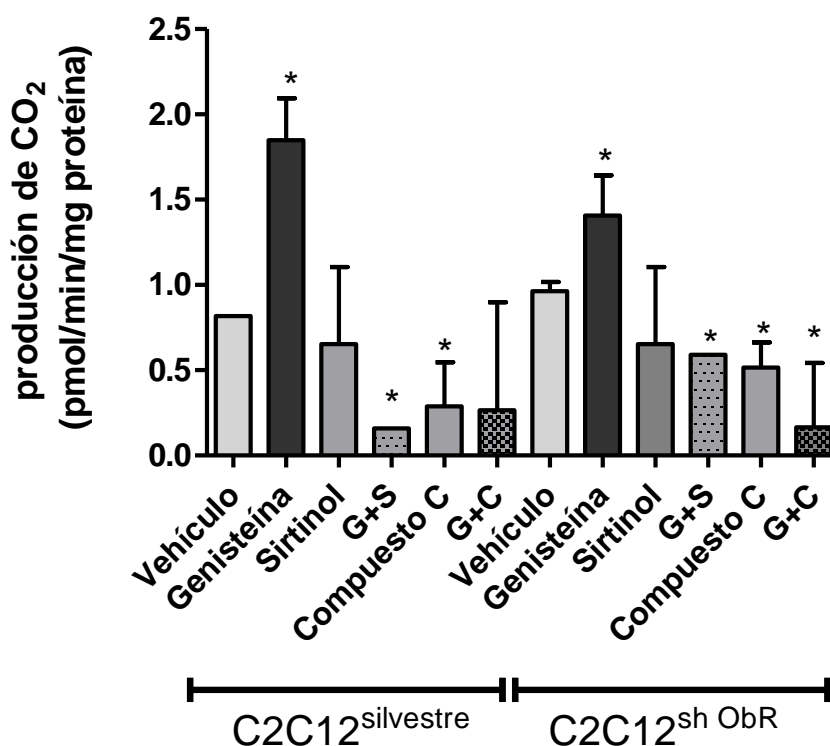
6.2 Determinación de la oxidación de palmitato [C¹⁴] en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} tratadas con genisteína o con inhibidor de SIRT1 o de la actividad cinasa de AMPK

Los miotúbulos se incubaron durante 60 min con 10 µM de genisteína o 40 µM de Sirtinol, 10 µM de genisteína con 40 µM de Sirtinol, 20 µM de Compuesto C y 10 µM de genisteína con 20 µM de Compuesto C. La oxidación de ácidos grasos se determinó mediante la cuantificación de la producción de ¹⁴CO₂ (Gráfica 22).

La genisteína incrementó de forma significativa la oxidación de palmitato marcado en ambas células, de forma interesante, en los miotúbulos C2C12^{shObR} el efecto de la genisteína al ser comparado con los miotúbulos C2C12^{silvestres} se vio disminuido, lo cual puede deberse a un error experimental.

Al adicionar el inhibidor de SIRT1 o de AMPK se inhibió la oxidación de palmitato en ambas líneas celulares, lo anterior comprueba que AMPK y SIRT1 están involucrados en la oxidación de ácidos grasos, debido a que el sirtinol inhibe la actividad de desacetilasa de SIRT1 sobre varias proteínas entre ellas a una de las cinasas de AMPK, llamada LKB1, al disminuir la actividad de LKB1 sobre AMPK, el palmitato no puede ser oxidado en la mitocondria. Por su parte, el compuesto C, inhibe la actividad de cinasa de AMPK sobre sus proteínas blanco como ACC, lo que ocasiona que el palmitato como se mencionó anteriormente no ingrese a la mitocondria para ser oxidado, teniendo como resultado una disminución en la oxidación de palmitato.

Cuando los miotúbulos fueron incubados con genisteína en conjunto con los inhibidores de SIRT1 y de AMPK se observa una disminución en la oxidación de palmitato, lo anterior nos podría estar indicando que, la genisteína puede incrementar la oxidación de palmitato mediante el incremento en la actividad de cinasa de AMPK así como de un incremento en la actividad de desacetilasa de SIRT1. Por el mecanismo descrito anteriormente.



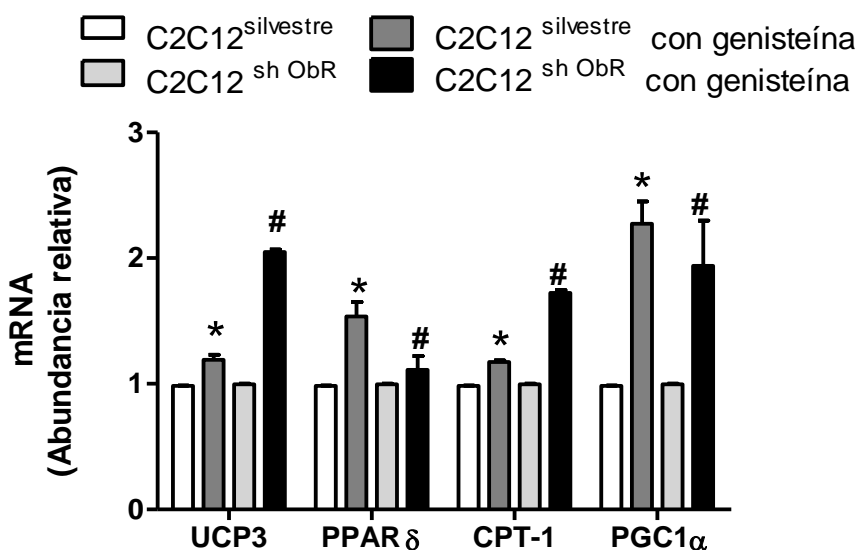
Gráfica 22 Efecto de 10 μM de genisteína, 40 μM de Sirtinol, 10 μM de genisteína con 40 μM de Sirtinol, 20 μM de Compuesto C y 10 μM de genisteína con 20 μM de Compuesto C a los 60 min sobre la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ en la línea celular C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}. Los valores se presentan relativos al medio de cada línea celular. (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. ($p < 0.05$). $n = 3$

Como se mencionó en la introducción la AMPK además de su actividad de cinasa es capaz de regular la transcripción de varios genes entre los que se encuentra PPAR α o SREBP1c. Con estos antecedentes se investigó si la genisteína mediante AMPK podría regular la expresión de diversos genes involucrados principalmente en la oxidación de ácidos grasos como lo son: UCP3, PPAR δ , CPT1 y PGC1 α .

7 EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES

7.1 Determinación de la expresión génica de UCP3, PPAR δ , CPT1 y PGC1 α , en células C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína.

Los miotúbulos se incubaron durante dos horas con 10 μ M de genisteína se observó un incremento significativo en la expresión de PPAR δ , UCP3, CPT1 y PGC1 α en los miotúbulos C2C12^{silvestres} y de UCP3, CPT1 y SIRT1 en los miotúbulos C2C12^{shObR} (Gráfica 23). Por los resultados anteriores se decidió estudiar la expresión de CPT1 mediada por genisteína.



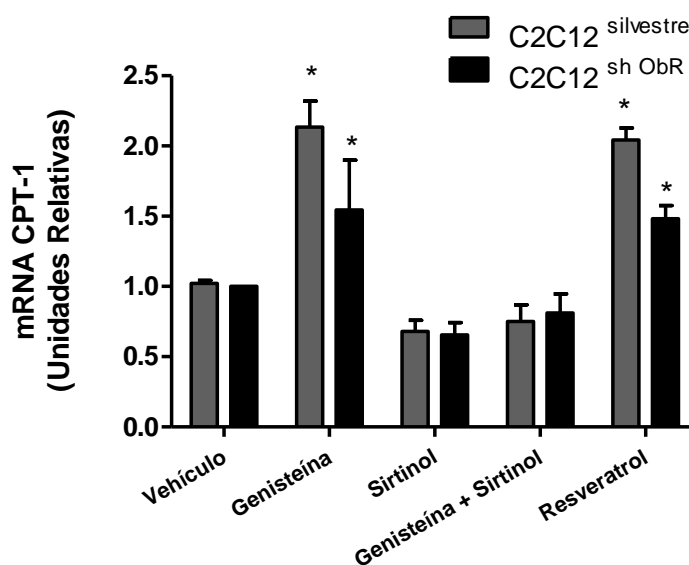
Gráfica 23 Efecto de 10 μ M de genisteína sobre la expresión génica de UCP3, PPAR δ , CPT1 y PGC1 α en células C2C12^{silvestre} y C2C12^{shObR}. Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de etanol fue utilizada como valor relativo n=3. (*) Indica diferencia entre los miotúbulos C2C12^{silvestre}, (#) Indica diferencia entre los miotúbulos de C2C12^{shObR}, (p<0.05) n=3

7.2 Determinación de la expresión génica de CPT1 en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tratadas con genisteína, resveratrol o sirtinol.

Los miotúbulos se incubaron durante dos horas con 10 μ M de genisteína o 50 μ M de resveratrol (control positivo). Se observó un incremento significativo en la expresión de CPT1 en ambos miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} tanto con la genisteína

como con el resveratrol, no se observó una diferencia significativa entre los miotúbulos con el tratamiento de genisteína pero sí con el tratamiento de resveratrol.

Cuando se agregó el sirtinol o la mezcla de sirtinol/genisteína, se observa que la expresión de CPT1 disminuye de forma significativa tanto en las C2C12^{silvestres} como en las C2C12^{sh ObR} (Gráfica 24). Lo anterior indicaría que la genisteína activa la función desacetilasa de SIRT1 sobre una de sus proteínas blanco (coactivador PGC1 α), el cual una vez desacetilado es activado y en conjunto con el factor de transcripción PPAR δ permite la transcripción de genes como CPT1.

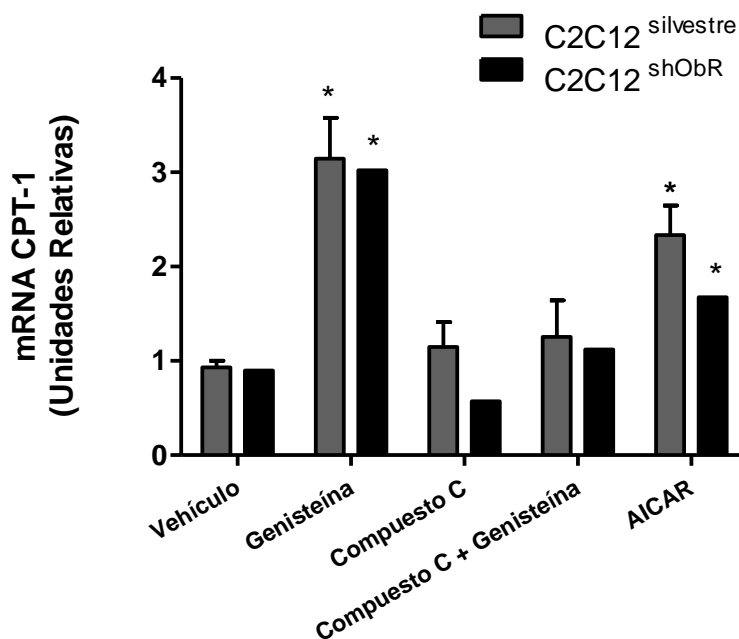


Gráfica 24 Efecto de 10 μ M de genisteína y 50 μ M Resveratrol sobre la expresión génica de CPT1, en células C2C12^{silvestres} y C2C12^{sh ObR} Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de etanol fue utilizada como valor relativo (*) Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. ($p < 0.05$). $n = 3$

7.7 Determinación de la expresión génica de CPT1 en células C2C12^{silvestre} tratadas con Genisteína, AICAR y Compuesto C.

Los miotúbulos C2C12^{silvestres} y C2C12^{shObR} se incubaron durante dos horas con 10 μ M de genisteína o 2 mM de AICAR, observándose un incremento significativo en la expresión de CPT1 en ambos miótubulos (Gráfica 25), cuando se agrega a la genisteína 20 μ M del compuesto C (el compuesto C inhibe la actividad cinasa de AMPK, pero no inhibe las cinasas upstream, esto quiere decir que AMPK seguirá fosforilado pero sus blancos no podrán ser fosforilados) el efecto de la genisteína se ve abatido de forma significativa en ambos miotúbulos (Gráfica 25). Interesantemente el AICAR incrementa la expresión de CPT1 sin encontrar diferencia significativa entre la genisteína y el AICAR en los miotúbulos C2C12^{silvestres}, sin embargo en los miotúbulos

sin el receptor de leptina la expresión de CPT1 con el tratamiento de AICAR es significativamente menor al compararlo con la genisteína. No se encontraron diferencias significativas entre los miotúbulos con o sin el receptor de leptina.



Gráfica 25 Efecto de 10 μM de genisteína, 20 μM de Compuesto C, 10 μM de genisteína y 20 μM de Compuesto C o 2mM de AICAR sobre la expresión génica de CPT1, en células C2C12^{silvestre} y C2C12^{sh ObR}. Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de vehículo fue utilizada como valor relativo (*). Indica diferencias significativas con el respectivo vehículo de cada línea celular. ($p < 0.05$). $n = 3$

8 EFECTO DE LA GENISTEÍNA EN UN MODELO DE OBESIDAD

Para conocer si los efectos observados *in vitro* tendrían un efecto fisiológico en un modelo de obesidad, se alimentó a ratones durante 2 meses con una dieta alta en grasa (HF) o una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína (HF+G)^(71; 72). El modelo de obesidad inducida por dieta es un modelo de obesidad “mas fisiológico” si se compara con el modelo de la rata Zucker *fa/fa*, considerada un modelo de obesidad genética. En el presente estudio se utilizó un modelo *in vitro* (células silenciadas para el receptor de leptina) sólo con la finalidad de conocer el mecanismo de acción de la genisteína sobre la activación de AMPK. En los experimentos que se muestran a continuación, buscamos conocer si la genisteína en un modelo *in vivo* de obesidad no genética es capaz de incrementar el gasto energético.

8.1 Determinación de la ganancia de peso y de las concentraciones de glucosa y de triglicéridos en suero de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.

El consumo de genisteína en una dieta alta en grasa disminuyó la ganancia de peso, a pesar de que la ingesta de alimentos no se modificó en ninguno de los dos grupos. Por otro lado disminuyó la concentración de triglicéridos, sin afectar las concentraciones de glucosa en suero. (Tabla 5)

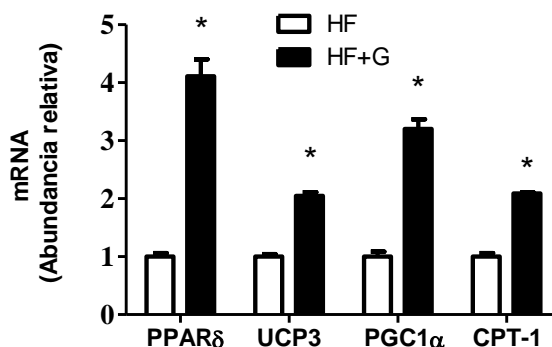
Tabla 5. Efecto del consumo de genisteína (0.2%) con una dieta alta en grasa en la peso, el consumo de alimento, y las concentraciones de glucosa y triglicéridos en suero de ratones macho C57BL6.

	HF	HF+G
Peso (g)	33.0 ± 0.28	30.7 ± 0.75 *
Consumo de alimento (g/día)	2.54 ± 0.26	2.47 ± 0.27
Glucosa (mmol/L)	19.56 ± 1.73	17.80 ± 0.97
Triglicéridos (mmol/L)	2.13 ± 0.56	0.90 ± 0.11 *

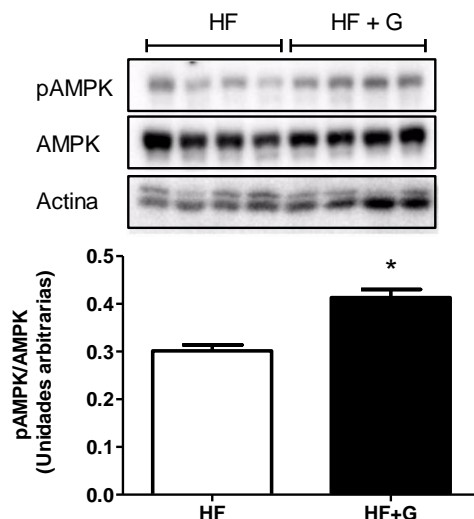
Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de caseína fue utilizada como valor relativo para el grupo de proteína de soya y soya grasa. Expresados como promedios ± el error estándar de la media. n=4. (*) Indica diferencias significativas entre los grupos (p<0.05).

8.2 Determinación de la expresión de genes y de la fosforilación de AMPK en músculo esquelético de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.

El consumo de genisteína en una dieta alta en grasa incremento de forma significativa la expresión de PPAR δ , UCP3, PGC1 α y CPT1 (Gráfica 26), lo que correlaciona con un incremento en la fosforilación de AMPK. (Gráfica 27)



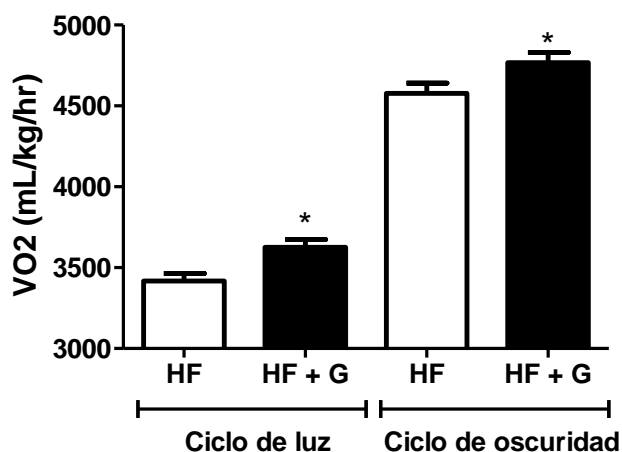
Gráfica 26 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre la expresión génica de PPAR δ , UCP3, PGC1 α y CPT1 en músculo esquelético de ratones macho C57BL6. Los valores presentados son relativos a la expresión de actina. La expresión de dieta alta en grasa fue utilizada como valor relativo n=4. (*) Indica diferencia entre los tratamientos (p<0.05).



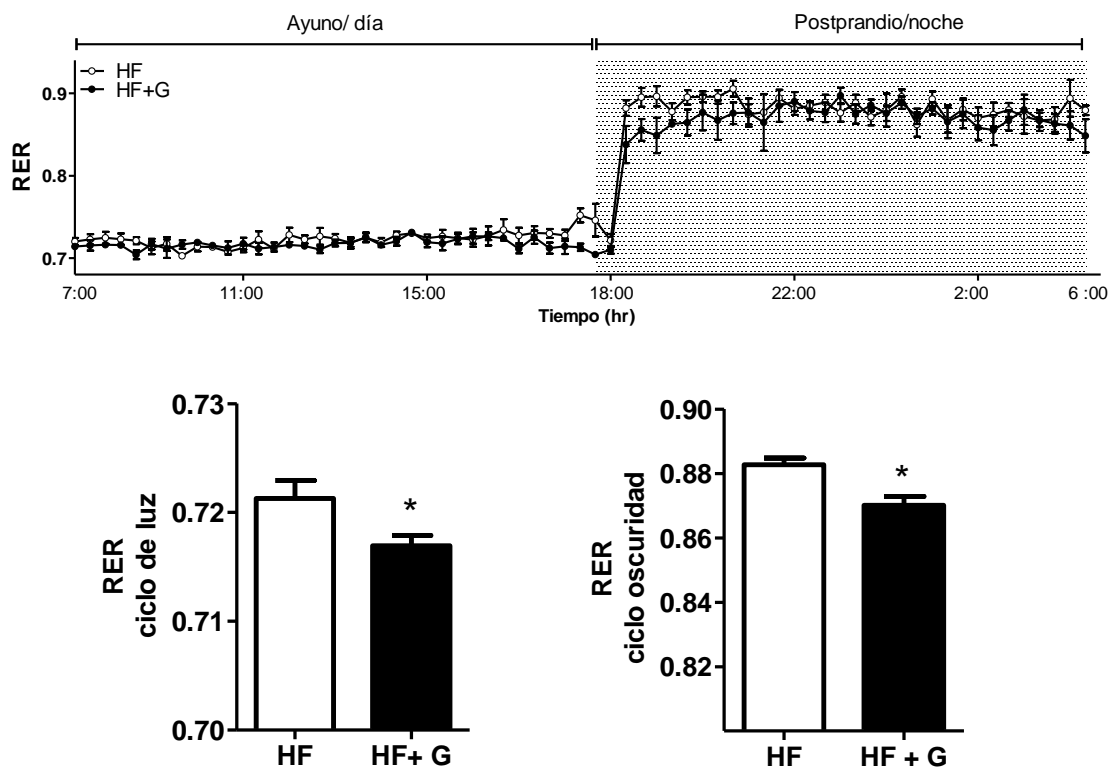
Gráfica 27 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre la fosforilación de AMPK Thr¹⁷² en extractos citoplasmáticos de músculo esquelético de ratones macho C57BL6. Inmunoblot de AMPK total, Actina y la fosforilación de AMPK Thr¹⁷², y análisis de inmunoblots se presentan como unidades arbitrarias de densidad por cada uno de los grupos al término de los 60 días de estudio, n=4 (*) Indica diferencia entre los tratamientos (p<0.05).

8.3 Determinación del gasto energético de ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.

El consumo de genisteína en una dieta alta en grasa incremento de forma significativa el gasto energético (Gráfica 28) y disminuyó de forma significativa el coeficiente respiratorio (RER). (Gráfica 29)



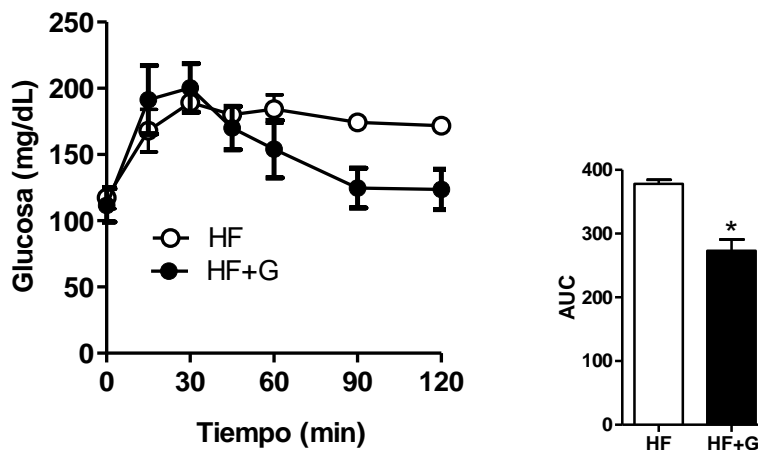
Gráfica 28 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre el consumo de oxígeno de ratones macho C57BL6. La fase de luz representa el ayuno y la fase de oscuridad representa el postprandio. Los resultados se muestran como la media \pm S.E del 12 ciclo de luz h (07:00-19:00 h) y 12 h oscuridad ciclo (19-7:00 h) del estudio de 48 h. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos (p < 0.05).



Gráfica 29 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre el gasto energético y coeficiente respiratorio de ratones macho C57BL6. La fase de luz (ayuno) se indica como la zona clara y la fase de oscuridad (postprandio) se indica con la zona punteada. Los círculos blancos= HF y los círculos negros = HF+G. Los resultados RER se muestran como la media del 12 ciclo de luz h (07:00-19:00 h) y 12 h oscuridad ciclo (19-7:00 h) del estudio de 48 h. Los resultados se muestran como la media \pm S.E. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos (p <0.05).

8.4 Determinación de la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta alta en grasa con 0.2% de genisteína.

El consumo de genisteína en una dieta alta en grasa disminuyó de forma significativa el área bajo la curva de la glucosa sérica (Gráfica 30). Lo que nos indica que los ratones a pesar de consumir una dieta alta en grasa, la genisteína fue capaz de mejorar su sensibilidad a la insulina. Probablemente debido al incremento en el gasto energético.



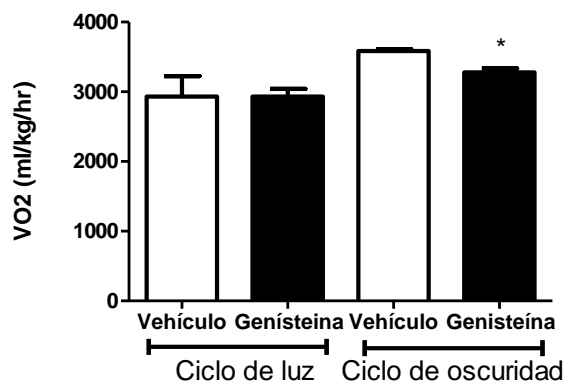
Gráfica 30 Efecto del consumo de genisteína (0.2%) en una dieta alta en grasa sobre una prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal (IPGTT) de ratones macho C57BL6. Los resultados se muestran como la media \pm S.E. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos (p < 0.05).

9 EFECTO AGUDO DE LA GENISTEÍNA.

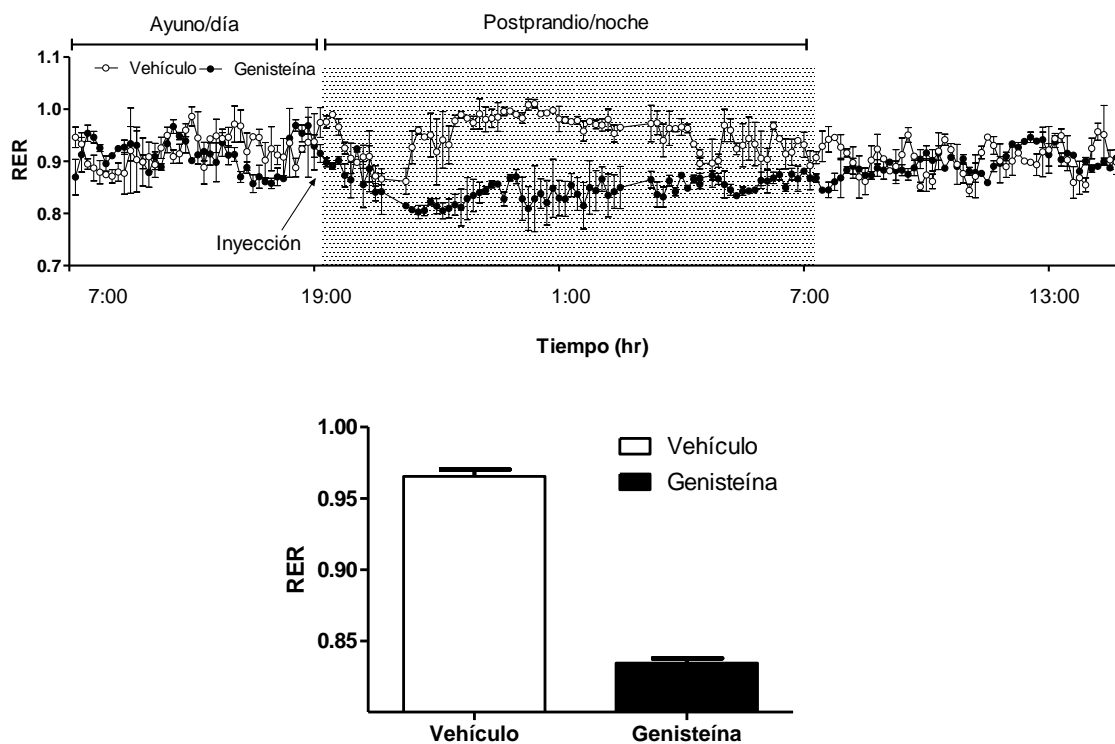
Para conocer si los efectos sobre el gasto energético observados por el consumo crónico de genisteína tendrían un efecto agudo, se inyectó vía intraperitoneal genisteína a ratones durante 5 días.

9.1 Determinación de la ganancia de peso y el gasto energético de ratones inyectados intraperitonealmente con genisteína durante 5 días.

Las inyecciones de genisteína no afectaron el peso corporal en comparación con el grupo de control sin embargo, el grupo tratado con genisteína mostró un aumento significativo en la tasa metabólica (Gráfica 31) y una reducción significativa en el RER (Gráfica 32). La disminución de RER refleja el incremento en la oxidación de los ácidos grasos sobre hidratos de carbono en respuesta a la genisteína, por lo tanto, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la genisteína aumenta la oxidación de ácidos grasos.



Gráfica 31 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el consumo de oxígeno de ratones macho C57BL6. La fase de luz representa el ayuno y la fase de oscuridad representa el postprandio. Los resultados se muestran como la media \pm S.E del 12 ciclo de luz h (07:00-19:00 h) y 12 h oscuridad ciclo (19-7:00 h) del estudio de 48 h. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).



Gráfica 32 Efecto de inyección intraperitoneal de genisteína sobre el gasto energético y coeficiente respiratorio de ratones macho C57BL6. La fase de luz (ayuno) se indica como la zona clara y la fase de oscuridad (postprandio) se indica con la zona punteada. Los círculos blancos = VEH y los círculos negros = Genisteína. La flecha indica el momento de la inyección. Los resultados RQ se muestran como la media del 12 ciclo de luz h (07:00-19:00 h) y 12 h oscuridad ciclo (19-7:00 h) del estudio de 48 h. Los resultados se muestran como la media \pm S.E. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La aparición de resistencia a la insulina es un cambio metabólico que se produce durante el desarrollo de la obesidad. En el músculo esquelético, durante la obesidad, los lípidos pueden acumularse dentro de este tejido, y se ha sugerido que esta acumulación es en parte responsable de la reducción de la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina ⁽⁷³⁾. El exceso de lípidos en tejidos no adiposos se le conoce como lipotoxicidad la cual conduce a la disfunción celular que está asociada con varias patologías como la diabetes ⁽⁷⁴⁾. De forma interesante, en sujetos sanos no existe desarrollo de lipotoxicidad, esto se debe a las acciones de una hormona secretada por el adipocito llamada leptina. Las acciones de esta hormona son el incremento en la oxidación de ácidos grasos en los tejidos periféricos tales como el músculo esquelético ⁽⁷⁵⁾, sin embargo, las acciones de leptina están inhibidas en ciertas condiciones tales como:

1) Mutaciones en el receptor de leptina que impidan la unión de esta hormona o la señalización posterior como sucede en la rata Zucker *fa/fa* que posee una mutación llamada *fa* en el receptor de leptina donde existe una sustitución de la glutamina-269 por prolina. ⁽⁷⁶⁾. El fenotipo de estos animales se caracteriza por una marcada obesidad, hiperfagia, hiperglicemia e hiperinsulinemia asociada a un incremento en el número de células β ⁽⁷⁷⁾. Los animales *fa/fa* desarrollan obesidad entre la 3^a-4^a semana después de nacidos. Entre los días 10-14 posteriores al nacimiento se observa una elevación de la insulina plasmática, y a las 4 semanas, se hace evidente la hiperglicemia. La rata Zucker *fa/fa* es un modelo animal que desarrolla lipotoxicidad y que se ha utilizado para el estudio y tratamiento farmacológico o dietético de la obesidad.

2) Resistencia a la leptina como sucede en la obesidad inducida por dieta. Después de un consumo crónico y excesivo de energía, se produce un incremento en el tejido adiposo, el cual aumenta la liberación de ácidos grasos (AG) a la circulación, los cuales pueden ser captados por tejidos como el músculo esquelético para ser almacenados en forma de triglicéridos (TG). El tejido adiposo a su vez aumenta la secreción de leptina para limitar la acumulación de TG en los tejidos no adiposos. Con el tiempo, la concentración circulante de leptina sobrepasa un límite fisiológico generando una disminución en la sensibilidad de los tejidos a su acción (resistencia a la leptina) ⁽⁷⁵⁾. La resistencia a la leptina produce un desequilibrio entre la síntesis y oxidación de lípidos, provocando que los tejidos pierdan la capacidad de mantener la concentración de lípidos en un rango estrecho. Las consecuencias de la obesidad

inducida por dieta se observan a largo plazo y comparadas con la obesidad genética son de menor magnitud.

La forma en la cual la leptina lleva a cabo sus funciones antiestatísticas en tejidos no adiposos como es el caso del músculo, es mediante la unión a su receptor. Se ha demostrado que la leptina, al unirse a su receptor (ObR) permite que Janus cinasa 2 (JAK2) se fosforile y este por su actividad cinasa fosforile a la AMPK, lo que permite la oxidación de ácidos grasos y disminución de la síntesis de ácidos grasos, lo que conlleva a una reducción del contenido de lípidos en la célula. Sin embargo estos efectos de la leptina se ven abatidos en músculo esquelético de personas y ratones obesos ^{(11), (12)} por lo que una de las posibles causas de la pérdida del efecto antiestatístico de la leptina puede deberse a alteraciones en la regulación de la AMPK ⁽⁷⁸⁾

En la búsqueda de estrategias para disminuir o evitar la lipotoxicidad en el músculo esquelético para de esta forma prevenir la resistencia a la insulina. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el consumo de proteína de soya incrementa la fosforilación de AMPK y ACC, reduce la acumulación de lípidos e incrementa la expresión de los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y disminuye la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, en ratas Zucker fa /fa, en las cuales se ha establecido que tiene una disminución en la fosforilación de la AMPK en su tejido muscular en comparación con las ratas Zucker delgadas ⁽⁷⁸⁾. Por lo anterior se estableció que el consumo de un aislado de proteína de soya incrementa la fosforilación de AMPK en músculo esquelético por un mecanismo independiente de leptina. Esta activación podría estar mediada a través de las isoflavonas de la soya, en específico de la genisteína (isoflavona de mayor abundancia en el aislado de proteína de soya).

La genisteína es un polifenol que por su estructura es clasificado como un flavonoide. Los polifenoles pueden dividirse por su estructura en: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, coumestranos y stilbenos ⁽⁵¹⁾. Los efectos en la salud de los polifenoles dependen de la cantidad consumida y sobre su biodisponibilidad. En este estudio, demostramos que la inyección intraperitoneal de genisteína durante 4 días en ratas sanas de la cepa Wistar, estimula la expresión de genes de la oxidación de ácidos grasos, biogénesis mitocondrial y termogénesis (CPT-1, PGC1 α y UCP3 respectivamente), así como la fosforilación de AMPK. Los efectos fisiológicos de estos efectos metabólicos moleculares se ven reflejados en un aumento en la capacidad de oxidación de ácidos grasos observados en miotúbulos C2C12. Estos resultados

demuestran lo que otros autores han mostrado respecto a que las isoflavonas de la soya pueden estimular la fosforilación de AMPK, y mejorar la sensibilidad a la insulina ⁽⁵⁰⁾.

A pesar de este y otros estudios han demostrado que las isoflavonas pueden activar AMPK, los resultados de este trabajo indican que este efecto es independiente del receptor de leptina, lo que nos hizo mostrar interés en comprender el mecanismo de señalización por el que la genisteína era capaz de estimular la fosforilación de AMPK en ausencia de este receptor. Para poder evaluar estos mecanismos el receptor de leptina se silenció mediante el uso de un horquilla corta (*short hairpin (sh)*) en células C2C12 (miotúbulos de ratón).

Como se mencionó anteriormente, la leptina puede llevar a cabo sus efectos sobre la oxidación de ácidos grasos mediante la activación de AMPK, dicha activación se encuentra mediada por la activación de JAK2 y es dependiente de la presencia del receptor de leptina. En el presente estudio, observamos que el tratamiento con genisteína incrementa la fosforilación de JAK2 en las células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina. Al inhibir la actividad cinasa de JAK2 en células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina se observó que la genisteína no fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK, por lo que suponemos que la genisteína independientemente del receptor de leptina es capaz de activar la vía de señalización JAK2→AMPK en el músculo esquelético. De forma interesante, el consumo de un aislado de proteína de soya mostró un incremento en la fosforilación de JAK2 en el músculo esquelético de ratas Zucker *fa/fa* que como ya se ha mencionado poseen una mutación en el receptor de leptina y en la cuales se ha observado una menor fosforilación de JAK2 así como de AMPK, suponemos que el efecto observado sobre la fosforilación de JAK2 en las ratas Zucker *fa/fa* que consumieron una dieta con 20% de proteína de soya pudo ser en parte gracias al contenido de genisteína de la dieta.

Por otro lado, estudios realizados en células musculares lisas tipo vascular, mostraron que la angiotensina II (Ang II) mediante la unión a su receptor (AT1) fosforila a la Janus cinasa 2 (JAK2), lo que resulta en la generación de cascadas de señalización así como de activación de proteínas con actividad transcripcional. Mediante el uso de agonistas e inhibidores, se demostró que la fosfolipasa C (PLC) y sus precursores, IP₃/ Ca²⁺ y diacilglicerol / PKC, son esenciales para que la Ang II induzca por la fosforilación de JAK2 ⁽⁶¹⁾. Nuestros estudios demostraron que la genisteína fue incapaz de fosforilar JAK2 y AMPK cuando las células fueron incubadas con el inhibidor de PLC, U73122 ⁽⁶²⁾. Esta evidencia indica que PLC es un

intermediario en la vía de señalización activada por la genisteína. Estudios recientes han demostrado que el polifenol, resveratrol es capaz de activar PLC a través de Epac1⁽⁶³⁾, que se activa por un aumento en la concentración de AMPc⁽⁷⁹⁾. El AMPc (3'-5' cyclic AMP) es un segundo mensajero que lleva a cabo sus funciones mediante dos vías: 1) Activación de proteínas cinasas. En ausencia de AMPc la proteína cinasa A se encuentra en forma de tetrámero, y en presencia de AMPc, este se une a la unidad regulatoria de la proteína cinasa A (PKA), lo que ocasiona que la subunidad regulatoria se disocie y la subunidad catalítica se libere y pueda fosforilar a sus proteínas blanco y 2) Regulación de las GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor). El AMPc se une y activa a las proteínas EPAC (proteína con actividad GEF) que tienen efecto sobre Rap1 (perteneciente a la familia de GTPasa) el cual se une directamente a PLCε.

La PLCε es una isoforma recientemente encontrada, que contiene no sólo la región catalítica de las PLC, sino que además posee en su amino terminal un dominio homólogo CDC25, el cual actúa como una GEF, es decir un factor de intercambio de guaninas y actúa también como un activador de la familia Ras, en específico Rap1. Lo más interesante de la PLCε es su activación directa uniéndose a pequeñas GTPasas que incluyen Ras, Rap1, Rap2B así como RhoA. Una vez que la PLC se encuentra activada, éste por su actividad lipasa “corta” al fosfoinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P₂) para la producción de segundos mensajeros: inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ activa la liberación de Ca²⁺ y el DAG activa a las proteínas cinasas C (PKC). En este estudio observamos que, al bloquear la producción de IP₃ y la movilización de Ca²⁺ dependiente de PLC, la genisteína no fue capaz de incrementar la fosforilación de AMPK en células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina. Lo anterior nos indica que la genisteína de forma indirecta permite la fosforilación de la Janus cinasa 2 (JAK2) en C2C12, independientemente de la presencia del receptor de leptina, lo que tiene como consecuencia incrementar la fosforilación de AMPK en células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina.

En nuestro estudio, demostramos que la genisteína es capaz de aumentar los niveles de AMPc, y que el uso del agonista de Epac1, "007"⁽⁷⁹⁾, aumenta la fosforilación de JAK2 y AMPK. Así, nuestra evidencia indica que la genisteína eleva los niveles de AMPc, que a su vez activan en secuencia Epac1, PLC, la fosforilación de JAK2 y, finalmente, la fosforilación de AMPK. La evidencia reciente ha demostrado que los polifenoles como el resveratrol o la genisteína son inhibidores de las fosfodiesterasas, que es responsable de la elevación de los niveles de AMPc⁽⁸⁰⁾⁽⁶³⁾.

Además, se ha demostrado que el resveratrol requiere del receptor de estrógeno a fin de estimular la sensibilidad a la insulina ⁽⁸¹⁾. Sin embargo, no se ha establecido si el receptor de estrógeno superficie podría inhibir la actividad fosfodiesterasa. Se requieren más estudios para probar esta interacción.

Al observar que la genisteína era capaz de incrementar la fosforilación de AMPK en células C2C12 silenciadas para el receptor de leptina, se estudió el efecto de la genisteína sobre la expresión de genes involucrados en la oxidación de los ácidos grasos y sobre la oxidación de palmitato marcado, dado que la fosforilación de AMPK se relaciona con un incremento en la fosforilación de la acetil CoA carboxilasa (ACC), lo que ocasiona una disminución en la concentración de malonil CoA, que inicia la síntesis de ácidos grasos y que es un inhibidor de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), proteína encargada de catalizar los ácidos grasos activados a la matriz mitocondrial para poder ser oxidados. Los resultados de este estudio muestran que la genisteína incrementa la expresión UCP3, CPT1 y SIRT1 en las células C2C12 silvestres y silenciadas para el receptor de leptina. Las UCPs son miembros de la superfamilia de proteínas transportadoras que se localizan en la membrana interna de la mitocondria. Las proteínas desacoplantes permiten el paso de H⁺ desde el espacio intermembranal, hacia la matriz con generación de calor. Esto lleva a una disminución en el gradiente de H⁺, abatiendo así el potencial electroquímico (negativo y alcalino en el interior). Por lo tanto la fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de H⁺ desde el espacio intermembranal hacia la matriz a través de la ATP sintasa es menor, de modo que la síntesis de ATP disminuye.

El incremento en la expresión de genes podría estar asociado a varios mecanismos. Uno de ellos es, que la genisteína estimule la expresión y la actividad desacetilasa de SIRT1 sobre PGC1 α como nosotros y otros han demostrado ⁽⁵⁵⁾, y que una vez desacetilado PGC1 α se active su función coactivadora, lo que permita que particularmente PPAR δ actúe como factor de transcripción de los genes involucrados en la termogénesis y la oxidación de ácidos grasos ⁽⁸²⁾. De hecho, en el presente estudio se observó que el efecto de la genisteína sobre la expresión de estos genes se reprime cuando las células fueron incubadas con el inhibidor de PPAR δ , GSK0660. Un segundo mecanismo potencial por el que la genisteína induce la expresión de genes de la termogénesis y la oxidación de ácidos grasos puede implicar la translocación de la forma activa de la AMPK en el núcleo como se mencionó anteriormente, y entonces se estimule la expresión de estos genes a través de PPAR α ^{(32) (83) (84)}. Sin embargo, se

necesitan más estudios para probar esta hipótesis. Por otra parte, aunque controvertido, es posible que la genisteína pueda activar a SIRT1 a través AMPK ⁽⁴⁵⁾, aunque otros estudios sugieren que la SIRT1 AMPK se activa a través de la desacetilación de la cinasa AMPK, LKB1 ^{(85), (86)}. Respecto a la oxidación de ácidos grasos la genisteína incrementó la oxidación de palmitato marcado en ambas células, la leptina por el contrario no logró incrementar la oxidación. Al agregar etomoxir el efecto sobre la oxidación de palmitato que se observó con la genisteína no se observa en ninguna de las dos líneas celulares, indicando que la oxidación del palmitato observada con la genisteína es dependiente de la actividad de CPT1.

En conclusión, este trabajo permite un mejor conocimiento de las rutas de señalización por los cuales la genisteína permite la oxidación de ácidos grasos, y evita la acumulación de estos en el músculo esquelético.

CONCLUSIONES

La genisteína independientemente de la presencia del receptor de leptina es capaz de incrementar la actividad de AMPK mediante: 1) Incremento en la concentración de AMPc, lo que conlleva a un incremento en la fosforilación de JAK2, 2) Desacetilación de PGC-1 α mediada por SIRT1, lo que incrementa la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos en miotúbulos C2C12.

Por otro lado, la genisteína en un modelo de obesidad inducida por dieta, es capaz de incrementar el gasto energético e incrementar la sensibilidad a la insulina.

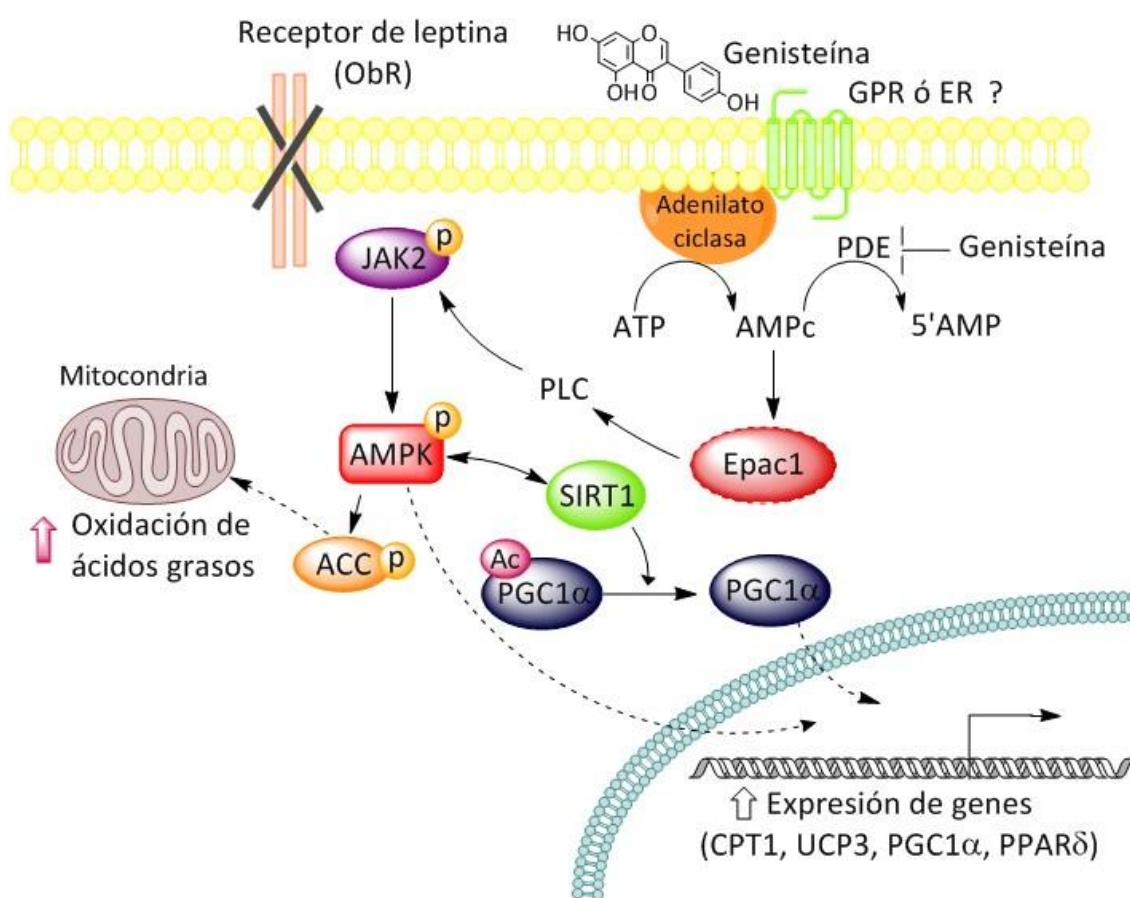


Fig 11. Mecanismo de activación de AMPK independiente del receptor de leptina mediado por genisteína en C2C12

Bibliografía

- 1 **Adams SH, Hoppel CL, LokKH.** Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. 2009. *J Nutr*, 139(6):1073–1081.
- 2 **Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al.** Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. 2012. *Cell Metab*, 15(5):764–777
3. **Petersen FK, Shulman G.** Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle. 2002. *J R Soc Med*, 95(Supl 42): 8-13.
4. **Ellis B, Poynten AN, Lowy A, Furler S, Chisholm D, Kraegen E, Cooney G.** Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279 (3): E554-E560.
5. **Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. 2000. *J Clin Invest*, 106(4): 473-481.
6. **Kelly D, Goodpaster B.** Skeletal muscle triglycerides. 2001. *Diabetes care*, 24(3): 933-41.
7. **Petersen FK, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI.** Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. 2004. *N Engl J Med*, 350(23):664-671.
8. **Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FTJ, Tapscott EB, Coleman RA.** Leptin directly alter lipid partitioning in skeletal muscle. 1997. *Diabetes*, 46(): 1360-1363.
9. **Steinberg GR, Parolin MI, Heigenhauser GJ, Dyck DJ.** Leptin increase FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. 2002, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283 (): E187-E192.
10. **Uotani S, Abe T, Yamaguchi Y.** Leptin activates AMP-activated protein kinase in hepatic cells via a JAK2-dependent pathway. 2006, *Biochem Biophys Res Commun.*, 351(),171-5.
11. **Steinberg GR, Dyck DJ.** Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high fat diets. 2000. *Am J Physiol*, 279(6): E1374-E1382
12. **Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJW, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, Heigenhauser GJF, Dycj DJ, Kemp BE.** AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. 2004. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(1): 4575-4580

13. **Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith, Kemp BE** The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMPK in cultures skeletal muscle of obese humans 2006. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(9):3592-3597.
14. **Sima A, Shafrir E.** Animal models of diabetes: A Primer. s.l. : Harwood Academic Publishers., 2001. ISBN:90-5823-096-1..
15. **Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K.** Substitution at codon 269 (Glutamine--- Proline) of the leptin receptor (Ob-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. 1996. *Biochem Biophys Res Commun*, 224(2): 597-604.
16. **Coleman DL.** Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. 1978. *Diabetologia*, 14(3): 141-148.
17. **Sakamoto K, Goransson O, Hardie DG, Alessi DR.** Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. 2004. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(2): E310-E317.
18. **Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG.** 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. 1995. *J Biol Chem*, 270(45): 27186-27191.
19. **Tiainen M, Ylikorkal A, Makela TP.** Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. 1999. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(16):9248-9251.
20. **McGee SL, Mustard KJ, Hardie DG, Baar K.** Normal hypertrophy accompanied by phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase alpha1 following overload in LKB1 knockout mice. 2008. *J Physiol*, 586(6):1731-1741.
21. **Adams J, Chen ZP, Van Denderen Bj, Morton CJ, Parker MW, Witters LA, Stapleton D, Kemp BE.** Intrasteric control of AMPK via the gamma subunit AMP allosteric regulatory site. 2004. *Protein Sci*, 13(1):155-65.
22. **Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T.** LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. 2003. *Curr Biol*, 13(22):2004-2008.
23. **Saha A, Schwarsin A, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tomheim K, Prentki M, Ruderman N.** Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. 2000. *J Biol Chem*, 275(32):24279-24283.

24. **Kraegen E, Saha A, Preston E, Wilks D, Hoy A, Cooney G, Ruderman N.** Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. 2006. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 290(3): 471-479.
25. **Kemp B, Stapleton D, Campbell D, Chen Z, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams J, Katsis F, Van Denderen B, Jennings I, Iseli T, Michell B, Witters L. s.l. : DG Hardie, D Carling.** AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. 2003. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt1):162-8:
26. **Suwa M, Nakano H, Kumagi S.** Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. 2003. *J Appl Physiol*,95(3): 960-8.
27. **Kase TE, Wensaas Ja, Aas V, Hojlund, Levin K, Thoresen H, Beck-Nielsen H, Rustan CA, Gaster M.** Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve liver X receptor pathway.2005, *Diabetes*, 54: 1108-15.
28. **Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D.** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. 2005. *Science*, 310(5754):1642-1646.
29. **Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown LJ, Ogunbayo OA, Evans AM, Hardie DG.** Use of cells expressing gamma subunit variants to Identify diverse mechanisms of AMPK activation. 2010. *Cell Metab*, 11(6):554-565.
30. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB.** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. 2002. *Nature*,415(6869):339-43.
31. **Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Friguel P, Fougelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.**Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. 2002. *Nat Med*, 8(11):1288-1295.
32. **Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y.** Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblast by changing the subcellular localization of the $\alpha 2$ form of AMP-activated protein kinase. 2007. *Mol Cell Biol*, 27(12): 4317-4327.
33. **Acin A, Rodriguez M, Rique H, Canet E, Boutin Ja, Galizzi JP,** Cloning and characterization of the 5' flanking region of the human uncoupling protein 3 (UCP3) gene. 1999. *Biochem Biophys Res Commun*, 258(2):278-83

34. **Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB.** Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. 2006. *Diabetes Obes Metab*, 8(3): 264-80.
35. **Zhou L, Deepa SS, Etzler JC, Ryu J, Mao X, Fang Q, Liu DD, Torres JM, Jia W, Lechleiter JD, Liu F, Dong LQ.** Adiponectin activates AMPK in muscle cells via A:L1/LKB1 and PLC/Ca²⁺/CaMKK-dependent pathways. 2009. *J Biol Chem*, 284(33): 22426-35.
36. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM.** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. 1998. *Cell*, 92(6):829-39.
37. **Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM.** Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. 2002. *Nature*, 418(6899): 797-801
38. **Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM.** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. 1999. *Cell*, 98(1): 115-24.
39. **Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM.** Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1b coactivation of SREBP. 2005. *Cell*, 120(2): 261-73
40. **Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P.** Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. 2008. *FEBS Lett*, 582 (1) 46-53.
41. **Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J.** Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. 2007. *Ann Med*, 39(5): 335-45.
42. **Xiaoling Li, Leonard Guarente.** SIRT1 Deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. 2007, *Molecular Cell*, 28, :91-106.
43. **Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P.** Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. 2007. *EMBO J*, 26(7):1913-23.
44. **Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J.** Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. 2006. *Cell*, 127(6):1109-22.

45. **Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliot PJ, Puigserver P, Auwerx J.** AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. 2009. *Nature*, 458(7241):1056-60
46. **27. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB.** Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. 2002. *Diabetes*, 51(10): 2944-50.
47. **Palacios-González, B.** Efecto de la dieta sobre la regulación de AMPK en músculo esquelético de roedores en dos modelos de obesidad. .México D.F : s.n., 2008, Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. Química. Maestría en Ciencias Bioquímicas.
48. **Hardie, G.** Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase..2011, *Am J Clin Nutr* . 93(Supp): 891S–6S.
49. **González-Granillo M, Steffensen KR, Granados O, Torres N, Korach-André M, Ortiz V, Aguilar Salinas C, Jakobsson T, Díaz-Villaseñor A, Loza-Valdes A, Hernanded-Pando R, Gustafsson JA, Tovar AR.** Soy protein isoflavones differentially regulate liver X receptor isoforms to modulate lipid metabolism and cholesterol transport in liver and intestine in mice. 2012, *Diabetologia*, 55: 2469-2478.
50. **Cederroth, C. R., M. Vinciguerra, A. Gjinovci, F. Kuhne, M. Klein, M. Cederroth, D. Caille, M. Suter, D. Neumann, R. W. James, D. R. Doerge, T. Wallimann, P. Meda, M. Foti, F. Rohner-Jeanrenaud, J. D. Vassalli, S. Nef.** Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. 2008. *Diabetes*, 57(5):1176-1185
51. **Orzechowski A, Ostaszewski P, Jank M, Berwid SJ.** Bioactive substances of plant origin in food--impact on genomics. 2002. *Reprod Nutr Dev*. 42(5):461-77.
52. **Mezei O, Li Y, Mullen E, Ross-Viola FS, Shay NF.** Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via:ARalpha dependent and independent mechanism.. 2006. *Physiol Genomics*, 26(1):8-14
53. **Li X, Guarente L** SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR.2007, *Molecular Cell*, 28(1):91-106.
54. **Bjoem S, Verdin E.** Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. 2008, *Cell Metab*. 7(2):104-12.
55. **Rasbach K, Schnellmann R.** Isoflavone promote mitochondrial biogenesis. 2008, *J Pharmacol Exp Ther*. 325(2):536-4
56. **Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P.**

Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. 2011. *Cell Metab*, 14(5): 612-22.

57. **Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH.** Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. 2012. *Cell*, 148(3): 421-33.

58. **Grozinger C M, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL.** Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. 2001. *J Biol Chem*, 276(42):38837-3884

59. **Zhou G, Myers R, LKi Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear L, Moller D.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. 2001. *J Clin Invest*, 108(8): 1167-1174.

60. **Weis BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD.** Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. 1994. *J Biol Chem*, 269(42):26443-8.

61. **Frank GD, Saito S, Motley ED, Sasaki T, Ohba M, Kuroki T, Inagami T, Eguchi S.** Requirement of Ca(2+) and PKCdelta for Janus kinase 2 activation by angiotensin II: involvement of PYK2. 2002. *Mol Endocrinol.*,16(2):367-77.

62. **Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka A.** Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. 2007. *J Biol Chem*, 282(8):5488-95.

63. **Park S, Scheffler TL, Gerrard DE.** Chronic high cytosolic calcium decreases AICAR-induced AMPK activity via calcium/calmodulin activated protein kinase II signaling cascade. 2011, *Cell Calcium*, 50(1): 73-83.

64. **Corton J, Gillespie J, Hawley S, Hardie G.** 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?. 1995. *Eur J Biochem*, Vol. 229(2):558-565.

65. **Gaidhu M, Fediuc S, Anthony N, So M, Mirpourian M, Ceddia RB.** Prolonged AICAR induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanism integrating HSL and ATGL. 2009, *J Lip Res*,50(4):704-715.

66. **Zhang M, Ikeda K, Xu JW, Yamori Y, Gao XM, Zhang BL.** Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways. 2009, *Phytother Res.* 23(5) :713-8.
67. **Lian JP, Word B, Taylor S, Hammons GJ, Lyn-Cook BD.** Modulation of the constitutive activated STAT3 transcription factor in pancreatic cancer prevention: effects of indole-3-carbinol (I3C) and genistein.. 2004 , *Anticancer Res.*, 24(1):133-7.
68. **Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH.** Regulation of IGF-I mRNA and signal transducers and activators of transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 myoblasts. 2002 , *Endocrinology.*143(2):492-503.
69. **Hsu YF, Sheu JR, Lin CH, Yang DS, Hsiao G, Ou G, Chiu PT, Huang YH, Kuo WH, Hsu MJ.** Trichostatin A and sirtinol suppressed survivin expression through AMPK and p38MAPK in HT29 colon cancer cells. 2012 , *Biochim Biophys Acta.* 1820(2):104-15.
70. **Jiang S, Wang W, Miner J, Fromm M.** Cross regulation of sirtuin 1, AMPK, and PPAR γ in conjugated linoleic acid treated adipocytes.2012, *PLoS One.*7(11): e48874.
71. **Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J.** *Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets.*2006 , *Nutrition.*, 22(9): 956-64.
72. **Cederroth, C. R., M. Vinciguerra, A. Gjinovci, F. Kuhne, M. Klein, M. Cederroth, D. Caille, M. Suter, D. Neumann, R. W. James, D. R. Doerge, T. Wallimann, P. Meda, M. Foti, F. Rohner-Jeanraud, J. D. Vassalli, S. Nef.** Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. 2008. *Diabetes*, 57(5):1176-118
73. **McGarry, JD.** Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes.2002. *Diabetes* ,51(1):7-1
74. **Schaffer, JE.** Lipotoxicity: when tissues overeat. 2003. *Curr Opin Lipidol*, 14(3): 281-7.
75. **Unger R, Orci L** Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. 2000. *Int J Obes*, 24(2): S28-S32.
76. **Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K** Substitution at codon 269 (Glutamine--- Proline) of the leptin receptor (Ob-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. 1996. *Biochem Biophys Res Commun*, 16(22): 597-604.
77. **Coleman DL.** Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndrom in mice. 1978, *Diabetologia.*14: 141-148.

78. **Sriwijitkamol, A., J. L. Ivy, C. Christ-Roberts, R. A. DeFronzo, L. J. Mandarino.** LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. 2006. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(5): E925-932
79. **Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Døskeland SO, Blank JL, Bos JL.** A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. 2002. *Nat Cell Biol* 4(11): 901-6
80. **Shih CH, Lin LH, Lai YH, Lai CY, Han CY, Chen. L.** Genistein, a competitive PDE1-4 inhibitor, may bind on high-affinity rolipram binding sites of brain cell membranes and then induce gastrointestinal adverse effects. 2010. *Eur J Pharmacol.*, 643(1):113-20.
81. **Deng JY, Hsieh PS, Huang JP, Lu LS, Hung LM.** Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways. 2008, *Diabetes.*,57(7): 1814-23.
82. **Vega RB, Huss JM, Kelly DP.** The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. 2000, *Mol Cell Biol*, 20(5):1868-76.
83. **Irrcher I, Ljubicic V, Kirwan AF, Hood DA.** AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. 2008, *PLoS One*, 3(10): e3614-31.
84. **Kodiha M, Ho-Wo-Cheong D, Stochaj U** Pharmacological AMP-kinase activators have compartment-specific effects on cell physiology. 2011, *Am J Physiol Cell Physiol.*, 301(6): C1307-15
85. **Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J** SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. 2008. *J. Biol. Chem*, 283(29): 20015-26.
86. **Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., Ido, Y** SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation.. 2008. *J. Biol. Chem*, 283(41):27628–27635.