



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Investigación Clínica Experimental en Salud

Campo Disciplinario: Bioquímica Clínica

Efecto de los compuestos bioactivos genisteína y resveratrol sobre la resistencia a la insulina en pacientes con síndrome metabólico.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL EN SALUD

Presenta: L.N.B. Einar Thor Godínez Salas.

Director: **Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran.

Asesores:

**Dra. Martha Guevara Cruz.** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran.

**Dra. Berenice Palacios González.** Instituto Nacional de Medicina Genómica.

**Dr. Oscar A. Pérez Méndez.** Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

**Dr. José Pedraza Chaverri.** Facultad de Química U.N.A.M.

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Junio 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 de abreviaturas:**

ABC glucosa: Área bajo la curva de glucosa.

ABC: Insulina: Área bajo la curva de insulina.

ACC: Acetil Coenzima A carboxilasa.

A.G.L.: Ácidos grasos libres.

ALT: Alanina transaminasa.

AMPK: Proteína cinasa activada por adenosin monofosfato.

AgRP: Proteínas relacionadas a agouti

AST Aspartato transaminasa.

CI: Calorimetría Indirecta.

CPT-1: Carnitina palmitoil transferasa.

CR: Cociente respiratorio

CT: Colesterol total

c-HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

c-LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

DASH: Dietary Approaches to Stop Hypertension

GEB: Gasto energético basal.

IPAQ: Cuestionario internacional de actividad física.

JAK: Janus cinasa.

M.E.: Músculo esquelético.

PGC1 $\alpha$ : Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma.

POMC: Propiomelanocortina

PPAR $\alpha$ : Receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisomas alfa.

PPAR $\gamma$ : Receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisomas gamma.

R.I.: Resistencia a la insulina.

SDH: Succinato deshidrogenasa.

SM: Síndrome metabólico.

SREBP1: Proteína reguladora de elementos de unión de esteroides.

TGL: Triglicéridos.

UCP3: Proteína desacoplante mitocondrial.

## Contenido

1.- Introducción: .....	6
1.1.- Resistencia la insulina .....	6
1.2.- Inflexibilidad metabólica .....	8
1.3.- Lipotoxicidad .....	9
1.4.- Tratamiento para el síndrome metabólico .....	11
1.5.- Compuestos bioactivos .....	12
2.- Planteamiento del problema .....	17
3.- Justificación .....	17
4.- Hipótesis.....	18
5.- Objetivo general .....	18
5.1.- Objetivos específicos .....	18
5.2.- Objetivos secundarios .....	18
6.- Metodología .....	19
6.1.- Metodologías y técnicas utilizadas .....	20
6.1.1.- Antropometría y composición corporal .....	20
6.1.2.- Cuestionarios de estilo de vida .....	21
6.1.3.-Pruebas bioquímicas .....	22
6.1.4.- Pruebas clínicas .....	23
6.1.5.- Evaluación de la concentración de proteínas específicas en músculo .....	24
7.- Diseño del estudio .....	26
8.- Resultados .....	27
8.1.- Resultados Objetivo 1: Sensibilidad a la insulina.....	33
8.2.- Resultados Objetivo 2: Parámetros antropométricos y bioquímicos.....	35
8.3.- Resultados Objetivos secundarios .....	38
8.3.1.-Fosforilación AMPK, JAK, ACC y concentración PGC1 $\alpha$ .....	38
8.3.2.- Función mitocondrial. ....	40
8.3.3.- Gasto energético basal y cociente respiratorio .....	41
9.- Discusión.....	41
10.- Conclusión .....	46
11.- Referencias .....	47

## Índice de figuras:

Figura 1 Obtenida y modificada de: <a href="https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico">https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico</a> .....	7
Figura 2 Obtenida y modificada de: <a href="https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico">https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico</a> .....	7
Figura 3 Obtenida y modificada de:.....	10
Figura 4 Obtenida y modificada de: <a href="http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&amp;fecha=22/01/2013">http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&amp;fecha=22/01/2013</a> .....	12
Figura 5 Obtenida de Palacios et al.Biochimica et Biophysica Acta 2014 .....	13
Figura 6 Obtenida de Palacios et al.Biochimica et Biophysica Acta 2014 .....	14
Figura 7 Obtenida de Palacios et al.Biochimica et Biophysica Acta 2014 .....	15
Figura 8 Obtenida de Timmers et al. Cell Metab. 2011 .....	16
Figura 9 Visitas y actividades durante el proyecto.....	19
Figura 10 Diseño del estudio.....	26
Figura 11 Flujograma de los pacientes.....	28
Figura 12 Comparación del área bajo la curva de glucosa antes y después de 2 meses de tratamiento.....	33
Figura 13 Comparación del área bajo la curva de insulina antes y después de 2 meses de tratamiento.....	34
Figura 14.....	37
Figura 15 Cascada de señalización de leptina .....	38
Figura 16. Concentración de JAK2, y relación entre Pjak2/JAK2 *p<0.05 Se utilizó prueba U de Mann-Whitney .....	38
Figura 17 Concentración de AMPK y relación entre pAMPK/AMPK *p<0.05 Se utilizó prueba U de Mann-Whitney .....	39
Figura 18 Concentración de ACC y relación entre pACC/ACC.....	39
Figura 19 Concentración de PGC1a. *p<0.05 Se utilizó prueba U de Mann-Whitney .....	39
Figura 20 Tinción SDH en músculo esquelético .....	40
Figura 21 Gasto energético basal p<05 Prueba t para muestras independientes.....	41
Figura 22 Cociente respiratorio .....	41
Figura 23 Efectos de los compuestos bioactivos genisteína y resveratrol sobre parámetros antropométricos, bioquímicos y moleculares.....	46

## Índice de tablas:

Tabla 1 Características basales de la población Los datos se representan en media $\pm$ error estándar.....	29
Tabla 2: Características basales antropométricas y bioquímicas, de los 42 pacientes que finalizaron el proyecto.....	31
Tabla 3: Comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos antes y después del tratamiento.....	35

## 1.- Introducción:

El síndrome metabólico (SM) es el conjunto de factores metabólicos que va a aumentar el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares. Para dar el diagnóstico de síndrome metabólico se debe contar con al menos 3 de los siguientes factores (1) :

- Obesidad abdominal definida por una circunferencia de cintura mayor a 80 cm en mujeres y mayor a 90 cm en hombres (2).
- Presión arterial elevada definida con valores mayores o iguales que 130/85 mm/Hg.
- Alteración en la concentración de glucosa en ayuno por arriba de 100 mg/dL.
- Concentraciones de lipoproteínas de alta densidad por debajo de 40 mg/dL en hombres y 50 mg/dL en mujeres.
- Concentraciones de triglicéridos por arriba de 150 mg/dL.

El síndrome metabólico está relacionado con el sobrepeso y la obesidad; el sobrepeso se clasifica cuando el Índice de Masa Corporal (IMC) es mayor a 25 y menor a 30, y la obesidad se clasifica con un IMC igual o mayor a 30 (3) (4). Esta patología es causada por un desbalance energético crónico entre lo que se consume con lo que se gasta, además este síndrome, junto con la obesidad se asocian a la resistencia a la insulina (RI).

### 1.1.- Resistencia la insulina

En el SM y la obesidad hay una mayor acumulación de lípidos en el interior de tejidos no adiposos (lipotoxicidad), como el músculo esquelético (ME), esto va a ocasionar una disminución en la oxidación de lípidos (5). El ME además es el responsable del 20% del metabolismo de glucosa en reposo, pero bajo el estímulo de la insulina se vuelve el responsable de alrededor del 80% de la captación de glucosa, la cual va a ser almacenada principalmente en forma de glucógeno. Esto le va a conferir responsabilidad en el desarrollo de la RI, la cual está definida como la incapacidad de los tejidos de responder a la acción de esta hormona (6). Además el músculo esquelético representa alrededor del 40% del peso corporal en humanos siendo así el principal lugar para la oxidación de lípidos y de la acción periférica de la insulina (7).

Las acciones de la insulina se llevan a cabo mediante cascadas de señalización intracelular, y el primer paso para ejercer su función es la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina. Por un lado, se van a llevar a cabo una serie de reacciones que activarán en el núcleo factores de transcripción que permitirán la regulación de eventos metabólicos (8). Por otro lado, una vez fosforilado el receptor de insulina, este, va a fosforilar al fosfatidil inositol 2 fosfato para formar al fosfatidil inositol 3 fosfato, el cual va a activar a la proteína AKT generando la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) hacia la membrana y de esta manera permitir la entrada de glucosa al interior de la célula, tal y como se observa en la **Figura 1** (5).

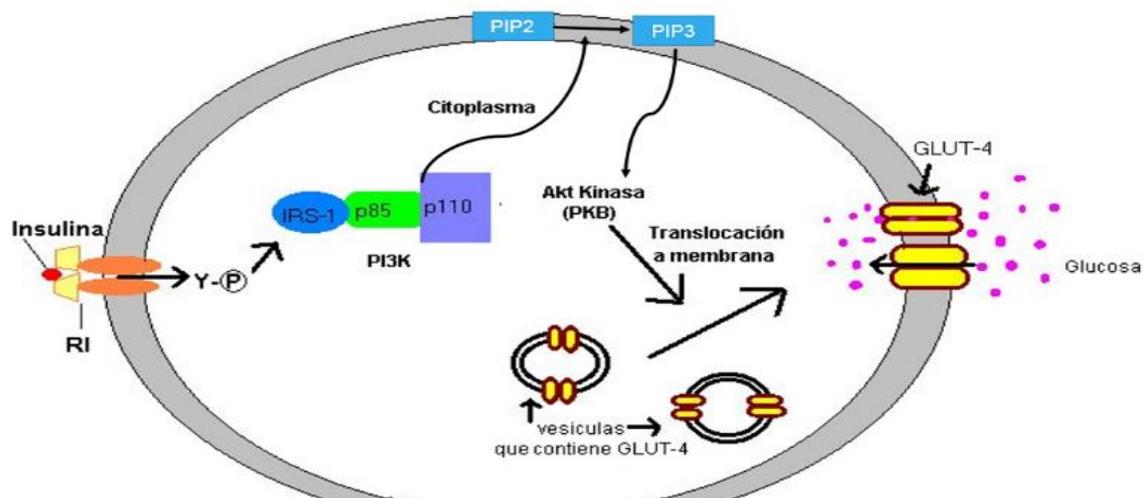


Figura 1 Vía de señalización de insulina:

Obtenida y modificada de: <https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico>

Pero como ya se mencionó anteriormente la lipotoxicidad va a afectar esta cascada de señalización, los diferentes tipos de lípidos van a inhibir diversas partes de la sección como se observa en la figura 2:

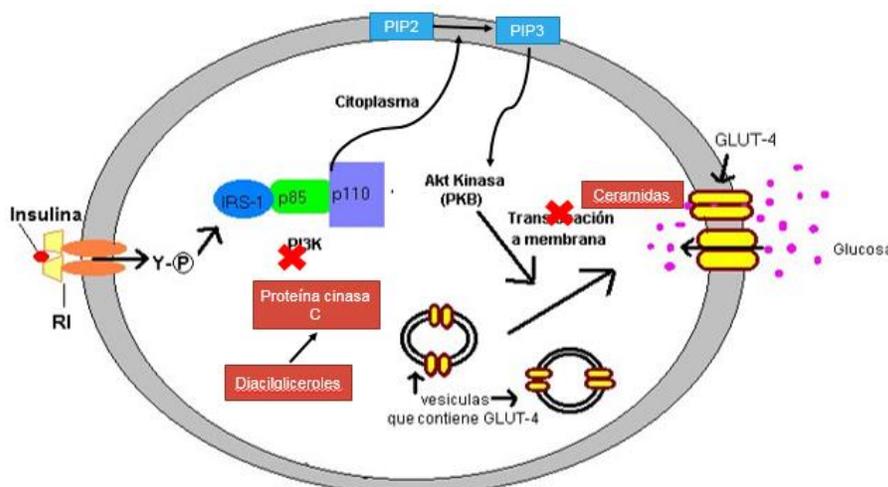


Figura 2 Efecto de lípidos en la señalización de insulina

Obtenida y modificada de: <https://caracasthyroidinstitute.wikispaces.com/Efectos+de+la+Insulina%2C+Glucag%C3%B3n+y+Adrenalina+sobre+el+metabolismo+en+los+tejidos+adiposo%2C+muscular+y+hep%C3%A1tico>

Como se observa en la **Figura 2**, los diacilgliceroles van a activar a la proteína cinasa c y esta va a inhibir al fosfatidil inositol 3 fosfato y las ceramidas van a inhibir la traslocación del transportador de glucosa 4. Todo esto generará un ciclo de retroalimentación positiva, puesto que a mayor lipotoxicidad, mayor resistencia a la insulina, y a mayor resistencia a la insulina, menor uso de lípidos y por lo tanto mayor lipotoxicidad.

### 1.2.- Inflexibilidad metabólica

Otro de los efectos que se observan durante la obesidad y el SM es una disfunción mitocondrial, la cual va a afectar el metabolismo energético, su efecto se reflejará principalmente en el músculo, el cual, como se mencionó anteriormente, es el principal tejido activo metabólicamente, y este efecto se va a traducir en una inflexibilidad metabólica, que se define como: la incapacidad del ME de responder o cambiar de sustrato energético (glucosa/lípidos) como fuente de energía en diferentes estados fisiológicos (9) (10) (11).

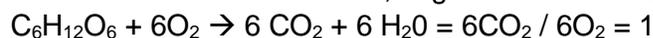
La inflexibilidad metabólica a su vez puede ser una de las causantes de la lipotoxicidad como se mencionó anteriormente y fomenta la acumulación de ceramidas y diacilgliceroles debido a una disminución en la oxidación de ácidos grasos.

Para poder determinar el sustrato energético que se está utilizando es necesario determinar el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y el consumo de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ) a través de una calorimetría indirecta.

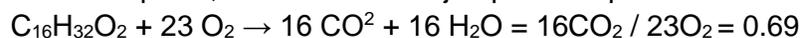
Para poder determinar el tipo de sustrato que se está utilizando se determina el coeficiente respiratorio el cual corresponde al cociente del dióxido de carbono producido, entre el oxígeno consumido. Cuando el coeficiente respiratorio es igual a 1 indica que se están utilizando hidratos de carbono, cuando es 0.7 indica la utilización de grasas, particularmente de ácidos grasos, y si es de 0.82 indica la utilización de proteínas, mientras que un valor de alrededor de 0.85 indica la utilización de una combinación de los sustratos(12).

Los valores para los macronutrientes se determinaron así:

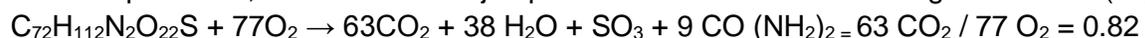
Para los hidratos de carbono, la glucosa obtiene el siguiente valor (13):



Para los lípidos, tomando como ejemplo al ácido palmítico se obtiene el siguiente valor (13):



Para las proteínas, tomando como ejemplo la albúmina se obtiene el siguiente valor (13):



### 1.3.- Lipotoxicidad

Así mismo, durante la obesidad el tejido adiposo pierde la capacidad de almacenar el exceso de energía de la dieta en forma de triglicéridos. Por lo tanto, existe un aumento eventual en la cantidad de ácidos grasos libres (AGL) en la circulación (9). Los cuales, en condiciones normales, se oxidan en el ME en respuesta a la estimulación de la leptina, hormona sintetizada y secretada por el tejido adiposo, la cual tiene un efecto tanto periférico como central. Las principales funciones de la leptina son la regulación de la ingesta de comida, gasto energético, metabolismo, ejes neuroendocrinos y sistema inmune (14).

Las concentraciones plasmáticas de leptina van a estar relacionados proporcionalmente a la cantidad de tejido adiposo. Algunos de los reguladores que van a jugar un papel importante en su síntesis son la insulina, los glucocorticoides y las citocinas proinflamatorias las cuales van a estimular su producción (14) (15).

Otro de los efectos que tiene la leptina es a nivel de hipotálamo, en donde se localizan sus receptores principalmente en el núcleo arcuato. En este núcleo del hipotálamo existen dos tipos de neuronas, las de proopiomelanocortina (POMC) y las proteínas relacionadas a agouti (AgRP). La leptina va a ejercer su efecto estimulando la síntesis de POMC, a partir de la cual va a generar la hormona estimulante de  $\alpha$  melanocitos ( $\alpha$ -MSH). Por otro lado, la leptina, va a inhibir al grupo de neuronas AgRP, así como la expresión del neuropéptido Y, los cuales tienen un efecto orexigénico. El resultado total de esto, será una reducción de la ingesta de comida, un aumento del gasto energético y una disminución de la ganancia de peso (15).

Como se observa en la **Figura 3**, la leptina va a estimular la oxidación de los ácidos grasos al unirse a su receptor, que a su vez estimula a la enzima Janus cinasa 2 (JAK2). Posteriormente, la JAK2 activa la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK), que a su vez fosforila la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) inhibiendo su actividad. Al estar inhibida esta enzima, se va a reducir la concentración de malonil CoA, el cual es un inhibidor de la carnitina palmitoil transferasa 1, lo que conduce a un aumento de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria en forma de acil-CoA, lo que estimula su oxidación (14) (16).

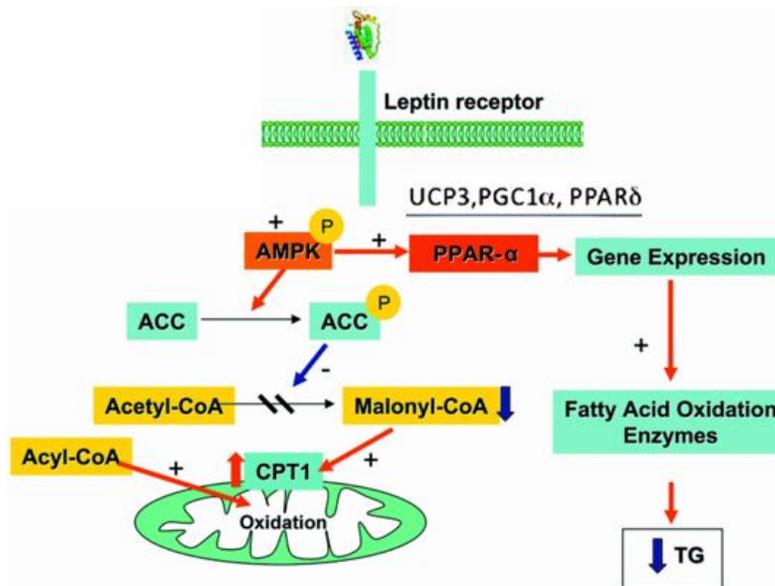


Figura 3 Obtenida y modificada de: Aguilera et al. Clinical Science (2008) 114, 183-193

El AMPK es una serina/treonina cinasa encargada de censar los niveles de energía y adaptar el metabolismo a las variaciones nutricionales y ambientales. En general se encuentra mayormente activado en tejido adiposo subcutáneo que en tejido adiposo visceral. De igual manera se encuentra en concentraciones menores en personas con resistencia a la insulina y sus concentraciones pueden variar por diversas circunstancias fisiológicas (4).

Adicionalmente, el AMPK activado estimula al receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR  $\alpha$ ), al PPAR $\gamma$  y al coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PGC1  $\alpha$ ) (17). El PPAR  $\alpha$  es un regulador del metabolismo de los lípidos, está expresado en el tejido adiposo e hígado y en ME principalmente. El PPAR  $\alpha$  funciona como un sensor de lípidos en el hígado activando enzimas catabólicas en estado de ayuno con el fin de suplir las demandas energéticas del organismo (18). El PPAR $\gamma$  regula genes de la homeostasis celular, aumenta la expresión de proteínas desacoplantes (UCP's) además de que regula a la baja la leptina e inhibe la expresión de genes que afectan de manera negativa la acción de la insulina (19). El PGC1  $\alpha$  es un regulador positivo de biogénesis mitocondrial, de la adaptación termogénica y la gluconeogénesis entre otras; se va a activar por diversos factores tales como ejercicio, frío y ayuno. Además tendrá un efecto en regular a la baja enzimas implicadas en la formación de especies reactivas de oxígeno (20).

Sin embargo durante el desarrollo de la obesidad la actividad de AMPK se encuentra disminuida, debido a una menor sensibilidad del ME a la actividad de la leptina (21) (22) (23). Algunas posibles causas de la resistencia a la leptina en la obesidad son: hiperleptinemia que per se, causa la resistencia posiblemente por una sobre activación de reguladores de retroalimentación negativa; otro posible factor es un estado proinflamatorio, ya que ácidos grasos saturados se unen a los receptores Toll-like tipo 4 los cuales promueven la resistencia a la leptina y obesidad (15).

#### 1.4.- Tratamiento para el síndrome metabólico

Ante todos estos cambios metabólicos existen diferentes alternativas para disminuir sus efectos negativos en la salud. La primera línea de acción para el SM y la obesidad es un cambio en el estilo de vida (alimentación y ejercicio), y se han tomado como base las recomendaciones por parte del panel de ATP III y de la Asociación Americana del Corazón (AHA) para tener las directrices en un plan de alimentación para estos pacientes.

Las directrices de ATP III son: Lípidos entre el 20-35% del total del gasto energético, grasa saturada <7% de las kilocalorías totales de la dieta, colesterol <200 mg al día, fibra entre 10-25 g considerando la fibra de parte de las verduras al menos 2 g/día y aumento de actividad física (24) (25).

Junto con este plan de tratamiento existe otro tipo de intervención que trata de mejorar la salud de las personas el cual es la dieta DASH, en la cual se incluye el consumo diario de granos, así como la recomendación de lácteos bajos en grasa, un consumo bajo de sodio (< 2,300 mg de por día o < 6g al día de sodio), se recomienda disminuir los edulcorantes calóricos y disminuir tanto las grasas saturadas como las grasas trans (26).

Ambos tipos de intervenciones son planes de alimentación que regresan a lo que es una dieta correcta, la cual va de la mano con las recomendaciones para la población mexicana de acuerdo a la norma NOM-043-SSA2-2005 que tiene como base el plato del bien comer. Se recomienda un porcentaje de hidratos de carbono de alrededor 50-55%, lípidos entre un 20-30% y proteína 10-20%, adicionalmente se tiene una guía visual para que la población mexicana pueda alimentarse de mejor manera en la cual se explica que la dieta debe ser:

Variada: Incluir diferentes alimentos de cada grupo de alimento.

Equilibrada: Guardar la proporción recomendada en la imagen.

Suficiente: Que se cubran los requerimientos de la persona.

Inocua: Que no sea dañina o perjudicial a la salud.

Agradable a los sentidos: Que vaya de acuerdo a la cultura y sea acorde a los gustos de la persona (27).



Figura 4 Plato del bien comer

Obtenida y modificada de:

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013)

### 1.5.- Compuestos bioactivos

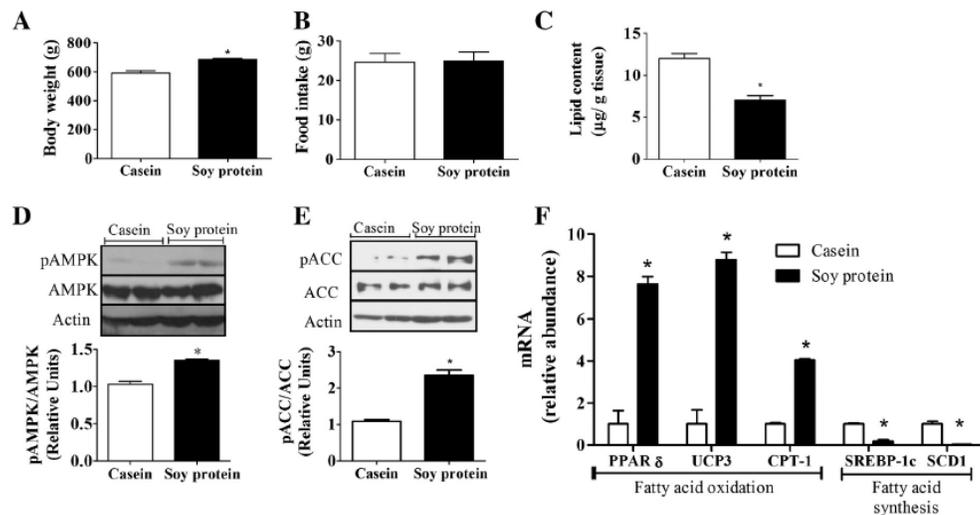
A pesar de que existen diversas intervenciones para la prevención o para revertir el síndrome metabólico y la obesidad, estas no han tenido un efecto favorable en parte debido al medio ambiente, así como la falta de una asesoría adecuada. Por lo anterior se han buscado compuestos bioactivos de algunos alimentos para tratar estas patologías, tales como el resveratrol y la genisteína.

La genisteína es una isoflavona presente principalmente en la soya y debido a su estructura, las isoflavonas también son llamadas fitoestrógenos por su similitud al  $17\beta$ -estradiol. Se han asociado con la disminución en la sensación de aumento de temperatura y a la pérdida de masa ósea en la postmenopausia, así como a prevenir el cáncer de mama, a disminuir las concentraciones de colesterol total y por lo tanto a la disminución de la aterosclerosis, reduciendo así el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y finalmente modificando la secreción y la sensibilidad a la insulina a través de la activación de la cascada de señalización de AMPK (28).

En el estudio de Palacios y colaboradores se estudió en un modelo animal utilizando ratas Zucker (fa/fa), las cuales se dividieron en dos grupos; un grupo que consumió una dieta con caseína alta en grasa, y otro una dieta con proteína de soya alta en grasa. Después de 160 días de tratamiento se determinaron las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos,

leptina e insulina y se estudió en el músculo esquelético la expresión de diversos genes involucrados en la síntesis u oxidación de ácidos grasos (29).

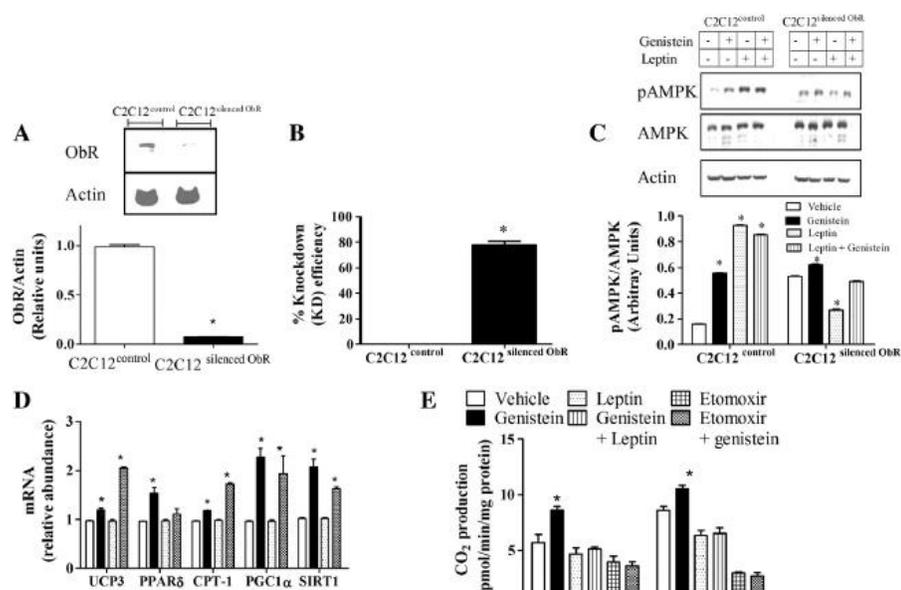
Al final del estudio se encontró que las ratas alimentadas con la dieta con proteína de soya y alta en grasa tenían menores concentraciones de triglicéridos que aquellas con caseína. En cuanto al músculo se encontró que el grupo de proteína de soya tenía menor acumulación de lípidos; por lo cual se decidió evaluar el estado de fosforilación de AMPK, encontrando que el nivel de pAMPK estaba elevado en el grupo alimentado con dieta de proteína de soya alta en grasa, así como la fosforilación de su proteína blanco, la acetil-CoA carboxilasa (pACC); como ha sido reportado, el aumento en pAMPK incrementa la actividad de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1) y de hecho se observó en el presente estudio un aumento en la expresión de CPT-1 y UCP3, las cuales están involucradas en oxidación de ácidos grasos y termogénesis, respectivamente, tal y como se observa en la **Figura 5**. Con esto se postula que las isoflavonas activan a AMPK de forma independiente al receptor de leptina (29).



Efectos de la proteína de soya en el peso corporal, ingestión de comida, contenido de lípidos en músculo esquelético, fosforilación de AMPK, y ACC, así como la expresión de mRNA de PPARδ, UCP3, CPT-1, SREBP1c y SCD1 en ratas Zucker fa/fa. Peso corporal (A) e ingestión de comida (B) fue determinada todos los días. Cuantificación del contenido de lípidos en músculo esquelético fue realizada por Folch (C). Detección de la fosforilación de AMPK y ACC (D y E) fue realizada por inmunoblot con anticuerpos contra fosfo-AMPK (Thr172), fosfo-ACC (Ser79), total AMPK y total ACC. Detección de la expresión de mRNA de PPARδ, UCP3, CPT-1, SREBP1c y SCD1 (D) fue evaluada por PCR en tiempo real. RNA total fue obtenido de tejido muscular esquelético (vastus lateralis) de ratas alimentadas con 30% de caseína o proteína de soya. Los resultados se muestran en media ± D.S. (n=8/grupo). Asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (p<.05).

Figura 5 Efectos de proteína de soya vs caseína  
Obtenida de Palacios et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014

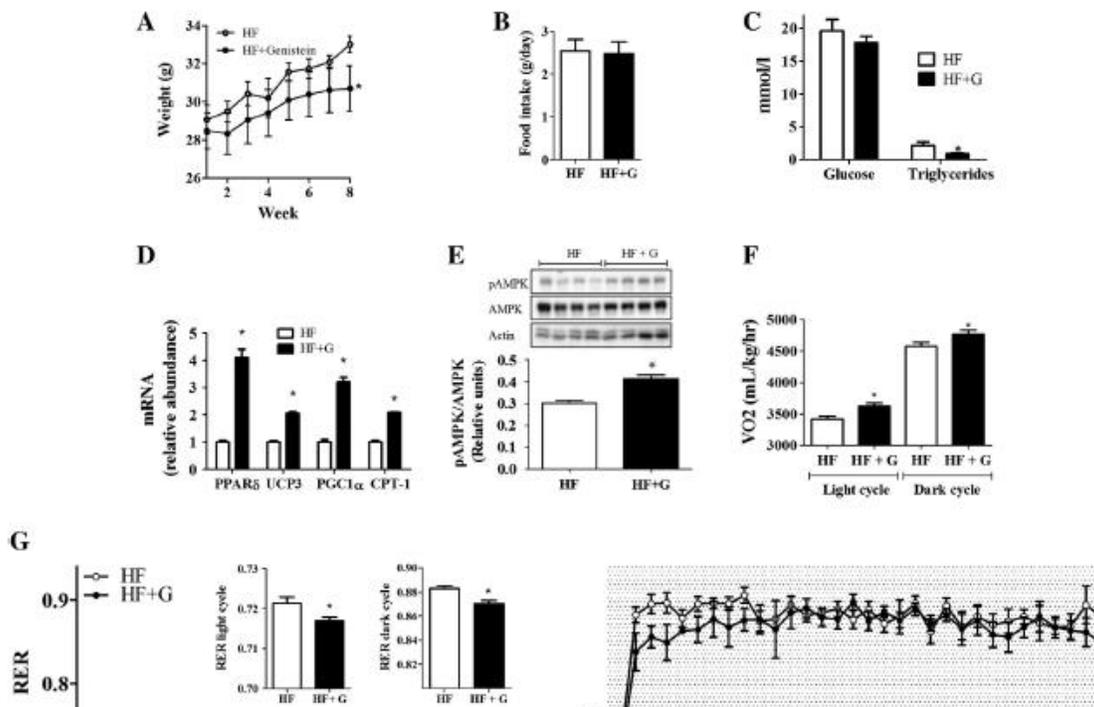
Para comprobar en dicho estudio si el efecto era independiente al receptor de leptina, se utilizaron células musculares de la línea C2C12 las cuales se silenciaron para el receptor de leptina en un 92% aproximadamente, y se incubaron con genisteína, dado que es la isoflavona más abundante en la proteína de soya, aunado a que al incubar las células con dadzeina, no se estimuló la fosforilación de AMPK ni la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos. Los resultados que se obtuvieron fueron que sólo la genisteína aumentó la fosforilación de AMPK en las células silenciadas para el receptor de leptina. Así mismo, para demostrar si el aumento en la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos estaba relacionado con el aumento en la oxidación de palmitato, se incubaron las células con genisteína y leptina y se midió la oxidación de palmitato por 1 hora, encontrando que la genisteína fue la única en aumentar la oxidación de palmitato en las células silenciadas para leptina, como se observa en la **Figura 6**. Confirmando que su acción es independiente del receptor de leptina (29).



Efectos de la genisteína en la fosforilación de AMPK, expresión de mRNA de UCP3, PPAR $\delta$ , CPT-1, PGC1 $\alpha$  y SIRT1 y la oxidación de palmitato a CO<sub>2</sub> en miotubulos C2C12 control y silenciados para OBr. La expresión del receptor de leptina en las células control C2C12 que fueron transfectadas con un no específico harpin o short harpin que tenían como objetivo el (OBr) receptor de leptina fue medido por inmunoblot (A). La eficiencia del knockdown de OBr fue determinada por RT-PCR (B). Las células C2C12 control y silenciadas OBr fueron incubadas con 10  $\mu$ mmol/l de genisteína, 10 ng de leptina o ambos por 1 hora. En algunos experimentos, las células musculares fueron incubadas con 80  $\mu$ mmol/l etomoxir. Al final de la incubación, la células fueron lisadas y usadas para inmunoblots con anticuerpos contra fosfo-AMPK (Thr172), total AMPK o actina, que fue usada como control (C): los inmunoblots mostrados son representativos de los 3 experimentos. La detección de la expresión de mRNA UCP3, PPAR $\delta$ , CPT-1, PGC1 $\alpha$  y SIRT1 (D) fue realizada por PCR en tiempo real, los niveles de expresión de mRNA fueron calculados como relativo a la expresión de cada gen en miotubulos que fueron con incubados sólo con el vehículo (E). Para medir la oxidación del palmitato a CO<sub>2</sub>, las células que fueron cultivadas por 1 hora en la ausencia o presencia de 10  $\mu$ mmol/l de genisteína, 10 ng de leptina o 80  $\mu$ mmol/l etomoxir o las indicadas combinaciones, y 250  $\mu$ mmol/l [1-<sup>14</sup>C] palmitato unido a 1% (w/v), suero fetal bovino fue añadido durante los últimos 30 minutos de cultura celular. Los datos están mostrados como media  $\pm$  E.E. de 3 experimentos que fueron realizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

*Figura 6 Efecto de genisteína  
Obtenida de Palacios et al. Biochimica et Biophysica Acta 2014*

Por otro lado, se estudió en el mismo trabajo el efecto de la genisteína en ratones de la cepa C57BL6 los cuales fueron divididos en dos grupos, un grupo alimentado con dieta alta en grasa y el otro con dieta alta en grasa más genisteína. Al cabo de 58 días se evaluó el gasto energético a través de calorimetría indirecta, así como también se midieron las concentraciones de glucosa y triglicéridos. Los resultados de dicho estudio mostraron que los ratones alimentados con una dieta que contenía genisteína, tenían una mayor expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos, un aumento en la fosforilación de pAMPK, asociado con un incremento en el consumo de oxígeno, así como una disminución del cociente respiratorio como se observa en la **Figura 7**.



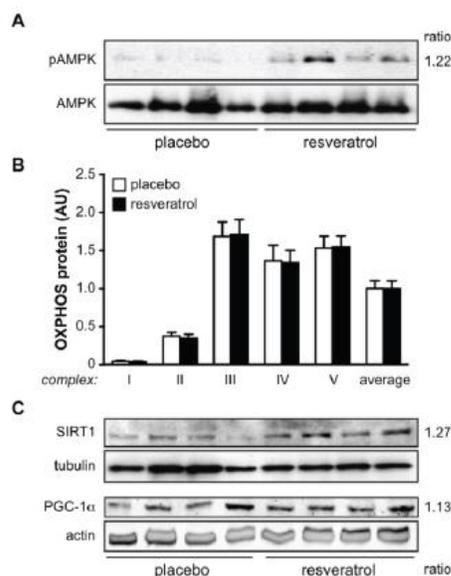
Efecto de la genisteína en peso corporal, ingestión de comida, glucosa y concentración de triglicéridos, expresión de mRNA en PPAR $\delta$ , UCP3, PGC1 $\alpha$  y CPT-1, fosforilación de AMPK, tasa metabólica y RER en ratones C57BL6 con dieta alta en grasa. Peso corporal (A), ingestión de comida (B) fueron determinados diario. La concentración en plasma de glucosa y triglicéridos fueron determinados por el método de glucosa oxidasa y con kit colorimétrico respectivamente (C). La detección de mRNA de PPAR $\delta$ , UCP3, PGC1 $\alpha$  y CPT-1 (D) fue realizado por PCR entiendo real. RNA total fue obtenido de músculo esquelético de ratones alimentos con dieta alta en grasa (HF) o dieta alta en grasa más genisteína (HF + G). El músculo esquelético fue homogeneizado y lisado para la detección de fosfo-AMPK (Thr172), total AMPK o actina, que fue usada como control. La tasa metabólica y el intercambio respiratorio en ayuno (fase de luz) o durante la alimentación (fase de oscuridad) (VO<sub>2</sub>, F, RER:G) fueron determinados por análisis de calorimetría indirecta. Las fases de luz y oscuridad están señaladas en la zona blanca y en la zona con puntos negros respectivamente, (círculos blancos = HF, círculos negros = HF+G). Los resultados del RER están mostrados como el promedio de 12 horas del ciclo de luz (7:00 a 19:00) y 12 horas del ciclo de oscuridad (19:00-7:00) de un estudio de 48 horas. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EE (n=4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (p<0.05).

Figura 7 Efecto del resveratrol en modelo animal  
Obtenida de Palacios et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014

Por otro lado, el resveratrol que es una fitoalexina presente normalmente en uvas, nueces, frutos rojos y vino tinto, tiene 2 isoformas, una cis y una trans, siendo la configuración trans la que tiene efectos biológicos (30) (31). Este compuesto bioactivo se ha relacionado con la disminución de la resistencia a la insulina mediante la activación de SIRT1, el cual se conoce a su vez que activa a PGC1a, que funciona como un coactivador del factor de transcripción PPAR-alfa (32). Así mismo se ha relacionado al resveratrol con la activación por fosforilación de AMPK teniendo como consecuencia la estimulación de la oxidación de ácidos grasos (33).

En el estudio llevado a cabo por Timmers et al, se evaluó a 11 sujetos obesos metabólicamente sanos que recibieron por un mes resveratrol o placebo con un periodo de lavado de 4 semanas entre uno y el otro. Al cabo de cada tratamiento se evaluaron las concentraciones séricas de glucosa, insulina, triglicéridos, leptina, adiponectina, se calculó el índice HOMA, se determinó el consumo de oxígeno por calorimetría indirecta y se tomó una biopsia de músculo del *vastus lateralis* (34).

Al cabo de los 30 días de cada uno de los tratamientos, se encontró un aumento en la concentración de pAMPK, SIRT1 y PGC1a después de un mes de la suplementación con resveratrol como se muestra en la **Figura 8**:



(A) El nivel de fosforilación en el residuo de Thr172 de la subunidad AMPKa indican la actividad de AMPK por western blot en un total de 9 sujetos por grupo. La relación resveratrol/placebo esta mostrada en la parte derecha del panel A.

(B) El contenido proteico de los complejos de la cadena de transporte de electrones fue cuantificado por western blot del vastus lateralis de 11 sujetos por grupo. Un cocktail de anticuerpos que detecta los 5 complejos fue usado y los datos están representados como media  $\pm$  ES por los complejos individuales, así como el promedio de expresión de todos los complejos.

(C) Los niveles de las proteínas SIRT1 and PGC1a en el músculo vastus lateralis por western blot (n=8 para SIRT1 y n=11 para PGC1a). La expresión relativa de las 2 proteínas es corregida por el control, tubulina para SIRT1 y actina para PGC1a. La relación de resveratrol/placebo) es mostrada en el lado derecho del panel C.

Figura 8 Efecto del resveratrol en humanos  
Obtenida de Timmers et al. Cell Metab. 2011

Así mismo, se encontró que posterior al consumo del resveratrol había una disminución del porcentaje de grasa en el hígado y un aumento en el área grasa en músculo con fibras del tipo 1.

En cuanto a los parámetros bioquímicos se encontraron diferencias en glucosa, insulina, triglicéridos, leptina e índice HOMA después del tratamiento con resveratrol, lo que correlacionó cambios en la tasa metabólica durante el sueño evaluado con la calorimetría indirecta, aunque sin cambios significativos en el gasto energético durante el día (34).

## 2.- Planteamiento del problema

El síndrome metabólico es un problema de salud pública que ocurre aproximadamente en el 40% de la población en México, esta patología está relacionada con la obesidad y la RI. La causa de estas patologías es multifactorial ya que influyen factores ambientales, genéticos, sociales y culturales entre otros, y a pesar de las múltiples estrategias que se han implementado para cambiar los factores ambientales, no se ha logrado frenar el incremento de estas patologías, por lo que es importante demostrar si el uso de estos compuestos bioactivos (genisteína y/o resveratrol) puede prevenir o incluso revertir el desarrollo de estas enfermedades para poder usarlos como agentes preventivos para atender estas alteraciones metabólicas.

## 3.- Justificación

En estudios previos se ha demostrado que el consumo de proteína de soya o de genisteína tienen la capacidad de reducir la lipotoxicidad, a través de la activación de factores de transcripción involucrados en la oxidación de ácidos grasos, y también pueden reprimir la expresión y actividad de factores de transcripción que controlan la lipogénesis, como son: SREBP1 y PPAR $\gamma$  en hígado y ME. Así mismo incrementan la fosforilación de AMPK y ACC lo que estimula la expresión de genes de la oxidación de ácidos grasos, de biogénesis mitocondrial y la termogénesis (CPT-1, PGC1 $\alpha$  y UCP3 respectivamente).

Así mismo el resveratrol, que se encuentra principalmente en las uvas, genera efectos metabólicos semejantes a la genisteína, que han sido asociados con disminución de la incidencia de enfermedad cardiovascular. El tratamiento en modelo de ratones con resveratrol aumenta significativamente su capacidad aeróbica, con aumento del consumo de oxígeno por las fibras musculares. También se observó un efecto de resveratrol sobre

la expresión de genes de la fosforilación oxidativa y la biogénesis mitocondrial mediada por un incremento de la actividad de PGC1 alfa.

## 4.- Hipótesis

La suplementación de los compuestos bioactivos genisteína, resveratrol, o la combinación (genisteína + resveratrol) mejorará la sensibilidad a la insulina en pacientes con síndrome metabólico y resistencia a la insulina.

## 5.- Objetivo general

Estudiar el efecto de los compuestos bioactivos genisteína y/o resveratrol sobre la sensibilidad a la insulina, determinada por el área bajo la curva (ABC) de insulina en la prueba de tolerancia a la glucosa de 2 horas en pacientes con síndrome metabólico y resistencia en la insulina.

### 5.1.- Objetivos específicos

-Determinar antes y después de diferente intervención (genisteína, resveratrol, la combinación genisteína + resveratrol o placebo) en pacientes con SM.

1. Sensibilidad a la insulina determinada por el ABC de insulina de la prueba de tolerancia a la glucosa.
2. Concentración en suero de glucosa, insulina, colesterol total (CT), colesterol-HDL (C-HDL), colesterol- LDL (C-LDL), triglicéridos (TGL), leptina y adiponectina.

### 5.2.- Objetivos secundarios

1. Determinar antes y después de diferente intervención (genisteína, resveratrol, la combinación genisteína + resveratrol o placebo) en pacientes con SM el consumo de oxígeno y el cociente respiratorio mediante calorimetría indirecta.
2. Determinar en una biopsia de ME de los pacientes con SM después de la intervención (genisteína, resveratrol, la combinación o placebo) :La fosforilación de la enzima AMPK, JAK y ACC y la concentración de PGC1 $\alpha$ , AMPK, JAK2, ACC.
3. Análisis histológico de ME para determinar la función mitocondrial mediante tinción de succinato deshidrogenasa (SDH).

## 6.- Metodología

Se incluyeron 80 participantes que cumplieron los criterios de inclusión: mexicanos mestizos adultos entre 20 y 60 años con diagnóstico de SM, índice de HOMA mayor de 2.5, IMC  $\geq 30$  y  $\leq 40$  Kg/m<sup>2</sup> y que firmaron la carta de consentimiento. Se excluyeron a los pacientes que tuvieran cualquier patología agregada, embarazo, tabaquismo o que consumieran medicamentos.

Una vez aceptada la carta de consentimiento informado se les asignó al grupo de tratamiento respectivo. Se les brindó la dieta recomendada en el SM de acuerdo a los lineamientos de ATP III a todos los participantes. Los pacientes consumieron diferentes compuestos bioactivos: a) placebo, capsulas de maltodextrina (200 mg); b) capsulas de genisteína (50 mg/d); c) cápsulas de resveratrol (150 mg/d) y d) cápsulas de genisteína + resveratrol (50 + 150 mg/d respectivamente).

Se siguieron por 3 meses a los participantes, se tuvieron 7 visitas (una previsita y 6 visitas de seguimiento) a lo largo del proyecto (**Figura 9**)

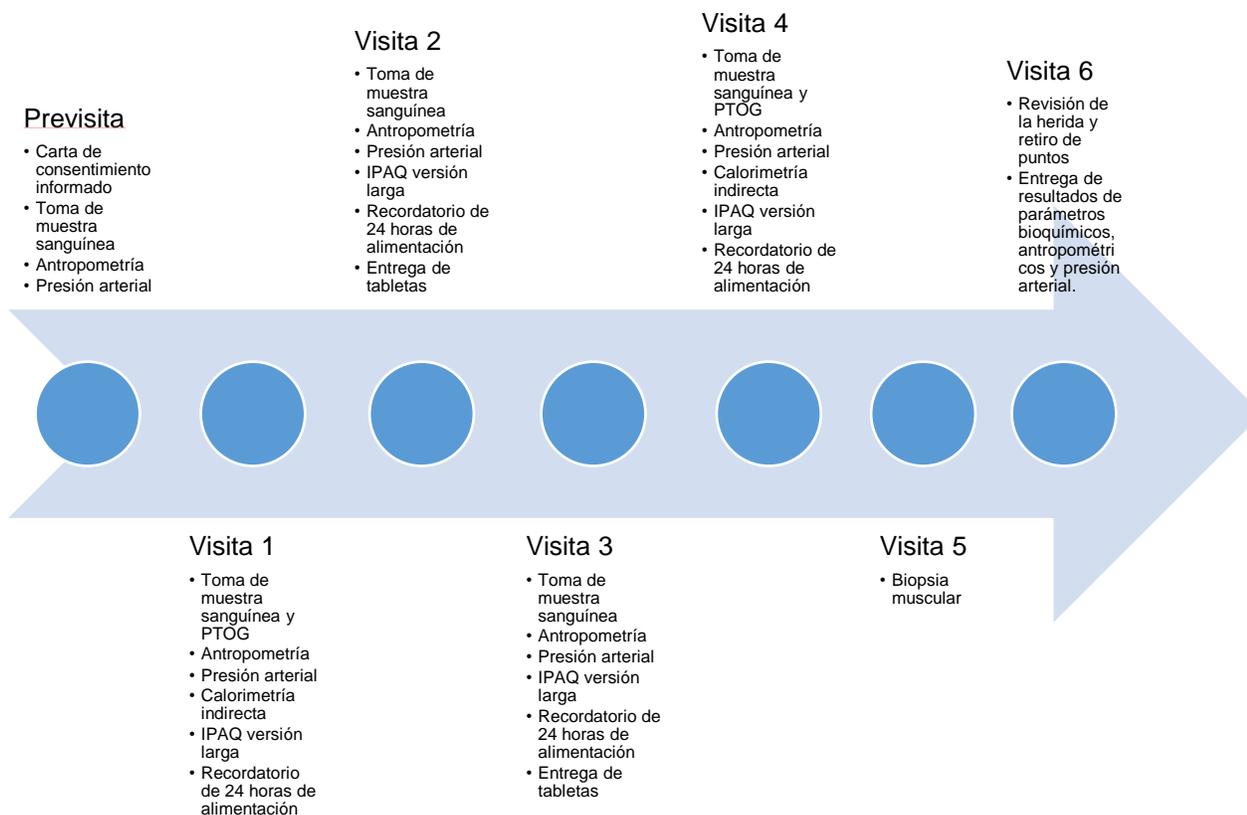


Figura 9 Visitas y actividades durante el proyecto.

A continuación, se describen las actividades realizadas en cada una de las visitas:

En la previsita se les dio carta de consentimiento informado, se les tomó muestra de sangre para evaluar la concentración glucosa, perfil de lípidos e insulina en suero, se midió presión arterial, estatura y se realizó el estudio de composición corporal. Se determinó la presencia de resistencia a la insulina por medio de índice HOMA y síndrome metabólico.

En la primera visita se les realizó un recordatorio de 24 horas de alimentación, el estudio de composición corporal, la medición de presión sanguínea, el gasto energético basal (GEB), el cociente respiratorio (CR), el cuestionario de actividad física versión larga (IPAQ largo) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa por 2 horas.

En la segunda visita se les tomó muestra de sangre, se les realizó un recordatorio de 24 horas de alimentación, el estudio de composición corporal, la medición de presión sanguínea y se les entregó el frasco de tabletas de acuerdo al grupo que les fue asignado.

En la tercera visita se les tomó muestra de sangre, se les realizó un recordatorio de 24 horas de alimentación, el estudio de composición corporal, la medición de presión sanguínea y se les entregó el segundo frasco de tabletas de acuerdo al grupo que les fue asignado.

En la cuarta visita se les realizó un recordatorio de 24 horas de alimentación, el estudio de composición corporal, la medición de presión sanguínea, el gasto energético basal (GEB), CR, IPAQ largo y la prueba de tolerancia oral a la glucosa por 2 horas.

En la quinta visita se les realizó una biopsia del músculo vastus lateralis por un cirujano experto en quirófano.

En la sexta visita se les revisó la herida para verificar complicaciones, se retiraron los puntos y se entregaron resultados de los parámetros bioquímicos así como los de composición corporal y presión sanguínea.

## **6.1.- Metodologías y técnicas utilizadas.**

### **6.1.1.- Antropometría y composición corporal**

Estas mediciones se realizaron en ayuno aproximado de 8 a 10 horas, a temperatura ambiente, con ropa ligera y similar en cada una de las visitas.

**Estatura:**

Se midió con estadímetro (BSM370), los pacientes debían tener los pies y las rodillas juntas, con glúteos y parte superior de la espalda pegada al estadímetro, cabeza en plano de Frankfurt, sin movimiento (35).

**Composición corporal:**

Mediante bioimpedancia eléctrica (InBody710), se determinó peso y composición corporal para conocer % de masa grasa y masa libre de grasa, total y por compartimentos, con los pies colocados en los electrodos en la base del equipo y los brazos separados del cuerpo agarrando los electrodos correspondientes sin ningún movimiento (36).

**Circunferencia de cintura:**

Se midió en el punto más angosto entre el punto más bajo del borde intercostal y la cresta iliaca, en caso de no ser notorio, se midió en el punto medio de esos 2 mismos referentes anatómicos. Se tomó la medición al final de la exhalación (35).

**Índice de masa corporal:**

Se calculó mediante el cociente del peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la estatura en metros (37).

**Presión arterial:**

Se midió teniendo al paciente sentado con soporte para la espalda y el brazo del cual se tomaría la presión arterial; se tuvo al paciente en reposo por lo menos 5 minutos, con los pies cómodos sobre el piso, sin cruzar las piernas. Se tomaron 2 mediciones y en caso de tener una diferencia mayor a 5 mmHg entre ellas, se tomaron otras 2 mediciones y se realizó un promedio de las 4 (38).

**6.1.2.- Cuestionarios de estilo de vida****Cuestionario internacional de actividad física (IPAQ por sus siglas en inglés)**

Con el fin de obtener la información acerca de sus niveles de actividad se les realizó el cuestionario de actividad física internacional (anexo 1), el cual permite determinar si los pacientes cuentan con actividad física leve, moderada o alta, además para determinar si el efecto observado después de la intervención fue o no por la actividad física, aunque cabe

mencionar que se les pedía a los pacientes que no cambiaran su actividad física. Este cuestionario está validado para ser utilizado en estudios de intervención.

### **Apego al tratamiento dietario (recordatorio de 24 horas de alimentación y diario de alimentos)**

Para evaluar el apego al tratamiento dietario se realizaron diversos cuestionarios como el de recordatorio de 24 horas de alimentación (anexo 2), el cual consiste en obtener de la forma más exacta posible (cantidad, método de preparación, hora y tipo) los alimentos y bebidas que fueron ingeridas el día anterior; además también se les pidió un diario de alimentos (anexo 3), el cual consisten en registrar lo que se come en todo el día de la forma más exacta posible (cantidad, método de preparación, hora y tipo); y se les pidió que lo registraran por 3 días por cada semana.

Con ambos cuestionarios dietarios se evaluó el apego al tratamiento, el cual se calculó en porcentaje, tomando como el 100% las kcal y la distribución de macronutrientes dados al inicio del proyecto.

### **Apego al tratamiento de los compuestos bioactivos (tabletas).**

Para la evaluación del apego al tratamiento del consumo de las tabletas se realizaron calendarios para cada mes de tratamiento (anexo 4), en el cual los pacientes debían registrar si habían consumido las tabletas (1 tableta cada 12 horas) todos los días durante el tratamiento. Con dicho calendario, el apego, se calculó en porcentaje, considerando como el 100% las 60 pastillas por mes que debían consumir.

## **6.1.3.-Pruebas bioquímicas**

### **Prueba de tolerancia oral a la glucosa**

Se les realizaron 2 pruebas de tolerancia oral a la glucosa para determinar el área bajo la curva de esta prueba de insulina y glucosa; Se realizaron con el paciente sentado, en ayuno. Se colocó el catéter en la vena antebraquial para las tomas de sangre. Una vez colocado el catéter, se le dio al paciente la bebida glucosada (75 g de glucosa anhidra diluida en 250 ml de agua). Se tomaron muestras de sangre en los tiempos: 0', 15', 30', 45', 60', 90', 120' para la medición de glucosa e insulina.

Se determinó posteriormente el área bajo la curva (ABC) de las concentraciones de glucosa e insulina de la prueba de tolerancia oral a la glucosa durante las 2 horas. Dicha área se

calculó de acuerdo a la fórmula de los trapecios tomando en cuenta los tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min (38).

### **Medición de concentraciones bioquímicas en suero**

La medición de la concentración del perfil bioquímico se obtuvo de los pacientes después de un ayuno entre 8 a 12 horas. Posteriormente, se centrifugó la sangre a una velocidad de 3000 rpm por 10 minutos, una vez separado el suero, se realizó la medición mediante equipo fotométrico COBAS c111. Las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, el colesterol-LDL, la alanina amino transferasa y la aspartato amino transferasa se determinaron por métodos enzimáticos y colorimétricos. La concentración de glucosa en suero se determinó por un método enzimático empleando de la referencia hexocinasa; los analitos fueron evaluados posterior a la calibración y la evaluación de los controles positivos y negativos (39).

### **Medición de leptina, adiponectina e insulina.**

La medición de la concentración de las hormonas leptina, adiponectina e insulina, se determinaron por el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA) de la marca ALPCO, y se usó suero para evaluar sus concentraciones (40).

## **6.1.4.- Pruebas clínicas**

### **Medición del gasto energético basal y determinación del cociente respiratorio**

El gasto energético basal se midió en la primera y cuarta visita del proyecto por medio de calorimetría indirecta (calorímetro B2 Quark Cosmed, Roma, Italia). La medición se realizó en ayuno de 8-12 horas, sin haber consumido café, nicotina, chocolate y sin realizar actividad física extenuante más que las habituales en su día. Se colocó al paciente en posición supina semifowler, se le colocó una mascarilla que cubría boca y nariz con el fin de evitar entrada o salida de aire. La medición se realizó durante 20 minutos, descartando los primeros 5 minutos, y se obtuvo una media del gasto energético basal. El cociente respiratorio se obtuvo a partir del cociente de la media del volumen de dióxido de carbono espirado entre la media del volumen de oxígeno inspirado.

## **Biopsia de músculo esquelético.**

En la visita 5, se revisó el estado clínico, laboratorios prequirúrgicos (biometría hemática y tiempos de coagulación) de los pacientes, a los cuales se les explicó nuevamente el procedimiento y las posibles complicaciones de la biopsia; una vez aceptando participar se procedió a llevar a cabo la biopsia de músculo.

Para la obtención del músculo esquelético fue necesario llevar a cabo una biopsia, la cual se realizó de la siguiente manera: El procedimiento se llevó a cabo en un área quirúrgica ambulatoria por un cirujano con experiencia. El área de la que se obtuvo la muestra fue del músculo vastus lateralis, en la zona ubicada a 25 cm de la tuberosidad tibial y a 5 cm de la línea media femoral. El procedimiento inició con la toma de signos vitales, teniendo valores dentro de rangos normales, se procedió con una adecuada técnica de asepsia y antisepsia con colocación de campos quirúrgicos estériles y posteriormente se realizó una infiltración subcutánea anestésica con lidocaína al 5%. Se realizó una incisión de 2 cm con bisturí, se realizó hemostasia y disecado del músculo; posterior a esto se procedió a tomar una porción de 1 cm<sup>3</sup> de músculo mediante pinza de anillos. Una vez realizada la hemostasia, se procedió a cerrar la aponeurosis y el tejido celular subcutáneo con surgete continuo con vicryl 3/0, y la piel con puntos intradérmicos. Se realizó compresión sobre la zona de incisión durante 5 o 10 minutos, evitando así la aparición de hematomas, y posteriormente se colocó una gasa con un tegaderm en el área y vendaje compresivo por 24 horas. Además, se les dieron indicaciones a los pacientes de limpiar el área una o dos veces al día después de las 24 horas post-incisión con jabón y agua para evitar algún tipo de contaminación e infección. A los pacientes se les dio paracetamol de 500 mg cada 8 horas para los siguientes 5 días y se les dio ketorolaco 30 mg sublingual inmediatamente posterior a la biopsia con la indicación de tomarlo en caso de dolor. Así mismo se les proporcionó datos de alarma y un número telefónico en donde pudieran localizar a un médico en caso de que presentaran alguna molestia y se les citó para el retiro de puntos.

### **6.1.5.- Evaluación de la concentración de proteínas específicas en músculo**

#### **Procesamiento de biopsia de músculo.**

En cuanto se obtuvo la muestra, esta fue dividida en 3 porciones, 2 se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido; la otra porción se almacenó en aluminio con tissue tek y se colocó inmediatamente en nitrógeno

líquido, Después las muestras se almacenaron en un ultracongelador a  $-80^{\circ}$  para su posterior análisis.

### **Extracción de proteína y western blot**

De la biopsia de ME de pacientes con SM, se determinó la concentración de PGC1 $\alpha$ . AMPK, JAK2, ACC, así como también las formas fosforiladas de las enzimas AMPK, JAK y ACC. También se realizó la tinción de la SDH en los cortes histológicos de ME.

### **Extracción de proteína**

Para la extracción de proteína, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml con 300  $\mu$ l de amortiguador de lisis. Las muestras de ME (200-400 mg), fueron primero pulverizadas con mortero utilizando nitrógeno líquido; posterior a esto, con una pistola homogeneizadora se mezclaron hasta tener una mezcla uniforme. Una vez obtenida la mezcla se colocó en un rotor a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  de donde se tomó una muestra para el análisis de western blot.

### **Western blot**

Para el western blot, se utilizó la muestra de músculo esquelético, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry. Posteriormente se utilizaron 40  $\mu$ g de proteína por muestra la cual se separó por medio de electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. Las moléculas de las muestras se movieron a través del gel a diferente velocidad dependiendo de su forma, tamaño y carga. Al final de la separación las proteínas, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno por electrotransferencia, y las proteínas transferidas a la membrana se reconocieron utilizando los correspondientes anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para cada proteína o sus formas fosforiladas. Las bandas obtenidas se cuantificaron por medio de densitometría utilizando el programa ImageJ.

### **Histología**

Así mismo, de la biopsia de músculo se evaluó el contenido de mitocondrias mediante tinción de SDH. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Del músculo almacenado en tissue tek se realizaron cortes de 12 µm en un criostato. Y se colocaron en un portaobjetos. Se preparó el medio de incubación que contenía 270 mg de succinato de sodio y 10 mg de nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés) que se disolvieron en 10 mL de amortiguador de fosfatos 2 M. Posteriormente se les colocó el medio a las muestra y se incubaron por 60 min a 37°C. Al finalizar este paso se lavaron los portaobjetos con agua desionizada 3 veces, previamente se prepararon soluciones al 30%, 60% y 90% de acetona usando agua desionizada y se les quitó el NBT no unido al músculo mediante 3 cambios en cada una de las soluciones de acetona en forma creciente y luego decreciente en concentración; después se dejaron las muestras en acetona al 90% hasta ver una nubecilla violeta arriba del tejido y finalmente se lavaron varias veces en agua desionizada para después ser montadas en los portaobjetos en medio acuoso para ser observados al microscopio.

## 7.- Diseño del estudio

Fue un ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego.

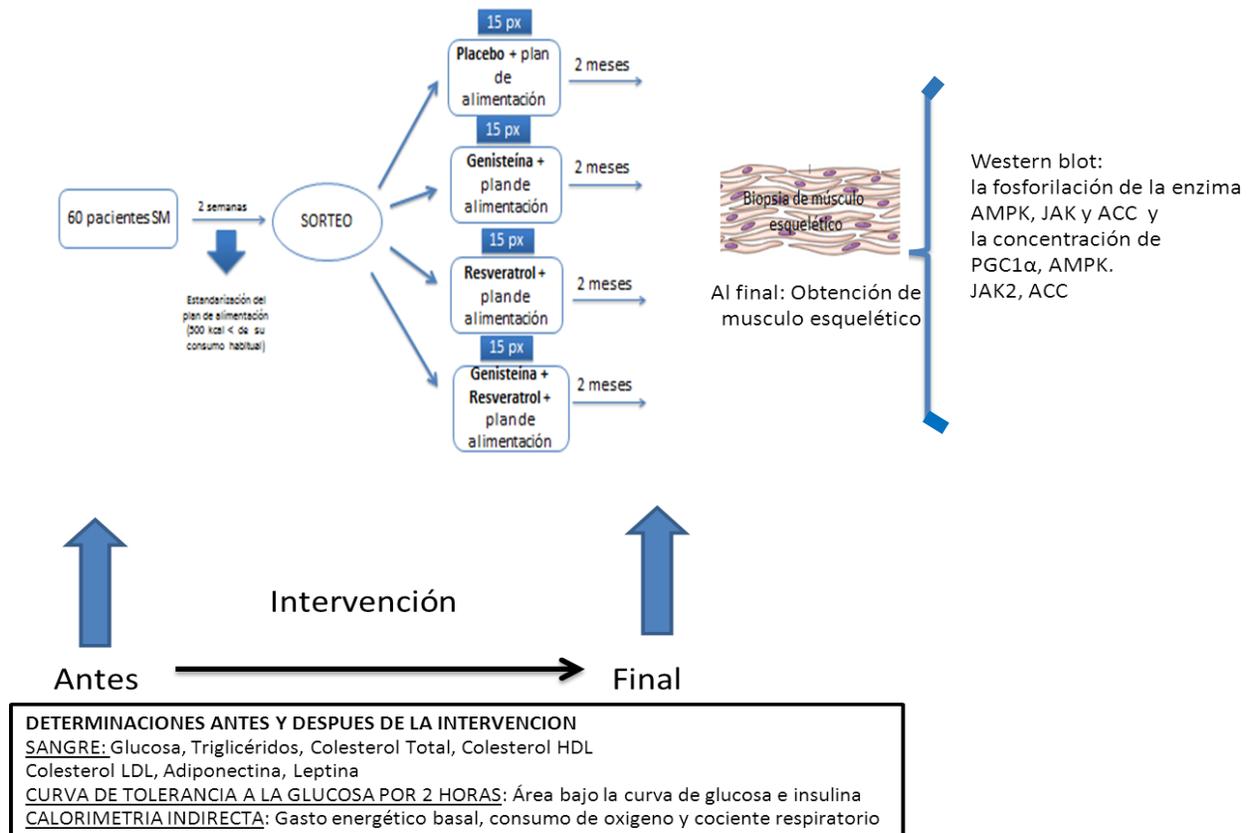


Figura 10 Diseño del estudio.

### **Cálculo de tamaño de muestra**

Para el cálculo de tamaño de muestra se tomó en cuenta la diferencia de cambio de expresión de AMPK de estudios previos, siendo para genisteína  $0.4 \pm 0.2$  y para resveratrol  $0.2 \pm 0.15$ . Se tomó la siguiente fórmula:  $N = 2S^2 (Z\alpha + Z\beta) / \Delta^2$ . Dicho cálculo nos dio un total de 11 pacientes por grupo, al cual se le añadió un 30% extra para tolerar pérdidas dando un total de 15 pacientes por grupo (41).

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico primero se obtuvieron la media y el error estándar para las variables cuantitativas, y para las variables cualitativas se determinaron en proporción del total de la población. Esto se realizó en una base de datos en software estadístico (SPSS); una vez teniendo el total de datos, se usó la prueba de shapiro wilk para determinar normalidad de los datos, y en el caso de que los datos no cumplieran con la prueba de normalidad fueron transformados a logaritmo para poder ser analizados.

Se utilizó prueba t de student para muestras relacionadas para comparar el cambio que tuvieron las variables antes y después de cada uno de los tratamientos. Y para determinar si hubo diferencias por grupo se realizó ANOVA de un factor.

## **8.- Resultados**

Se invitaron a 80 personas a participar en el proyecto de investigación, de estos, 23 se perdieron a lo largo de las visitas por falta de tiempo o interés y 3 fueron excluidos por presentar valores de glucosa muy elevados en la previsita, dando un total de 54 pacientes, de los cuales, 12 fueron eliminados por un apego menor al 80% en el plan de alimentación y las tabletas.

Esto dio un total de 42 participantes finalizados, y a lo largo del estudio no se encontraron efectos adversos en ningún tratamiento.

En la **Figura 11** se observa el flujograma de los pacientes.

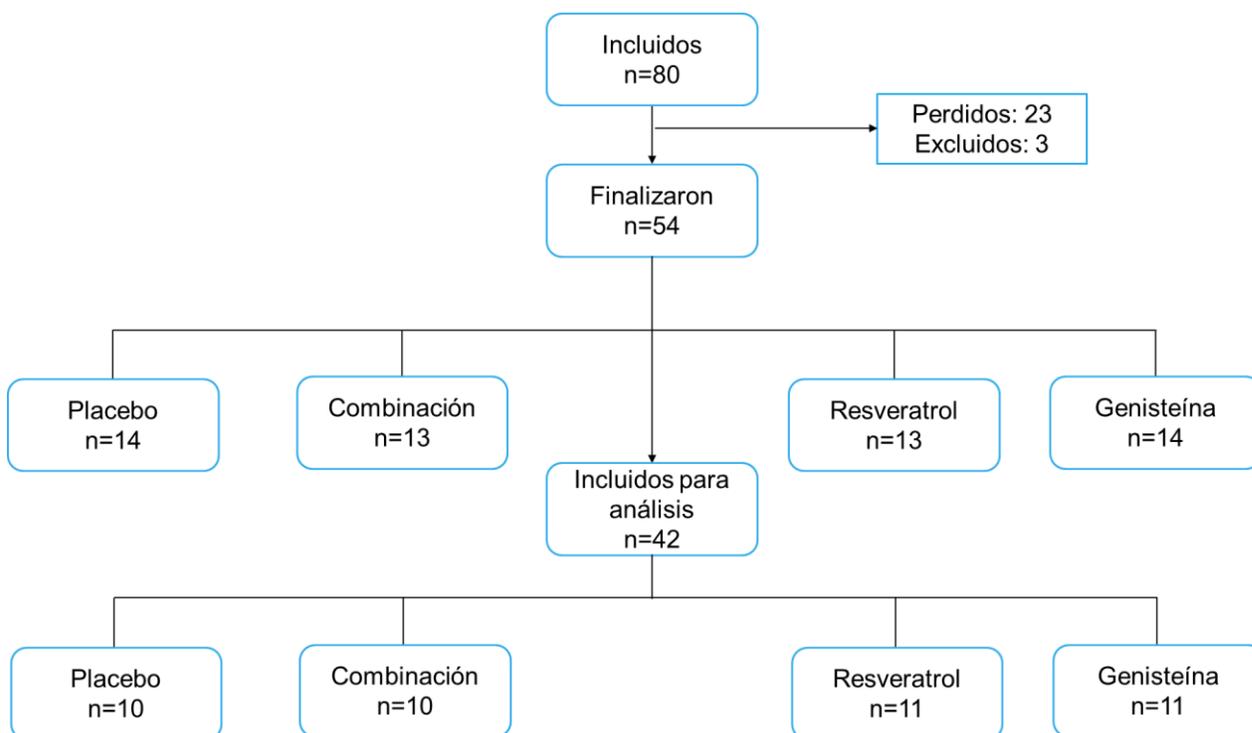


Figura 11 Flujograma de los pacientes.

De los 42 pacientes que terminaron, aceptaron el procedimiento de la biopsia de músculo 25 pacientes.

### Características basales de la población

En la **Tabla 1** se observan las características basales de los 42 pacientes que finalizaron el proyecto de investigación y con un apego al tratamiento mayor al 80% sin ser agrupados en el grupo de tratamiento que les corresponde; en esta tabla se puede observar que los pacientes presentan resistencia a la insulina además de obesidad, concentraciones elevadas de triglicéridos, concentraciones bajas de HDL y concentraciones de glucosa en ayuno elevadas, siendo todas, características del síndrome metabólico.

Tabla 1: Características basales de los 42 pacientes que finalizaron el proyecto.

Variable		Valores normales
Edad (años)	42.6 ± 1.48	NA
Estatura (m)	1.59 ± 0.01	NA
Peso (kg)	87.4 ± 1.77	NA
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	34.3 ± 0.61	18.5-24.9
Cintura (cm)	99.7 ± 1.21	< 80 mujeres / < 90 hombres
Masa muscular (%)	55.1 ± 1.07	
Masa grasa (%)	44.9 ± 1.07	< 25
Presión arterial sistólica (mmHg)	110 ± 2.23	120
Presión arterial diastólica (mmHg)	78 ± 1.56	80
Índice HOMA	4.59 ± 0.38	< 2.5
Glucosa (mg/dL)	103.3 ± 1.81	< 100
Insulina (µUI/mL)	17.6 ± 1.32	
Colesterol (mg/dL)	187 ± 5.10	< 200
c-HDL (mg/dL)	38.2 ± 1.32	> 40 hombres / > 50 mujeres
c-LDL (mg/dL)	116 ± 4.89	< 110
Triglicéridos (mg/dL)	181 ± 13.4	< 150
Proteína C reactiva (mg/L)	4.73 ± 0.69	< 1
Alanina amino transferasa (UI/L)	29.9 ± 1.82	10-45
Aspartato amino transferasa (UI/L)	23.4 ± 1.05	10-43
Leptina (ng/mL)	34.8 ± 3.24	4-25
Adiponectina (ng/mL)	19.7 ± 1.74	
Área bajo la curva de Glucosa	17708 ± 685	
Área bajo la curva de Insulina	14201 ± 1001	

*Tabla 1 Características basales de la población  
Los datos se representan en media ± error estándar.*

### **Características basales por grupo**

En la **Tabla 2** se observan las características basales de los 42 pacientes que finalizaron el proyecto de investigación y con un apego al tratamiento mayor al 80% agrupados en el grupo de tratamiento que les corresponde; en esta tabla se observa homogeneidad en las diversas variables evaluadas entre grupos a excepción del colesterol total y el c-LDL, presentando concentraciones mayores el grupo de la genisteína.

Tabla 2: Características basales antropométricas y bioquímicas, de los 42 pacientes que finalizaron el proyecto.

	Placebo	Genisteína	Resveratrol	Combinación	p*
Edad (años)	42.0 ± 3.46	41.3 ± 3.24	45.5 ± 2.71	41.4 ± 2.56	0.72
Estatura (m)	1.59 ± 0.03	1.57 ± 0.02	1.62 ± 0.02	1.61 ± 0.03	0.46
Peso (kg)	87.6 ± 3.45	86.5 ± 4.28	88.9 ± 2.56	86.5 ± 4.16	0.96
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	34.9 ± 1.41	35.1 ± 1.40	34.1 ± 1.04	33.1 ± 1.11	0.69
Circunferencia de Cintura (cm)	99.9 ± 2.71	100 ± 2.78	101 ± 2.16	97.3 ± 2.18	0.71
Masa muscular (%)	55.8 ± 2.66	52.2 ± 1.59	56.7 ± 2.51	55.6 ± 1.69	0.47
Masa grasa (%)	44.2 ± 2.66	47.8 ± 1.59	43.3 ± 2.51	44.4 ± 1.69	0.47
P.A.S.(mmHg)	112 ± 4.09	108 ± 5.43	113 ± 5.41	107 ± 2.45	0.75
P.A.D. (mmHg)	75.0 ± 1.89	77.0 ± 4.28	84.0 ± 3.19	75.0 ± 2.16	0.18
Índice HOMA	4.62 ± 1.04	3.60 ± 0.57	5.04 ± 0.79	5.20 ± 0.55	0.44
Glucosa (mg/dL)	109 ± 5.32	100 ± 2.70	102 ± 3.33	102 ± 2.54	0.34
Insulina (μUI/mL)	16.1 ± 3.18	14.4 ± 2.22	19.4 ± 2.75	20.6 ± 2.22	0.32
Colesterol (mg/dL)	171 ± 9.88	211 ± 10.9	167 ± 5.83	199 ± 7.01	0.01
c-HDL (mg/dL)	38.7 ± 2.67	41.3 ± 2.78	34.2 ± 2.30	38.7 ± 2.62	0.27
c-LDL(mg/dL)	102 ± 8.02	135 ± 11.3	101 ± 9.39	125 ± 5.32	0.02

Tabla 3 Continuación

Triglicéridos (mg/dL)	163 ± 24.8	180 ± 17.6	192 ± 34.9	188 ± 30.1	0.88
Proteína C reactiva (mg/L)	7.69 ± 2.09	4.54 ± 0.93	3.16 ± 1.00	3.37 ± 0.84	0.08
ALTL (UI/L)	27.5 ± 2.58	34.5 ± 4.32	27.4 ± 3.44	29.5 ± 3.89	0.47
ASTL (UI/L)	25.3 ± 2.28	23.9 ± 2.46	23.1 ± 1.85	21.1 ± 1.63	0.57
Leptina (ng/mL)	34.3 ± 7.17	39 ± 6.33	30.8 ± 7.22	35.0 ± 5.77	0.85
Adiponectina (ng/mL)	16.5 ± 1.71	25.4 ± 3.80	18.7 ± 1.38	16.7 ± 4.07	0.18
ABC de Glucosa	17994 ± 1200	16191 ± 1678	17906 ± 1464	18725 ± 1145	0.63
ABC de Insulina	11164 ± 1518	16472 ± 2733	13727 ± 1952	15719 ± 1616	0.26

*Los datos se presentan con media y error estándar.*

*IMC: índice de masa corporal; P.A.S: Presión arterial sistólica; P.A.D: Presión arterial diastólica; ALTL alanina amino transferasa; ASTL: aspartato amino transferasa; ABC: Área bajo la curva.*

*\*Se compararon las características basales de los grupos por ANOVA de un factor*

## 8.1.- Resultados Objetivo 1: Sensibilidad a la insulina

Cómo se puede observar en la **Figura 12** existió una disminución estadísticamente significativa de 2,335 (mg/dL\*2 hr) en el grupo de la combinación siendo este cambio de 12.5% del área bajo la curva de glucosa durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

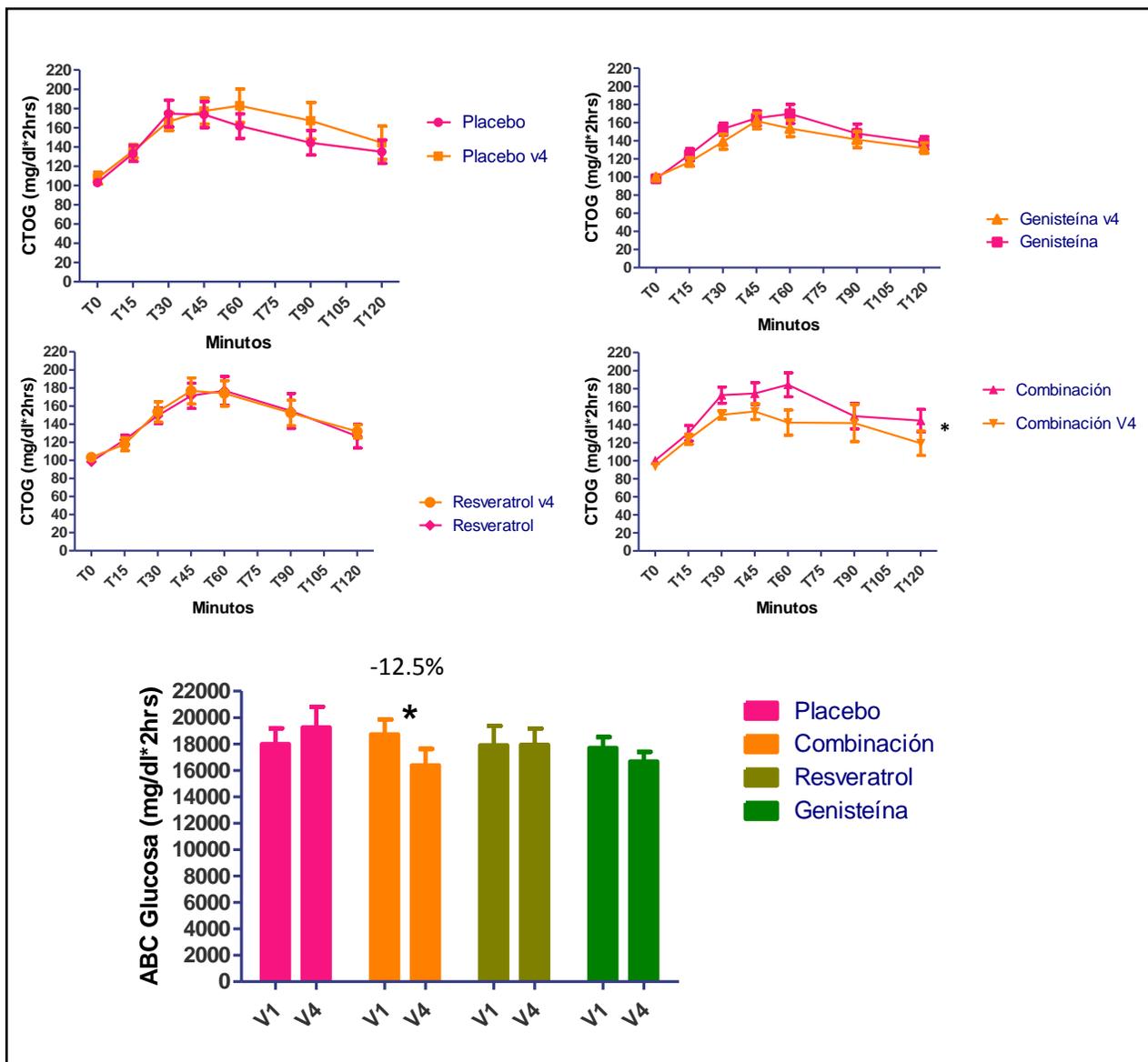


Figura 12 Comparación del área bajo la curva de glucosa antes y después de 2 meses de tratamiento.

\* $p < 0.05$

Cómo se puede observar en la **Figura 13** existió una disminución estadísticamente significativa en el área bajo la curva de insulina en los 3 tratamientos, siendo de 5334, 3240 y 3719 (mg/dL\*2 hr) para los grupos de genisteína, resveratrol y combinación respectivamente. El mayor cambio se observó en el grupo de la genisteína con una reducción de 32.4%.

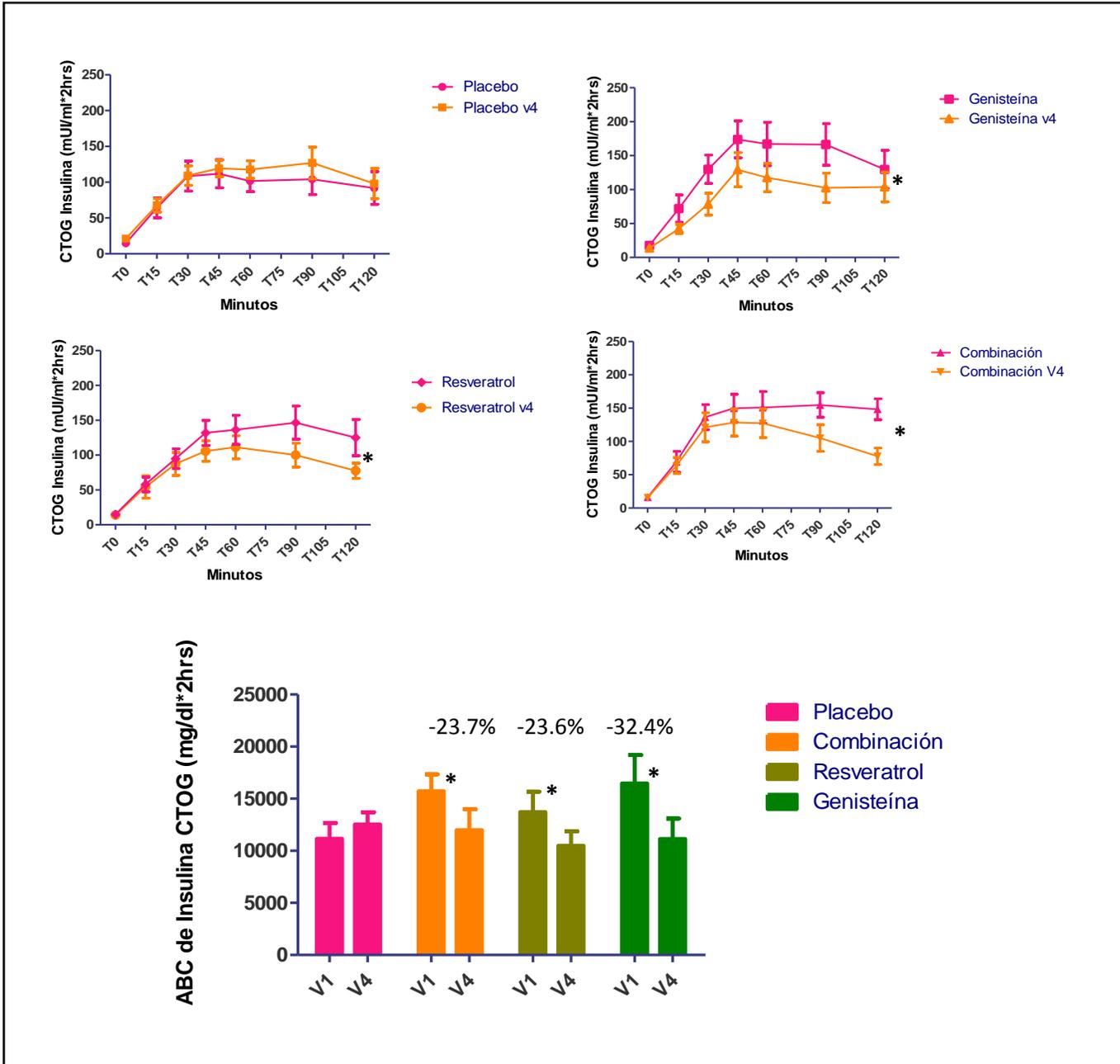


Figura 13 Comparación del área bajo la curva de insulina antes y después de 2 meses de tratamiento.

\* $p < 0.05$ .

## 8.2.- Resultados Objetivo 2: Parámetros antropométricos y bioquímicos.

Los 42 pacientes que terminaron quedaron agrupados de la siguiente manera: 10 en el grupo del placebo y de la combinación mientras que 11 tuvieron el grupo del resveratrol y el de la genisteína; en el grupo del placebo hubo cambios después del tratamiento con aumento en el porcentaje de masa muscular, una disminución en el porcentaje de masa grasa, lo que se acompañó de una disminución en el porcentaje de adiponectina. En el grupo de la genisteína se observó una disminución de peso, IMC, circunferencia de cintura, porcentaje de masa grasa y aumento en el porcentaje de masa muscular. En el grupo del resveratrol una disminución de circunferencia de cintura, porcentaje de masa grasa, presión arterial diastólica y de las aminotransferasas. ALTL y ASTL, pero hubo un aumento de porcentaje de masa muscular y de glucosa; en el grupo de la combinación se presentó una disminución de peso y del IMC como se muestra en la tabla 3.

Tabla 4: Comparación de parámetros antropométricos y bioquímicos antes y después del tratamiento.

	Visita 1	Visita 4	p
Peso (kg)			
• Placebo	87.6 ± 3.45	86.3 ± 3.54	0.11
• Genisteína	86.5 ± 4.28	84.6 ± 3.87	<b>0.03</b>
• Resveratrol	88.9 ± 2.56	87.7 ± 2.57	0.06
• Combinación	86.5 ± 4.16	84.7 ± 3.77	<b>0.05</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )			
• Placebo	34.9 ± 1.41	34.3 ± 1.38	0.12
• Genisteína	35.1 ± 1.40	34.4 ± 1.17	<b>0.04</b>
• Resveratrol	34.1 ± 1.04	33.6 ± 1.09	0.08
• Combinación	33.1 ± 1.11	32.5 ± 0.96	<b>0.05</b>
Circunferencia de Cintura (cm)			
• Placebo	99.9 ± 2.71	97.8 ± 2.84	0.46
• Genisteína	100 ± 2.78	97.6 ± 2.13	<b>0.05</b>
• Resveratrol	101 ± 2.16	98.8 ± 1.77	<b>0.01</b>
• Combinación	97.3 ± 2.18	96.4 ± 2.19	0.48
Masa muscular (%)			
• Placebo	55.8 ± 2.66	56.8 ± 2.76	<b>0.003</b>
• Genisteína	52.2 ± 1.59	53.2 ± 1.71	<b>0.04</b>
• Resveratrol	56.7 ± 2.51	57.9 ± 2.49	<b>0.02</b>
• Combinación	55.6 ± 1.69	56.5 ± 1.84	0.12
Masa grasa (%)			
• Placebo	44.2 ± 2.66	43.2 ± 2.76	<b>0.003</b>
• Genisteína	47.8 ± 1.59	46.8 ± 1.71	<b>0.037</b>
• Resveratrol	43.3 ± 2.51	42.1 ± 2.49	<b>0.02</b>
• Combinación	44.4 ± 1.69	43.5 ± 1.84	0.12

Tabla 3 continuación

	Visita 1	Visita 4	p
P.A.S.(mmHg)			
• Placebo	112 ± 4.09	109 ± 3.76	0.29
• Genisteína	108 ± 5.43	104 ± 4.32	0.50
• Resveratrol	113 ± 5.41	113 ± 5.55	0.86
• Combinación	107 ± 2.45	104 ± 2.16	0.11
P.A.D. (mmHg)			
• Placebo	75.0 ± 1.89	74.0 ± 1.88	0.60
• Genisteína	77.0 ± 4.28	74.0 ± 3.13	0.57
• Resveratrol	84.0 ± 3.19	77.0 ± 3.74	<b>0.05</b>
• Combinación	75.0 ± 2.16	74.3 ± 2.51	0.60
Glucosa (mg/dL)			
• Placebo	109 ± 5.32	109 ± 5.19	0.99
• Genisteína	100 ± 2.70	102 ± 3.07	0.42
• Resveratrol	102 ± 3.33	108 ± 3.61	<b>0.05</b>
• Combinación	102 ± 2.54	98.2 ± 2.55	0.29
Insulina (µUI/mL)			
• Placebo	16.1 ± 3.18	21.1 ± 2.96	0.11
• Genisteína	14.4 ± 2.22	13.5 ± 1.57	0.65
• Resveratrol	19.4 ± 2.75	14.0 ± 2.19	0.13
• Combinación	20.6 ± 2.22	15.8 ± 3.02	0.19
Colesterol (mg/dL)			
• Placebo	171 ± 9.88	170 ± 12.3	0.93
• Genisteína	211 ± 10.9	206 ± 14.4	0.72
• Resveratrol	167 ± 5.83	168 ± 7.97	0.84
• Combinación	199 ± 7.01	197 ± 8.99	0.78
HDL (mg/dL)			
• Placebo	38.7 ± 2.67	40.4 ± 3.04	0.33
• Genisteína	41.3 ± 2.78	41.5 ± 2.92	0.92
• Resveratrol	34.2 ± 2.30	35.4 ± 2.57	0.56
• Combinación	38.7 ± 2.62	36.8 ± 2.30	0.32
LDL (mg/dL)			
• Placebo	102 ± 8.02	98.6 ± 10.9	0.62
• Genisteína	135 ± 11.3	133 ± 13.6	0.83
• Resveratrol	101 ± 9.39	105 ± 8.25	0.35
• Combinación	125 ± 5.32	126 ± 11.7	0.91
Triglicéridos (mg/dL)			
• Placebo	163 ± 24.8	174 ± 27.9	0.41
• Genisteína	180 ± 17.6	187 ± 28.3	0.72
• Resveratrol	192 ± 34.9	139 ± 13.2	0.07
• Combinación	188 ± 30.1	170 ± 15.0	0.30
PCR			
• Placebo	7.69 ± 2.09	4.69 ± 1.11	0.15
• Genisteína	4.54 ± 0.93	3.07 ± 0.48	0.06
• Resveratrol	3.16 ± 1.00	4.13 ± 1.11	0.89
• Combinación	3.37 ± 0.84	2.85 ± 0.53	0.50

Tabla 3 continuación

	Visita 1	Visita 4	p
<b>ALTL (UI/L)</b>			
• Placebo	27.5 ± 2.58	24.0 ± 4.10	0.18
• Genisteína	34.5 ± 4.32	32.1 ± 4.58	0.51
• Resveratrol	27.4 ± 3.44	25.5 ± 4.13	<b>0.01</b>
• Combinación	29.5 ± 3.89	24.5 ± 1.99	0.13
<b>ASTL (UI/L)</b>			
• Placebo	25.3 ± 2.28	23.2 ± 3.17	0.17
• Genisteína	23.9 ± 2.46	23.1 ± 2.14	0.67
• Resveratrol	23.1 ± 1.85	21.6 ± 1.57	<b>0.03</b>
• Combinación	21.1 ± 1.63	21.0 ± 0.84	0.92
<b>Leptina (ng/mL)</b>			
• Placebo	34.3 ± 7.17	31.6 ± 6.34	0.96
• Genisteína	39.0 ± 6.33	28.7 ± 3.63	0.06
• Resveratrol	30.8 ± 7.22	27.1 ± 6.89	0.06
• Combinación	35.0 ± 5.77	30.2 ± 4.87	0.19
<b>Adiponectina (ng/mL)</b>			
• Placebo	16.5 ± 1.71	14.4 ± 1.66	<b>0.05</b>
• Genisteína	25.4 ± 3.80	25.5 ± 3.69	0.99
• Resveratrol	18.7 ± 1.38	17.0 ± 2.61	0.43
• Combinación	16.7 ± 4.07	15.6 ± 4.07	0.17

Los datos se presentan con media y error estándar.  
Se realizó prueba T para muestras relacionadas.

La disminución en el peso, la circunferencia de cintura y el porcentaje de masa grasa se observó de forma homogénea en el grupo de la genisteína, en cambio en el grupo de resveratrol sólo tuvo cambios en circunferencia cintura y el porcentaje de masa grasa, mientras que el grupo de la combinación sólo presentó una disminución en peso corporal como se observa en la **Figura 14**.

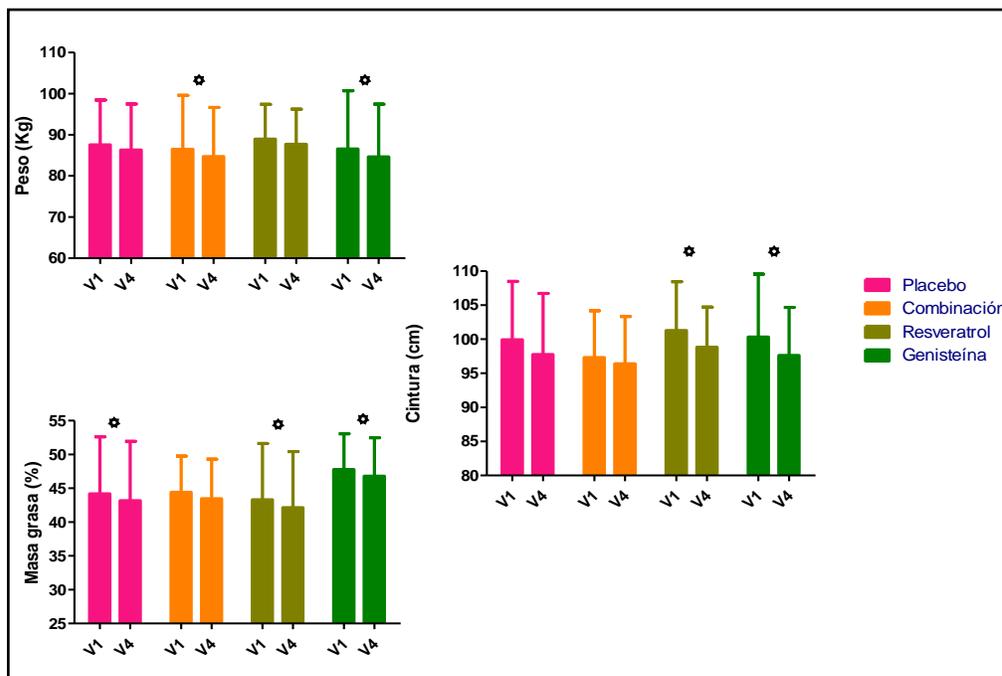
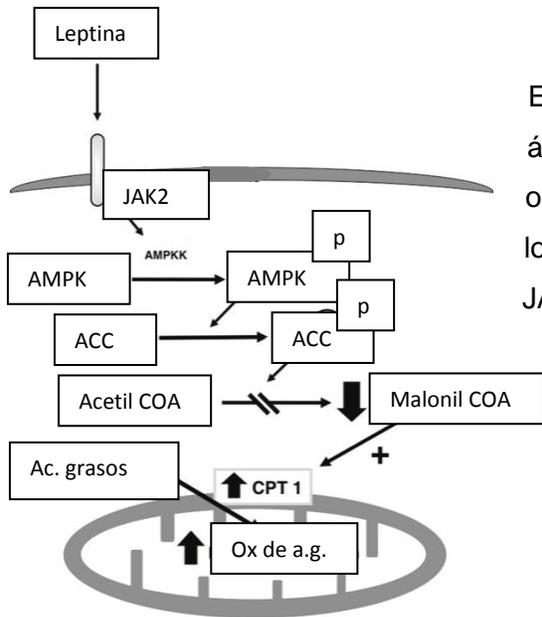


Figura 14 Cambios antropométricos después de 2 meses de intervención  
\*p<0.05. Se utilizó prueba T para muestras relacionadas

### 8.3.- Resultados Objetivos secundarios

#### 8.3.1.-Fosforilación AMPK, JAK, ACC y concentración PGC1 $\alpha$ .



En músculo, la leptina estimula la oxidación de los ácidos grasos al unirse a su receptor como se observa en la **Figura 15**; por lo que se evaluó si los compuestos bioactivos podrían estimular a JAK2 y este a su vez activar a AMPK, como ha sido reportado previamente por nuestro grupo, teniendo como consecuencia la fosforilación a ACC lo que conlleva a su inhibición.

Figura 15 Cascada de señalización de leptina

Se observó en el presente estudio que JAK2 fue estimulado de manera significativa por los tres grupos de tratamiento cómo se demuestra en la **Figura 16**, AMPK fue estimulado por el grupo de la combinación y el grupo de la genisteína evidenciado en la **Figura 17**; sin embargo a ACC no se encontró diferencia significativa en ninguno de los tres grupos de tratamiento tal y cómo se ve en la **Figura 18**.

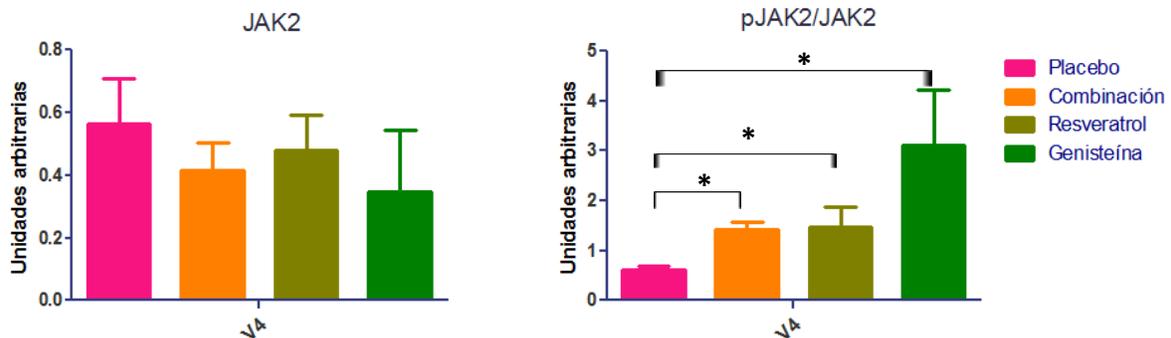


Figura 16. Concentración de JAK2, y relación entre Pjak2/JAK2  
\* $p < 0.05$  Se utilizó prueba U de Mann-Whitney

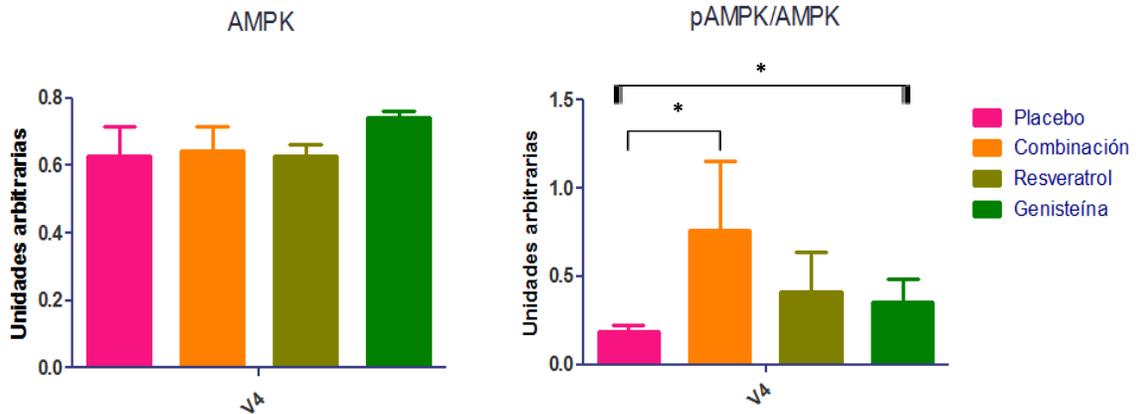


Figura 17 Concentración de AMPK y relación entre pAMPK/AMPK  
 \* $p < 0.05$  Se utilizó prueba U de Mann-Whitney

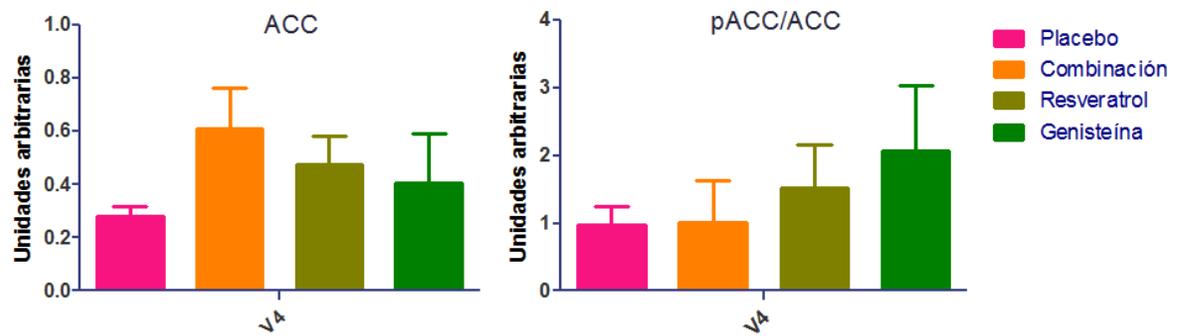


Figura 18 Concentración de ACC y relación entre pACC/ACC  
 \* $p < 0.05$  Se utilizó prueba U de Mann-Whitney

Así mismo se sabe que AMPK va a activar a PGC1 $\alpha$  estimulando la función y biogénesis mitocondrial por lo que se midió su concentración también en músculo esquelético. Se encontró que los tres grupos tuvieron diferencia significativa en la concentración de PGC1 $\alpha$  en comparación con el placebo. **Figura 19**

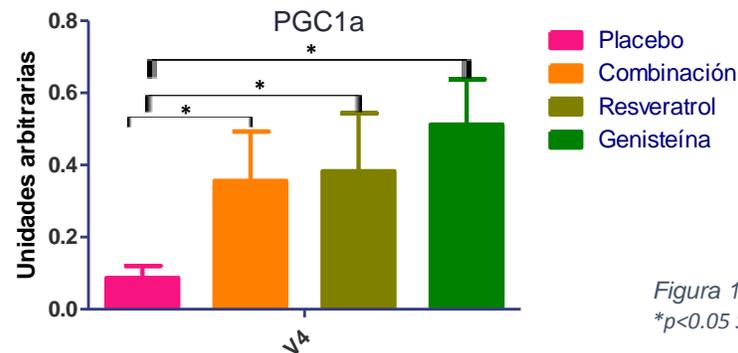
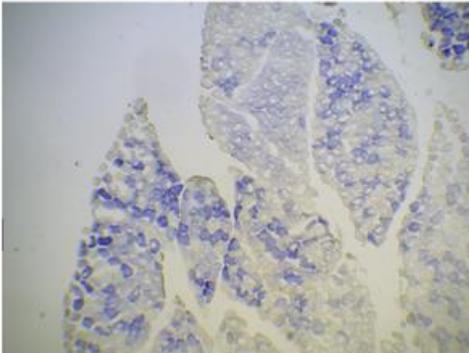


Figura 19 Concentración de PGC1 $\alpha$ .  
 \* $p < 0.05$  Se utilizó prueba U de Mann-Whitney

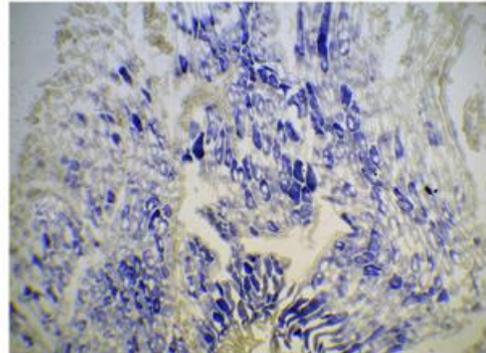
### 8.3.2.- Función mitocondrial.

Así mismo se determinó en la biopsia de músculo la actividad mitocondrial; para esto se realizó tinción de SDH, observando una mayor actividad en los grupos con algún compuesto bioactivo; Siendo el grupo de la genisteína el que presentó una mayor intensidad de coloración.

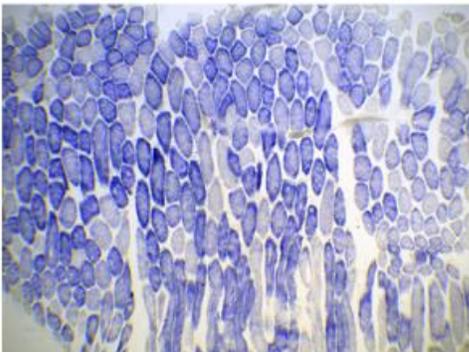
- Placebo



- Resveratrol



- Genisteína



- Combinación

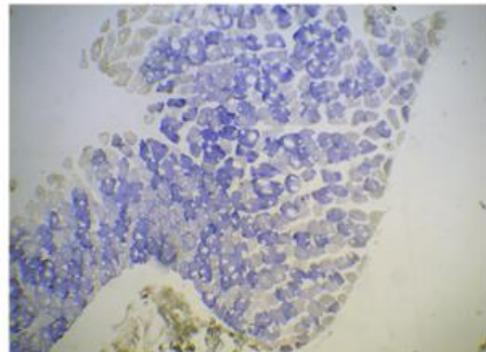


Figura 20 Tinción SDH en músculo esquelético

### 8.3.3.- Gasto energético basal y cociente respiratorio

De la calorimetría indirecta se evaluó si existió un cambio en el gasto energético y si el sustrato energético que se utiliza en reposo cambió al término del proyecto. En la **Figura 21** no se observaron cambios estadísticamente significativos en el gasto energético basal; de la misma manera en la **Figura 22** tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos en el cociente respiratorio en ninguno de los grupos.

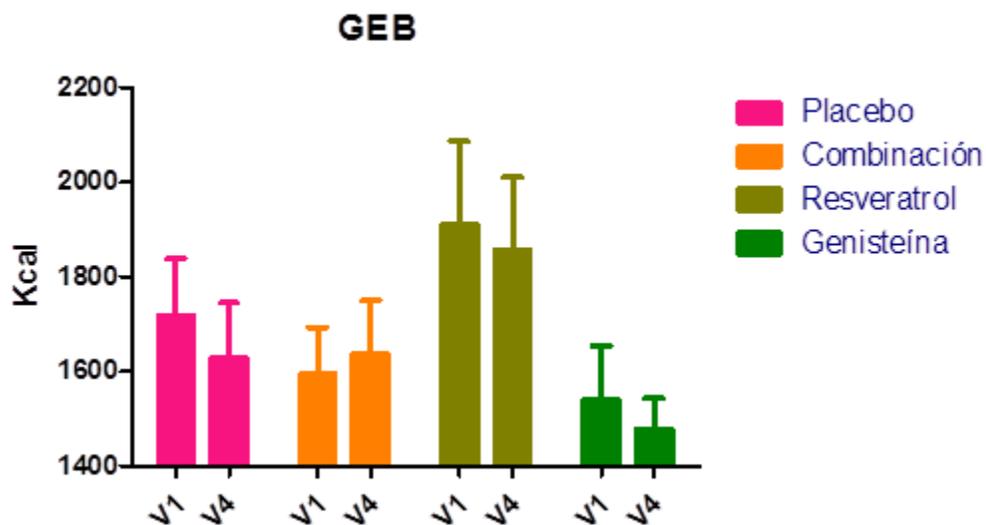


Figura 21 Gasto energético basal  $p < 0.05$  Prueba t para muestras independientes

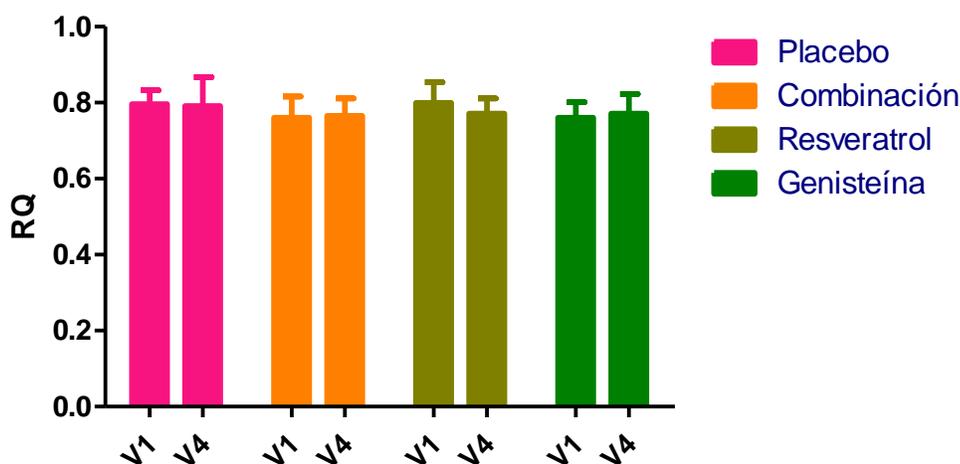


Figura 22 Cociente respiratorio  $p < 0.05$  Prueba t para muestras independientes

## 9.- Discusión

Como se mencionó previamente, el síndrome metabólico, es un conjunto de alteraciones que van a conferir a las personas un riesgo aumentado de padecer alguna enfermedad cardiovascular o diabetes tipo 2. En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración de resveratrol y genisteína sobre los componentes del síndrome metabólico, además de la resistencia a la insulina. Los resultados obtenidos se clasificaron en antropométricos, bioquímicos y moleculares.

En cuanto a los resultados antropométricos, se puede observar con la administración de resveratrol una disminución significativa en el porcentaje de masa grasa, así como en la circunferencia de cintura. Estos resultados concuerdan con evidencia previamente descrita que indican que con 500 mg de trans-resveratrol tres veces al día por 90 días, los pacientes en dichos estudios tuvieron una disminución significativa en el peso, la masa grasa y la circunferencia de cintura (30). Cabe mencionar que la dosis empleada en dichos estudios es 10 veces más alta que la utilizada en el presente trabajo, además de que el periodo de administración también fue mayor, por lo que el presente estudio sugiere que desde una dosis de 150 mg al día de resveratrol por, al menos, 2 meses se observan dichos cambios antropométricos.

Contrario a estos resultados, en el estudio de Timmers et al (34) no encontró diferencia significativa en el peso, a pesar de administrar también 150 mg al día de trans resveratrol, pero solamente por 30 días, lo que podría indicar que se requiere una administración por un periodo de, al menos, 2 meses para obtener cambios significativos en la composición corporal. Así mismo un estudio llevado a cabo por Poulsen et al (32) no encontraron diferencias significativas a pesar de administrar 500 mg al día de trans-resveratrol, pero a semejanza del estudio de Timmers et al (34), sólo se proporcionó el resveratrol por 1 mes. Es también importante mencionar que en este estudio se evaluó el efecto del resveratrol en una población sana, por lo que es difícil observar los efectos benéficos en este compuesto bioactivo. Por lo que el presente estudio y la evidencia observada en otros estudios indican que el efecto del resveratrol sobre el peso corporal se manifiesta en persona con resistencia a la insulina posiblemente asociada con la presencia de síndrome metabólico.

Adicionalmente, en un estudio llevado a cabo en mujeres delgadas o con sobrepeso a las cuales se les administró 75 mg al día de trans resveratrol durante 3 meses, no se demostró un cambio en la composición corporal, a diferencia de nuestro estudio y el de otros investigadores (43). Cabe mencionar que en ese estudio se utilizó una menor dosis, lo que implica que se requiere al menos un mínimo de 150 mg de resveratrol por día para modificar algunas de las variables antropométricas. Por lo que es importante para observar un efecto benéfico del resveratrol, consumir una dosis de al menos 150 mg/día durante al menos 2 meses para obtener un efecto positivo sobre la salud de personas con resistencia a la insulina (42).

Por otro lado, con el consumo del compuesto bioactivo genisteína se observó una disminución en el peso corporal, el IMC, la circunferencia de cintura y el porcentaje de masa

grasa. El presente contrasta con los resultados del grupo de Italia en donde no se encontraron diferencias significativas en el IMC después de la administración de 54 mg al día de genisteína durante 6, 12 o 24 meses, en mujeres postmenopáusicas con o sin síndrome metabólico, (43) (44) (45) (46).

Relacionado al grupo de la combinación se encontraron diferencias significativas en peso, IMC, pero no en el porcentaje de masa grasa, actualmente no existen estudios en los cuales se hayan evaluado los efectos de estos compuestos dados de manera conjunta; aun así, es importante señalar que los efectos de la genisteína y el resveratrol se siguieron observando, y esto podría indicar que no existe una inhibición entre uno u otro compuesto y que podrían ser administrados de forma conjunta.

En cuanto a los parámetros bioquímicos no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tres grupos, excepto por las enzimas hepáticas, las cuales disminuyeron en el grupo de resveratrol, aunque estos pacientes presentaban valores de estas enzimas dentro de rangos normales. Esto concuerda con estudios previos en donde se ha demostrado que el resveratrol no genera cambios en los parámetros bioquímicos, excepto por el trabajo de Timmers et al (34) en el cual se observó una disminución significativa en triglicéridos. Cabe mencionar que a pesar de que en el presente estudio no se alcanzó una diferencia significativa en los triglicéridos, se mostró una tendencia a disminuir estos valores de 192 a 139 mg/dL. Estudios futuros son necesarios para clarificar este efecto.

Por otro lado, existe evidencia de que el consumo de genisteína disminuye la concentración de colesterol total y leptina, y aumenta la concentración de adiponectina y colesterol HDL en mujeres post menopáusicas. Sin embargo en nuestro estudio no se observaron dichos cambios. Esto posiblemente se deba a que los efectos observados en estudios previos se detectaron después de 6 a 12 meses de consumo de la genisteína, mientras que el presente trabajo solo tuvo una duración de 2 meses (44) (45). Cabe el indicar que, con respecto al efecto de la genisteína sobre las concentraciones de leptina, existen 3 estudios dentro de los cuales en 1 se obtuvo un resultado favorable (34) y 2 no se vio cambio ni tendencia alguna (32) (43), por lo que más estudios son requeridos al respecto.

En cuanto a las concentraciones basales de glucosa e insulina no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos, excepto en el grupo de resveratrol, en donde hubo un aumento de 5 mg/dL al final del estudio. Es importante señalar que sólo el estudio llevado a cabo por Timmers et al (34), encontraron una mejoría en las concentraciones de glucosa

e insulina basales posterior a la suplementación de resveratrol. En cuanto a los estudios llevados a cabo con la genisteína, los cambios en la glucosa e insulina basales se observaron a partir de los 6 meses de tratamiento, sugiriendo que se requiere un consumo más prolongado para ver efectos sobre estos parámetros, sin embargo, más estudios son requeridos (43) (47) (46) (45).

Con respecto a la curva de tolerancia oral a la glucosa sólo se encontró una disminución en el área bajo la curva en el grupo de la combinación. Otros estudios han mostrado resultados contrastantes, como es el caso del estudio llevado a cabo por Méndez del Villar et al (30) donde no se encontraron efectos significativos después de la suplementación del resveratrol, mientras que el estudio de Crandall et al (49), se observó una mejoría en el área bajo la curva de glucosa cuando consumió el resveratrol junto con una comida, aunado la administración de una dosis entre 1 a 2 gramos.

En el presente trabajo, los resultados revelaron que el consumo de genisteína no modifico significativamente el área bajo la curva después de una curva de tolerancia a la glucosa. Este resultado está parcialmente en concordancia con el estudio de Villa et al (47) donde se evaluó la respuesta a las 4 horas de la ingestión de 75 g de glucosa, y encontraron que el área bajo la curva de glucosa solo mejoró en aquellos pacientes con una respuesta normoinsulinémica, en cambio los pacientes hiperinsulinémicos no mostraron cambio alguno. Cabe indicar que en el presente estudio la curva de tolerancia oral a la glucosa fue de 2 horas de acuerdo con lo señalado por la Asociación Americana de Diabetes (49), lo cual difiere del estudio de Villa (47).

A partir de la curva de tolerancia oral a la glucosa se obtuvieron también los valores de insulina, en los cuales se encontraron diferencias significativas en los 3 grupos de tratamiento. En cuanto al grupo del resveratrol, el único estudio que previamente había evaluado esta variable con las mismas condiciones fue el estudio de Méndez del Villar et al (30), y ellos encontraron una disminución en el área bajo la curva estadísticamente significativa comparada con el placebo. El grupo de Crandall et al (49), observó que posterior a la ingestión de una comida, también disminuyó en el área bajo la curva, por lo que los resultados de este estudio refuerzan la evidencia previamente obtenida.

Con respecto al grupo de la genisteína, los resultados están de acuerdo con los del grupo de Villa et al (47) que muestran una disminución significativa del área bajo la curva de insulina en pacientes hiperinsulinémicos.

Así como los compuestos bioactivos mejoraron el área bajo la curva de insulina por separado, también lo hicieron en la combinación. Con los resultados obtenidos, es posible determinar que el resveratrol y/o la genisteína mejoran la respuesta corporal ante una carga de glucosa y para mantener las concentraciones de glucosa, lo que sugiere que pueden mejorar la sensibilidad a la insulina.

En cuanto a la biopsia de músculo se encontraron diferencias significativas en la relación de pJAK2/JAK2 para todos los grupos de tratamiento y en la relación de pAMPK/AMPK para los grupos de combinación y genisteína, esto se relaciona con los resultados obtenidos sobre el área bajo la curva de glucosa e insulina, ya que como se mencionó al inicio, estos compuestos bioactivos tienen la capacidad de activar la vía de señalización de AMPK y por lo tanto inhiben la síntesis de ácidos grasos, teniendo como resultado una mejoría en la sensibilidad a la insulina.

En cuanto a estos resultados, se han llevado a cabo estudios en los cuales han evaluado la cantidad de estas proteínas, en el estudio de Timmers et al (34) encontraron un aumento en las concentraciones de pAMPK y PGC1a en el grupo del resveratrol en comparación del placebo, aunque es importante señalar que no hubo diferencia significativa, así mismo el estudio de Yoshino et al (43), tampoco encontraron diferencias significativas aunque si una tendencia a aumentar pAMPK en el grupo de resveratrol, sin embargo el grupo de Peng Goh (31) sí encontró diferencia significativa en la relación pAMPK/AMPK, aunque el tipo de población era diabética. Otro factor para tomar en cuenta es que los estudios en músculo se han llevado a cabo con una muestra pequeña, por lo que si se aumentará el número de pacientes probablemente se podrían observar los cambios esperados.

Por otro lado los resultados que se obtuvieron a partir de la tinción de SDH muestran que los compuestos bioactivos generan un aumento en PGC1a el cual está relacionado con la biogénesis mitocondrial, sobre estos valores, en el presente trabajo, los tres grupos con compuesto bioactivo mostraron cambios significativos; a nuestro conocimiento, este estudio es el primero en evaluar dicha tinción posterior a la suplementación de estos compuestos bioactivos por lo que dichos resultados apoyan los obtenidos tanto en parámetros antropométricos como bioquímicos.

Finalmente en cuanto a los resultados de la calorimetría indirecta no se observó modificación alguna, aunque los grupos de placebo, resveratrol y genisteína tuvieron una tendencia de disminuir, por otro lado, el grupo de la combinación mostró una tendencia a

aumentar el gasto energético, pero, sin alcanzar significancia estadística. En concordancia con el presente trabajo, los estudios llevados a cabo por Poulsen et al (32), Timmers et al (34) y Yoshino et al (43) tampoco encontraron diferencias significativas lo cual sugiere que, a pesar de activar estas proteínas, el efecto sobre el gasto energético, no es plausible de obtener. Solo el estudio por Peng et al (31), encontró efecto en el consumo de oxígeno aunque, como ya se mencionó, los sujetos eran diabéticos.

## 10.- Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la suplementación con estos compuestos bioactivos tienen efectos positivos tanto en parámetros antropométricos, bioquímicos y moleculares tal como se observa en la **Figura 23**, pero dichos cambios, sólo se notarán cuando las personas presenten síndrome metabólico y resistencia a la insulina. Así mismo es importante destacar que los resultados obtenidos en estudios previos, con estos compuestos bioactivos, sugieren que sus efectos dependerán de la dosis y el tiempo durante el cual sean administrados, siendo eficaz en el presente estudio, una dosis de 150 mg de resveratrol al día y/o 50 mg de genisteína al día por al menos dos meses

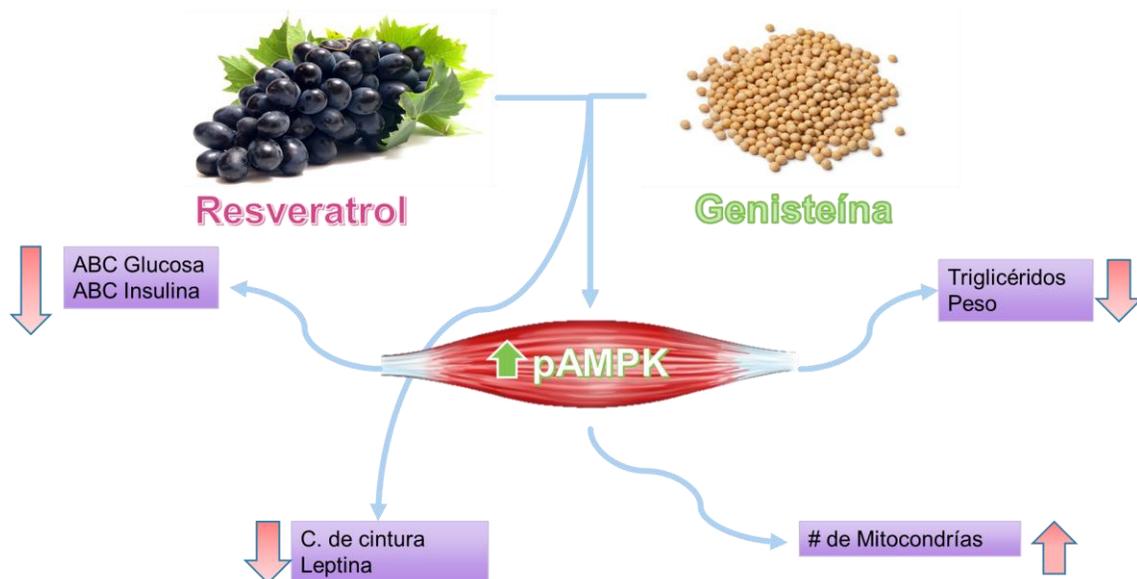


Figura 23 Efectos de los compuestos bioactivos genisteína y resveratrol sobre parámetros antropométricos, bioquímicos y moleculares.

## 11.- Referencias

1. Grundy S, Brewer B, Cleeman J, Smith S, Lenfant C. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation American Heart Association*. 2004;(109): p. 433-438.
2. Alberti K, Eckel R, Grundy S, Zimmet P, Cleeman J, Donato K, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2009 October;; p. 1640-1645.
3. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. [Online].; 2012 [cited 2014 06 08. Available from: <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ConsumoAlcohol.pdf>.
4. Lyons C, Kennedy E, Roche H. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*. 2016; 8(247).
5. B. Castro AV, M. Kolka C, Bergman R. Obesity, insulin resistance and comorbidities- Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014 Agosto; 58(6): p. 600-609.
6. Muoio D, Newgard C. Obesity-Related Derangements in Metabolic Regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 2006 Julio; 75: p. 367-401.
7. Koyama K, Chen GLYUR. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *American Journey of Phisiology*. 1997;(273): p. 708-713.
8. Saltiel A, Kahn R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Diciembre; 414: p. 799-806.
9. Torres N, Tovar A. The Role of Dietary Protein on Lipotoxicity. *Nutritions Reviews*. 2007 Junio; 65(6): p. S64-S68.
10. Wende A, Symons D, Abel D. Mechanisms of Lipotoxicity in the Cardiovascular System. *Curr Hypertens Rep*. 2012 Octubre; 14: p. 517-531.
11. Galgani J, Moro C, Ravussinn E. Metabolic flexibility and insulin resistance. 2008 Septiembre 02; 295(5): p. E1009-E1017.
12. Moreira E, Girard V, Barcellos R. Indirect calorimetry: methodology, instruments, and clinical application. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2006; 9: p. 247-256.
13. TRAINER. Elcociente respiratorio QR. [Online].; 2017 [cited 2017 06 21. Available from: <http://trainer-sp.mednews.in.ua/fisiologia/31397-el-cociente-respiratorio-qr.html>.

14. Park HK, Ahima R. Leptin signaling. *F1000Prime Reports*. 2014; 6(73).
15. Zhou Y, Rui L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front Med*. 2013 June; 7(2): p. 207-222.
16. St-Pierre J, Trembay M. Modulation of Leptin Resistance by Protein Tyrosine Phosphatases. *Cell metabolism*. 2012 Marzo; 15: p. 292-297.
17. Wang S, Moustaid-Moussa NCLMH, Shastri A, Su R, Bapat P, Kwun I, et al. Novel Insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem*. 2014 Enero; 25(1): p. 1-18.
18. Contreras A, Torres N, Tovar A. PPAR- $\alpha$  as a key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. *Advances of Nutrition*. 2013; 4: p. 439-452.
19. PPARs TMOAO. Berger, Joel; Moller, David. *Annu Rev Med*. 2002; 53: p. 409-435.
20. disorders Pamm-ecariaan. Austin, Shane, St-Pierre, Julie. *Journal of Cell Science*. 2012; 125: p. 4963-4971.
21. Ruderman N, Carling D, Prentki M, Cacicedo J. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013 Julio; 123(7): p. 2764-2772.
22. Martin T, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn B. Diet-induced Obesity Alters AMP Kinase Activity in Hypothalamus and Skeletal Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Julio; 281(28): p. 18933-18941.
23. Steinberg G, Parolin M, Heigenhauser G, Dyck D. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Marzo; 283: p. E187-E192.
24. National Cholesterol Education Program. ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference. Public Health Service. 2001;(01-3305).
25. Feldeisen S, Tucker K. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2007; 32: p. 46-60.
26. National Institute of Health. Your guide to lowering your blood pressure with DASH. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. 2006;(06-4082).
27. Secretaria de Salud. Plato del bien comer. NOM-043-SSA2-2005. 2005.
28. Behloul N, Wu G. Genistein: A Promising Therapeutic Agent for Obesity and Diabetes Treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 698: p. 31-38.

29. Palacios B, Zarain A, Flores I, Noriega L, Alemán G, Zariñán TUA, et al. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1841(1): p. 132-140.
30. Méndez del Villar M, Ortiz M, Abundís E, Rubio K, Valdez R. Effect of Resveratrol Administration on Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity, and Insulin Secretion. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2014; X(X): p. 1-5.
31. Peng Goh K, Hwei Yee L, Pingxi Lau D, Supaat W, Huak Chan Y, Fang Yung A. Effects of Resveratrol in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus on Skeletal Muscle SIRT1 Expression and Energy Expenditure. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2014; 24: p. 2-13.
32. Poulsen M, Vestergaard P, Clasen B, Radko Y, Christensen L, Stodkilde H, et al. High-dose Resveratrol Supplementation in Obese Men. *Diabetes*. 2013 April; 62: p. 1186-1195.
33. Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009 April; 20(2): p. 98-105.
34. Timmers S, Koning E, Bilet L, Houtkooper R, Weijer T, Goossens G, et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of Resveratrol (resVida™) supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*. 2011 Noviembre; 2(14).
35. International Standards for Anthropometric Assessment. Basic Measurements. International Society for the Advancement of Kinanthropometry. .
36. InBody. FAQs. [Online].; 2017 [cited 2017 Marzo 12. Available from: <https://www.inbody.com/eng/customer/faq.aspx>.
37. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. [Online].; 2016 [cited 2017 06 17. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
38. Valenzuela M. Métodos Numéricos (SC-854). [Online].; 2008 [cited 2017 07 12. Available from: <http://www.mty.itesm.mx/dtie/deptos/cb/cb00854-1/apuntes/integracion.pdf>.
39. ROCHE. Analizador COBAS c111. [Online].; 2012 [cited 2017 Mayo 05. Available from: [http://qa.cobas-roche.com.ar/home/productos\\_servicios/analizador\\_cobas\\_c\\_111.html](http://qa.cobas-roche.com.ar/home/productos_servicios/analizador_cobas_c_111.html).
40. ALPCO. Products. [Online].; 2017 [cited 2017 Mayo 10. Available from: <https://www.alpco.com/store/application.html>.

41. Fernández P. Determinación del tamaño muestral. [Online].; 2001 [cited 2017 06 18. Available from: [http://navarrof.orgfree.com/Docencia/MatematicasIII/M3UT8/tamano\\_muestral2.pdf](http://navarrof.orgfree.com/Docencia/MatematicasIII/M3UT8/tamano_muestral2.pdf).
42. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai Si, Schechtman K, et al. Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in non-obese women with normal glucose tolerance. *Cell Metabolism*. 2012 November 7; 16(5): p. 658-664.
43. Crisafulli A, Altavilla D, Marini H, Bitto A, Cucinotta D, Frisina N, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *The Journal Of The North American Menopause Society*. 2005 March 04; 12(2): p. 186-192.
44. Irace C, Marini H, Bitto A, Altavilla D, Polito F, Adamo E, et al. Genistein and endothelial function in postmenopausal women with metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*. 2013; 43(10): p. 1025-1031.
45. Squadrito F, Marini H, Bitto A, Altavilla D, Polito F, Bianca E, et al. Genistein in the Metabolic Syndrome: Results of a Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Agosto; 98(8): p. 3366-3374.
46. Villa P, Cotantini B, Suriano R, Perri C, Macri F, Ricciardi L, et al. The Differential effect of the phytoestrogen Genistein on Cardiovascular Risk Factors in Postmenopausal Women: Relationship with the Metabolic Status. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2009 February; 94(2): p. 552-558.
47. Atteriano M, Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, et al. Effects of the phytoestrogen Genistein on Some Predictors of Cardiovascular Risk in Osteopenic, Postmenopausal Women: A Two-Year Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92(8): p. 3068-3075.
48. Crandall J, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. Pilot Study of Resveratrol in Older Adults with Impaired Glucose Tolerance. *Journals of Gerontology. Medical Sciences*. 2012 December; 67(12): p. 1307-1312.
49. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 January; 38(1).
50. Handschin C, Spiegelman B. The role of exercise and PGC1a in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008 July 24; 454(7203): p. 463-469.
51. Shulman G. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000 July; 106(2).