



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la
genisteína sobre la termogénesis y la tolerancia a la glucosa: el papel de GPR30
en el tejido adiposo y músculo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MC Saraí Vásquez Reyes

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adolfo García Sainz IFC
Dr. Alfredo Ulloa y Aguirre RAI, INCMNSZ-UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. José Pedraza Chaverri.

VOCAL: Dr. Samuel Canizales Quinteros.

VOCAL: Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor.

VOCAL: Dr. David Ricardo Orozco Solís.

SECRETARIO: Dra. Elizabeth Lorreine James Hoy.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Departamento de Fisiología de la Nutrición.

TUTOR:

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, INCMNSZ.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Jesús Adolfo García Sainz.

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, RAI-INCMNSZ, UNAM.

SUSTENTANTE:

M en C. Saraí Vásquez Reyes

Capítulo 1

Agradecimientos

A mi abuelo: Por que, a pesar de no entender y no tener la oportunidad de ver el final de este camino, tu contribuiste a ponerme en el.

A todas las personas cercanas a mí que saben que me han ayudado, tolerado, que me han escuchado, aconsejado, ya sea en persona o en la distancia les agradezco lo que han hecho por mí, sin ustedes las cosas no serían como hoy.

A el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por haberme brindado el apoyo para la presentación de parte de este trabajo en el congreso internacional de la Sociedad Americana de Nutrición (ASN).

A CONACYT por brindarme un apoyo invaluable sin el cual, nada de esto hubiera sucedido.

Capítulo 2

Abreviaturas

ABC: Área bajo la curva.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

AMPK: Cinasa dependiente de AMP.

ATP: Adenosín trifosfato.

CEV: Células de estroma vascular.

cDNA: Acido desoxiribonucleico complementario.

CIDEA: Proteína de la muerte celular DFFA efector A.

CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1.

CREB1: Proteína 1 de unión al elemento de respuesta de AMPc.

DAGS: Dieta alta en grasa y sacarosa.

DMEMF12: Medio de Eagle modificado de Dulbecco-medio F12 de Ham.

DT2: Diabetes tipo 2.

ERs: Receptores de estrógenos.

ER β : receptor de estrógenos β .

E2: Estradiol.

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona.

FGF21: Factor de crecimiento fibroblástico 21.

FVE: Fracción vascular estromal.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GE: Gasto energético.

GPR30/GPER1: Receptor acoplado a proteína G 30/ Receptor de estrógenos acoplado a proteína G 1.

HS: Suero de caballo.

IBMX: 3-isobutil 1-metilxantina.

KD: Knock down (expresión reducida).

NE: Norepinefrina.

MG: Masa grasa.

mRNA: Acido ribonucleico mensajero.

NO: Óxido Nítrico.

OCR: Tasa de consumo de oxígeno (medido en ensayos *in vitro*).

pAMPK: Cinasa dependiente de AMP fosforilada.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PET/TC: Tomografía por emisión de positrones.

PGC1 α : Coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa 1.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

SFB: Suero fetal bovino.

SNS: Sistema nervioso simpático.

TAB: Tejido adiposo blanco.

TABe: Tejido adiposo beige.

TABi: Tejido adiposo blanco inguinal.

TAP: Tejido adiposo pardo.

TMEM26: Proteína transmembranal 26.

UCP1: Proteína desacoplante 1.

UCP3: Proteína desacoplante 3.

VO₂: Consumo de oxígeno (medido en ensayos *in vivo*)

Índice general

1. Agradecimientos	2
2. Abreviaturas	3
3. Resumen	15
4. Introducción	17
5. Marco teórico	19
5.1. Balance energético.	19
5.2. El tejido adiposo como órgano termogénico.	20
5.3. Beiging y termogénesis adaptativa.	23
5.4. Genisteína, compuesto dietario que activa la termogénesis.	25
5.5. Efecto de la genisteína en el músculo esquelético.	28
5.6. GPR30 como posible mediador de efectos metabólicos de la genisteína.	30
6. Hipótesis	34
7. Objetivo General	35
8. Objetivos específicos	36
8.1. Objetivos sistémicos:	36
8.2. Objetivos sobre el TABi y TAP:	36
8.3. Objetivos sobre el músculo esquelético:	37

9. Materiales y Métodos	38
9.1. <i>In vivo</i>	38
9.1.1. Mantenimiento y cuidado de los animales de bioterio.	38
9.1.2. Determinación de la composición corporal en los ratones con distintas dietas.	39
9.1.3. Estudio de la curva de tolerancia a la glucosa.	40
9.1.4. Calorimetría Indirecta.	40
9.1.5. Medición de parámetros en suero.	40
9.1.6. Análisis de contenido de proteína mediante Western blot.	41
9.2. <i>In vitro y Ex vivo</i>	43
9.2.1. Cultivo celular.	43
9.2.2. Medición del estatus bioenergético celular (respirometría).	45
9.2.3. Tinción de Bodipy y cálculo del número de adipocitos.	46
9.2.4. Diseño y elaboración de las construcción de shRNA mediante un vector de lentivirus.	47
9.2.5. Obtención de la línea celular knock down estable para el gen GPR30	49
9.2.6. Extracción de RNA y cuantificación relativa.	50
9.2.7. Análisis de contenido de proteína mediante Western blot.	51
9.3. Análisis estadístico.	52
10. Diseño Experimental	53
10.1. Diseño experimental <i>in vivo</i>	53
10.2. Diseños experimentales <i>in vitro y ex vivo</i>	54
11. Resultados	56
11.1. Evaluación del efecto de la genisteína sobre la ganancia de peso, compo- sición corporal, y parámetros bioquímicos en ratones macho GPR30 ^{+/+} y ratones GPR30 ^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.	56

11.2. Evaluación del efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno en ratones macho GPR30 ^{+/+} y ratones GPR30 ^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.	60
11.3. Determinación del efecto de la genisteína sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho GPR30 ^{+/+} y ratones GPR30 ^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.	64
11.4. Evaluación del efecto de la genisteína en el estatus bioenergético en adipocitos blancos en ausencia y presencia de GPR30.	65
11.5. Determinación de la abundancia de marcadores asociados a la termogénesis en TAS y TAP en ratones macho GPR30 ^{+/+} y ratones GPR30 ^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.	69
11.6. Evaluar el efecto de la genisteína sobre la fosforilación de AMPK en ratones macho GPR30 ^{+/+} y ratones GPR30 ^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS.	73
11.7. Evaluación de la fosforilación de AMPK en modelos <i>in vitro</i> de músculo esquelético GPR30 Knock down y en un modelo <i>ex vivo</i> en presencia y ausencia de GPR30.	74
12. Discusión	78
13. Conclusiones	83

Índice de figuras

5.1. Imágenes representativa de la PET/TC y la captación de glucosa de un sujeto (A), actividad del TAP (B) e índice de matsuda (C) de diferentes individuos expuestos a distintos periodos de temperaturas. Los datos estan espresados ne promedio \pm SD, $a = P < 0.05$ comparado con el mes 1(24°C). Tomado de [1]	22
5.2. Imágenes de la PET/TC y la captación de glucosa (A), número de calorías gastadas al día en respuesta a una exposición al frío (B) y cantidad de calorías gastadas al día en respuesta al consumo de cap-sinoides (C) por 6 semanas en diferentes individuos. CIT:incrementos de energía inducidos por frío. Los datos se presentan como promedio +SEM donde *P<0.05; **P<0.01.Tomado de [2]	22
5.3. Tipos de adipocitos (tejido adiposo) y el proceso de beiging, Proteina desacoplante 1 (UCP1), factor de crecimiento fibroblastico 21 (FGF21), imagen basada en [3]	24
5.4. Efecto de la genisteína en el peso (A), consumo de VO_2 (B), tolerancia a la glucosa (C-D) y contenido de proteína de genes relacionados a la termogénesis (E) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Dieta alta en grasa (HF), dieta alta en grasa más genisteína (HFG). Los datos son expresados en promedio \pm SD, las diferencias se indican con letras donde $a > b > c$. Tomado de [4].	26

- 5.5. Efecto de la genisteína en animales alimentados con una dieta control: expresión de genes y contenido de proteína de marcadores termogénicos en el tejido adiposo blanco y pardo (A). Efecto de la genisteína en la expresión de genes termogénicos (B), contenido de proteína de marcadores termogénicos (C), y en la respiración máxima y capacidad de reserva celular (D) en adipocitos de CEV. Tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo pardo (TAP). Los datos son presentados con promedio \pm SEM donde $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $a > b > c > d$, $p < 0.05$. Tomado de [5] 27
- 5.6. Efecto de la genisteína en el peso (A), la expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos (B), la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético (C) y el consumo de VO_2 (D) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa con o sin genisteína, dieta alta en grasa (HF), dieta alta en grasa y genisteína (HF+G). Los datos son presentados con promedio \pm SEM donde $*p < 0.05$. Tomado de [6] . . . 29
- 5.7. Efecto de la ausencia de GPR30 en las concentraciones de glucosa (A), insulina (B) y la resistencia a la insulina (C) en ratones macho silvestres (WT) y deficientes de GPR30 (KO). Los datos están expresados en promedio \pm SEM. Tomado de [7]. Secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratones WT y GPR30 KO estimulados con: 11 mM de glucosa, estrógenos (E2) y el agonista de GPR30 G-1 a 100nM (1h), en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con el antagonista de GPR30 G15 a 1μ M (1h) (D), también se utilizó 2 mM y 25 mM de glucosa. Los datos están expresados en promedio \pm SEM donde $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ # $p < 0.05$ con respecto a E2 o G-1. Tomado de [8] 31

5.8. GPR30 media los efectos de la genisteína sobre c-fos en células de cáncer de mama negativas para ERs transfectadas con codón con control (+Cs - ODN), y un codón antisentido para GPR30 (+GPR30/AS - ODN), estimulados con estrógenos (E2), genisteína (G), quercetina (Q). Los datos están expresados en promedio \pm SD donde $\blacksquare p < 0.05$ Tomado de [9]	32
5.9. Incremento en la fosforilación de CREB1 en células INS1 (A) e islotes pancreáticos humanos (B). Disminución de la fosforilación de CREB1 por efecto de la genisteína en islotes páncreas de ratones GPR30 ^{+/+} (WT) y GPR30 ^{-/-} (KO) (C). Genisteína (G). Los datos están expresados en promedio \pm SEM donde * $p < 0.05$. Tomado de [10]	33
9.1. Mapa del plásmido pLentiLox 3.7. Obtenido de addgene	48
10.1. Diseño experimental del modelo <i>in vivo</i> en ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} , 53	
10.2. Diseño experimental de la respirometría en adipocitos de CEV TABi de ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} estimulados con genisteína. n=5/7 por grupo.	54
10.3. Diseño experimental sobre el desarrollo de una línea celular estable de miotúbulos C2C12 GPR30 KD.	54
10.4. Diseño experimental sobre el cultivo primario de miotubulos GPR30 ^{+/+} , y GPR30 ^{-/-}	55
11.1. Ganancia de peso (AyC) y consumo calórico en ratones (ByD) en ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} alimentados con dieta AIN-93 y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c > d$ indican las diferencias entre grupos. n=7/8 por grupo.	57

- 11.2. Porcentaje de masa grasa (AyC) y de masa magra (ByD) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con dieta AIN-93 y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. n=7/8 por grupo. 58
- 11.3. Parámetros bioquímicos, insulina (A), glucosa (B), triglicéridos (C) y Colesterol (D) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con dieta control con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. n=7/8 por grupo. n=7/8 por grupo. 59
- 11.4. Parámetros bioquímicos, insulina (A), glucosa (B), triglicéridos (C) y Colesterol (D) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. n=7/8 por grupo.n=7/8 por grupo. 60
- 11.5. Efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno (arriba) y el GE (abajo) en relación con el cambio de peso corporal en ratones GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS, dieta control (A) dieta control más genisteína (A+G), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS+G), círculos llenos corresponden a ratones GPR30^{+/+}, círculos vacíos a ratones GPR30^{-/-}. n=5/8 por grupo. 62
- 11.6. Efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno (arriba) y el GE (abajo) en relación con el cambio en la masa grasa en ratones GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS, dieta control (A) dieta control más genisteína (A+G), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS+G), círculos llenos corresponden a ratones GPR30^{+/+}, círculos vacíos a ratones GPR30^{-/-}. n=5/8 por grupo. 63

- 11.7. Curva de tolerancia a la glucosa (A,B,D,E) y área bajo la curva (C,F) de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.0001$. n=7/8 por grupo. 65
- 11.8. Adipocitos de CEV de TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} teñidos con Bodipy, tratados con y sin genisteína. n=5/7 por grupo. 66
- 11.9. Número de adipocitos (A) y efecto de la genisteína en la de diferenciación (B) de adipocitos de CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c > d$ indican las diferencias entre grupos $****p < 0.0001$. n=5/7 por grupo. 67
- 11.10Curso temporal del ensayo de mito-estrés (derecha) respiración no mitocondrial y capacidad de reserva (izquierda) de adipocitos del CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos, n=5/7 por grupo. 68
- 11.11Respiración basal (A), Respiración no-mitocondrial (B), Fuga de protones (C) y respiración relacionada a la producción de ATP de adipocitos del CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos n=5/7 por grupo. 68
- 11.12Blot representativo del TABi de las proteínas UCP1, *PGC1 α* , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} con dieta control y DAGS con y sin genisteína. n=4 por grupo. 69
- 11.13Análisis densitométrico de UCP1, *PGC1 α* , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, n=4 por grupo. 70

11.14	Blot representativo del TAP de las proteínas UCP1, <i>PGC1α</i> , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TAP de ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} con dieta control y DAGS con y sin genisteína. n=4 por grupo.	71
11.15	Análisis densitométrico de UCP1 <i>PGC1α</i> , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TAP de ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, n=4 por grupo.	72
11.16	Blot representativo de AMPK y pAMPK de músculo esquelético de ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, n=4/5 por grupo.	73
11.17	Gel de agarosa, después de una restricción para comprobar el inserto en las clonas obtenidas. Clona de shRNA 3 (derecha), clona del shRNA 4 (izquierda).	74
11.18	Alineamiento de las clonas secuenciadas y los insertos para shRNA 3 y shRNA 4.	75
11.19	Expresión y abundancia protéica de GPR30 en mioblastos C2C12 transducidos con el control y con el shGPR30 3. n=3/4 por grupo. Los asteriscos indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$	76
11.20	Blot de la fosforilación de AMPK en mioblastos C2C12 control y GPR30 KD en presencia de genisteína. n=3 por grupo. Las letras indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$	77
11.21	Blot de la fosforilación de AMPK en mioblastos de cultivo primario de ratones GPR30 ^{+/+} y GPR30 ^{-/-} estimulados con genisteína. n=3 por grupo. Las letras indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$	77
13.1.	Efecto de la genisteína sobre el tejido adiposo y músculo esquelético en presencia y ausencia de GPR30	84

Índice de tablas

9.1. Composición de las diferentes dietas, control (AIN-93) y dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS) con y sin genistéina.	39
9.2. Lista de anticuerpos primarios usados en inmunoblots de muestras de tejidos.	42
9.3. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunoblots de muestras de tejidos.	42
9.4. Secuencias de Oligonucleotidos para realizar qPCR.	51
9.5. Lista de anticuerpos primarios usados en inmunoblots de muestras obtenidas de células.	52
9.6. Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunoblots muestras obtenidas de células.	52

Capítulo 3

Resumen

La activación de la termogénesis y la inducción del beiging en el tejido adiposo puede contribuir a la disminución de las complicaciones de enfermedades metabólicas, así como de las patologías asociadas con la obesidad. Es por esto que existe un interés por encontrar compuestos bioactivos que promuevan tales efectos benéficos. Se ha observado que la genisteína, una isoflavona de la soya, incrementa el beiging y la termogénesis en el tejido adiposo blanco inguinal, principalmente en modelos animales. Este incremento está acompañado de un aumento en la tolerancia a la glucosa y la disminución de la masa grasa, tanto en modelos alimentados con una dieta control como en modelos de obesidad inducida por dieta. También se ha reportado que la genisteína incrementa los marcadores de beiging y mejora la actividad mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se activa el programa termogénico no ha sido completamente esclarecido. En este trabajo se evaluó el papel del receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) como mediador de los efectos de la genisteína en el tejido adiposo y el músculo esquelético. Se observó que la ausencia de GPR30 altera el efecto de la genisteína sobre el gasto energético y el consumo de O_2 (VO_2) en el tejido adiposo. De igual manera se encontró que en adipocitos que no expresan GPR30, el efecto en el incremento de la respiración máxima y la capacidad de reserva mitocondrial se pierde en presencia de la genisteína. Esto concuerda con lo observado en el tejido adiposo blanco inguinal (TABi) y tejido adiposo pardo (TAP), en donde la abundancia protéica de marcadores de beiging y termogénesis en animales

GPR30^{-/-} alimentados con genisteína está disminuida en comparación con animales que sí expresan GPR30 y que consumieron genisteína. Con respecto al efecto de la genisteína en la tolerancia a la glucosa se observó que en los ratones deficientes de GPR30, la genisteína fue incapaz de mejorar esta respuesta, efecto que sí se observa en los ratones GPR30^{+/+} alimentados con genisteína. Esto puede estar relacionado con la respuesta en el músculo esquelético, donde se observó que la genisteína incrementa la fosforilación de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) solo en ratones GPR30^{+/+}. Este mismo resultado se obtuvo en modelos *in vitro* tanto en la línea celular de miotúbulos C2C12 GPR30 knock down (KD) como en cultivo de miotúbulos primarios GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}. Existen otros efectos de la genisteína tanto a nivel sistémico como en el tejido adiposo blanco que no se modifican en ausencia de GPR30, tales como la ganancia de peso y de masa grasa así como el incremento en la respiración relacionada a la producción de adenosín trifosfato (ATP). En este trabajo se observó que GPR30 juega un papel parcial en los efectos de la genisteína sobre el incremento de la termogénesis y la tolerancia a la glucosa, indicando que no todos los efectos de la genisteína involucran a GPR30.

Capítulo 4

Introducción

La incidencia de la obesidad ha incrementado constantemente en la última década y ahora es considerada como una pandemia mundial [11, 12]. La obesidad es definida como la acumulación excesiva de grasa que puede desencadenar enfermedades metabólicas como resistencia a la insulina, dislipidemias e incluso diabetes tipo 2 (DT2) [13, 14]. Enfermedades como la obesidad son resultado de un desbalance energético que se da durante el tiempo de manera acumulativa, y sucede cuando la cantidad de energía consumida excede la cantidad de energía gastada [15]. El gasto energético esta compuesto de varios factores que incluyen el metabolismo basal, la termogénesis de los alimentos y la actividad física, pero también están incluidas la termogénesis por estremecimiento (shivering thermogenesis en inglés) y la termogénesis sin estremecimiento (non shivering thermogenesis en inglés) [16]. La termogénesis sin estremecimiento puede jugar un papel importante en la utilización de la energía. Existen muchos mecanismos que afectan el balance energético incluyendo las alteraciones que controlan la ingesta y las que intervienen en la utilización de los substratos [16, 17]. El tejido adiposo pardo juega un papel importante en el uso de macro nutrientes, mientras que el tejido adiposo blanco (TAB) almacena energía en forma de triglicéridos, el tejido adiposo pardo (TAP) utiliza principalmente glucosa y ácidos grasos con el fin de mantener la temperatura corporal mediante el incremento en la termogénesis. [18, 19, 20] . Con ciertos estímulos las células precursoras del TAB son capaces de adquirir un fenotipo oxidativo y termogénico similar al del TAP. Este proceso se

le conoce como beiging o browning [21, 22, 3, 23]. En años recientes el esfuerzo por encontrar inductores del beiging se ha incrementado. Dentro de los compuestos que se ha observado que incrementan este proceso se encuentra la isoflavona genisteína. Se ha observado que en ratones alimentados con dietas altas en grasa, la genisteína incrementa marcadores de beiging [5, 4], en estos modelos animales se ha reportado que, así como el consumo de genisteína incrementa el gasto energético, este incremento está acompañado de un aumento en la tolerancia a la glucosa [4, 24, 25, 26], siendo este último parámetro asociado a un aumento en la proteína AMPK fosforilada (pAMPK) en el músculo esquelético [27]. El incremento en la fosforilación de AMPK promueve el incremento del metabolismo oxidativo principalmente de la utilización de ácidos grasos a través de la β -oxidación [27].

A pesar de que se ha estudiado este proceso inducido por la genisteína, existe poca evidencia que muestre de qué manera la genisteína promueve la activación del programa termogénico. Estudios realizados en la línea celular de cáncer de mama SKBR3 han demostrado que la genisteína puede incrementar la expresión de proteínas relacionadas a la proliferación celular. En estos mismos estudios se observó que este efecto depende de la presencia de el receptor acoplado a proteína G, GPR30 [9]. GPR30 es un receptor acoplado a proteína G encargado de las acciones no genómicas de los estrógenos [28], fisiológicamente interviene en el crecimiento celular, pero se ha observado que este receptor tiene implicaciones en la regulación del metabolismo [7]. A pesar de que se ha reportado que GPR30 puede mediar algunos efectos de la genisteína se desconoce si GPR30 tiene un papel importante en la activación de la termogénesis por efecto de la genisteína.

Capítulo 5

Marco teórico

5.1. Balance energético.

El gasto o balance energético de los organismos se encuentra compuesto por dos diferentes factores, la cantidad de energía que es consumida en forma de nutrimentos y la cantidad de energía que nuestro cuerpo gasta o utiliza en forma de trabajo y en forma de calor. El 90 % de la energía que consumimos es energía metabolizable, y el consumo de esta energía depende de la actividad física y mecánica del individuo y del estado fisiológico de cada organismo, lo que incluye: procesos de crecimiento, reparación y reproducción de tejidos [16]. El gasto energético diario de cada individuo depende de la edad, y de la composición corporal, es decir del porcentaje de grasa y músculo que se posea. El gasto energético diario esta compuesto en un 55-65 % por el gasto energético basal, 25-35 % por la actividad física y solo el 10 % por el efecto termogénico de los alimentos [29]. Otra forma de analizar el gasto energético es por la necesidad en el uso de la energía, esta clasificación se divide en 2 aspectos: el aspecto obligatorio y el facultativo. El gasto energético obligatorio se refiere a la energía que se utiliza en reposo para mantener las funciones de las células y tejidos, así como la energía que se utiliza para actividades físicas vitales involuntarias como el efecto termogénico de los alimentos que incluye la digestión y el metabolismo de los nutrimentos, y las voluntarias como comer y masticar [30]. Dentro del gasto energético facultativo se encuentra: la energía consumida en el ejercicio físico volun-

tario, la energía gastada por movimientos rítmicos constantes con algunos objetos, y la termogénesis por estremecimiento inducida por el frío, siendo estos tres aspectos llevados a cabo por el músculo esquelético principalmente [16]. Dentro de los aspectos adaptativos también se encuentra la termogénesis sin estremecimiento (adaptativa) inducida por frío o por alimentos, la cual se da principalmente en el tejido adiposo [31]. El aspecto obligatorio del gasto energético varía dependiendo de la aclimatación al frío, de el estado de la glándula de la tiroides, y de la actividad física del individuo, y aunque estos componentes puedan clasificarse como obligatorios también participan en la parte facultativa, por lo que el componente obligatorio y facultativo trabajan en conjunto para mantener la homeostasis del organismo [16]. Un proceso adaptativo que actualmente se encuentra en estudio y que, anteriormente no se tomaba en consideración como parte del gasto energético es la termogénesis sin estremecimiento, la cual es llevada a cabo por el tejido adiposo [31]. Este tipo de termogénesis del tejido adiposo, al ser inducible (adaptativa) se propone como una alternativa para incrementar el gasto energético como posible tratamiento para enfermedades metabólicas como la obesidad y la resistencia a la insulina [32].

5.2. El tejido adiposo como órgano termogénico.

El estudio del tejido adiposo como un órgano que regula el metabolismo se intensificó con las investigaciones del TAP en algunos animales que hibernan, ya que la hibernación describe el proceso por el cual el TAP puede regular el gasto energético y la temperatura corporal. El objetivo de esta regulación es asegurar la sobrevivencia durante el invierno en organismos que viven en ecosistemas con temperaturas extremas [33]. El proceso mediante el cual el tejido TAP controla la generación de calor, está relacionado con la estimulación del sistema nervioso simpático (SNS) a través de la liberación de norepinefrina (NE), activando la oxidación de los ácidos grasos almacenados en este mismo tejido [34, 35]. Los adipocitos en el TAP tienen la característica de expresar la proteína desacoplante 1 (UCP1)[36, 37, 35]. La expresión de esta proteína provoca una disrupción en la continuidad de la membrana mitocondrial

interna que promueve la pérdida en el gradiente de protones producido en la cadena transportadora de electrones. La disminución de este gradiente, impide que la ATP sintasa utilice la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP y por lo tanto, existe una estimulación constante de la cadena transportadora de electrones [38]. A este mecanismo se le conoce como termogénesis, ya que para compensar la disminución en el gradiente de protones y en la síntesis de ATP, la constante oxidación de diferentes sustratos genera calor. [3]. Se ha demostrado que la actividad termogénica del TAP es necesariamente inducible y debe de ser activada mediante un estímulo, siendo los principales: el frío y los compuestos β -adrenérgicos [35, 3, 22, 34, 39]. Estudios en los cuáles se monitoreó la captación de glucosa a través de la tecnología de la tomografía por emisión de positrones (PET/TC), se observó que en humanos expuestos a temperaturas bajas (19°C) después de un periodo de normo-temperatura, la captación de glucosa se incrementó principalmente en zonas supraclaviculares e intervertebrales, (lugar donde se encuentra el TAP [1]. En los sujetos en los que se observó el incremento en la captación de glucosa, se determinó que existe un incremento en la tolerancia a la misma [1] (figura 5.1).

En otro estudio llevado a cabo también en condiciones de frío, se observó que en sujetos expuestos a 17°C durante 2 horas diarias por 6 semanas, la captación de glucosa se incrementó por parte de el TAP figura (5.2 A). Este hallazgo se acompañó de un incremento en el gasto calórico figura (5.2 B), y una disminución en la cantidad de masa grasa en los individuos expuestos al frío, en comparación con los sujetos controles que no se expusieron a temperaturas bajas. En este mismo estudio se observó que existen compuestos de la dieta como los capsinoides que junto con una exposición previa al frío pueden promover este mismo efecto figura (5.2 C) [2].

Se ha reportado que la activación del TAP incrementa la expresión de la proteína UCP-1, acompañado de un incremento en la expresión de el coactivador del receptor de proliferador de peroxisomas del receptor gamma 1-alfa ($PGC1\alpha$), el cual regula la biogénesis mitocondrial [3].

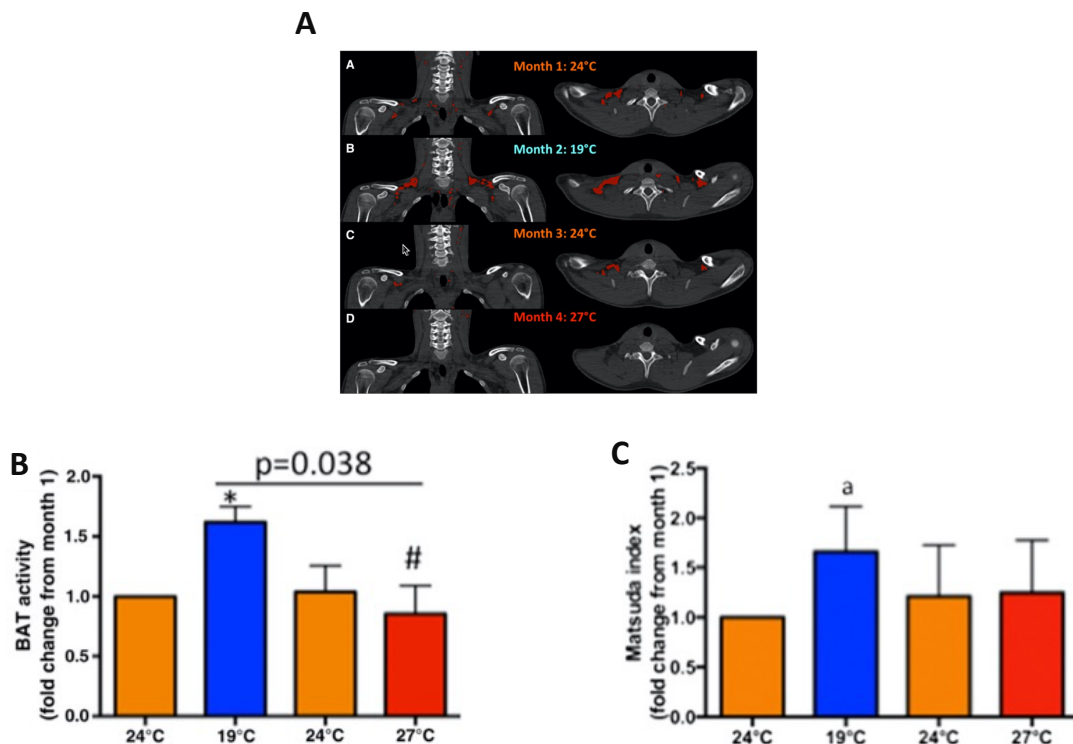


Figura 5.1: Imágenes representativa de la PET/TC y la captación de glucosa de un sujeto (A), actividad del TAP (B) e índice de matsuda (C) de diferentes individuos expuestos a distintos periodos de temperaturas. Los datos están expresados en promedio \pm SD, $a = P < 0.05$ comparado con el mes 1 (24°C). Tomado de [1]

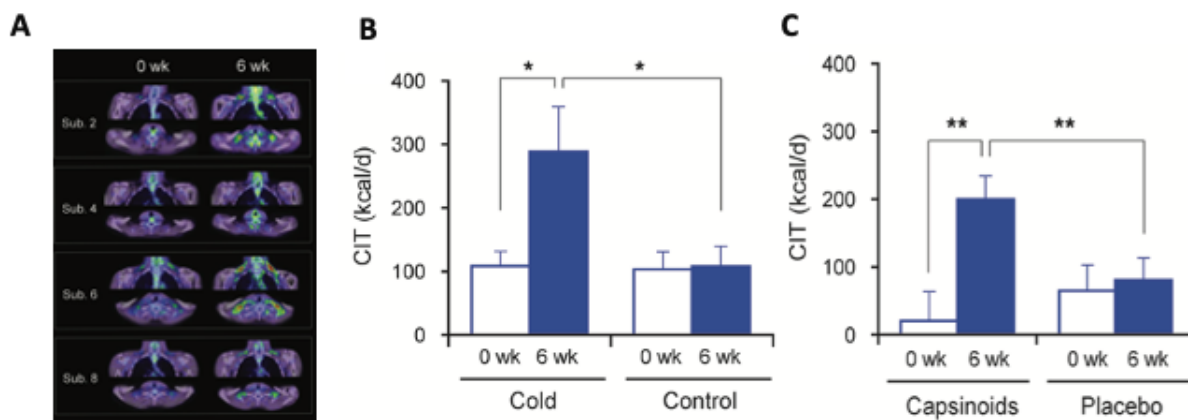


Figura 5.2: Imágenes de la PET/TC y la captación de glucosa (A), número de calorías gastadas al día en respuesta a una exposición al frío (B) y cantidad de calorías gastadas al día en respuesta al consumo de capsinoides (C) por 6 semanas en diferentes individuos. CIT: incrementos de energía inducidos por frío. Los datos se presentan como promedio \pm SEM donde * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Tomado de [2]

5.3. Beiging y termogénesis adaptativa.

Anteriormente, se describían dos tipos de tejido adiposo. El primero, TAB, cuya función principalmente es la de almacenar los ácidos grasos en forma de triglicéridos [35, 22], el TAB contiene una sola vesícula lipídica y muy pocas mitocondrias, mientras que el segundo, TAP contiene vesículas multiloculares, y una gran abundancia de mitocondrias [22, 40]. El TAP al ser estimulado por el frío, los compuestos β adrenérgicos y/o los componentes dietarios inicia un proceso de activación, el cual involucra el incremento de la expresión de las proteínas del programa termogénico como UCP1, la proteína que contiene el dominio 16 (PRDM16) y PGC1 α . El incremento de estas proteínas tiene como consecuencia el aumento de la oxidación de ácidos grasos y glucosa como sustrato, como consecuencia del desacoplamiento en la cadena transportadora de electrones promovida por UCP1 [36]. Una de las principales características del TAP con respecto al TAB es la expresión de UCP1 además de un marcado metabolismo oxidativo. [3, 41, 36]. Existe un tercer tejido adiposo el cual posee características similares a las del TAP, el tejido adiposo beige (TABe), el cual es un tejido que se obtiene mediante la diferenciación de preadipocitos provenientes del linaje celular Myf5– o mediante la transdiferenciación del TAB [3, 41, 36, 34]. Es importante resaltar que el origen del TABe es diferente al del TAP, cuyas células precursoras son Myf5+ [3, 22, 39, 36, 42]. El proceso por el cuál se activa la diferenciación de el tejido adiposo beige ya sea a partir de células Myf5– o de células provenientes del TAB se le conoce como beiging, browning o brightening [22, 34, 36]. El proceso de beiging, al igual que la activación del TAP se genera en respuesta a el estímulo del frío, los compuestos β adrenérgicos y los componentes dietarios. El TABe posee vesículas lipídicas multiloculares, gran cantidad de mitocondrias que expresan la proteína UCP1, lo que indica que este tejido tiene capacidades termogénicas similares a las del TAP (figura 5.3) [3, 41, 36, 34, 22, 39]. El proceso de beiging es un proceso reversible, se ha reportado que la exposición a temperaturas de 30°C junto con una dieta alta en grasa pueden promover que los adipocitos beige adquieran características de TAB en un proceso llamado whitening (figura 5.3) [43, 44] .

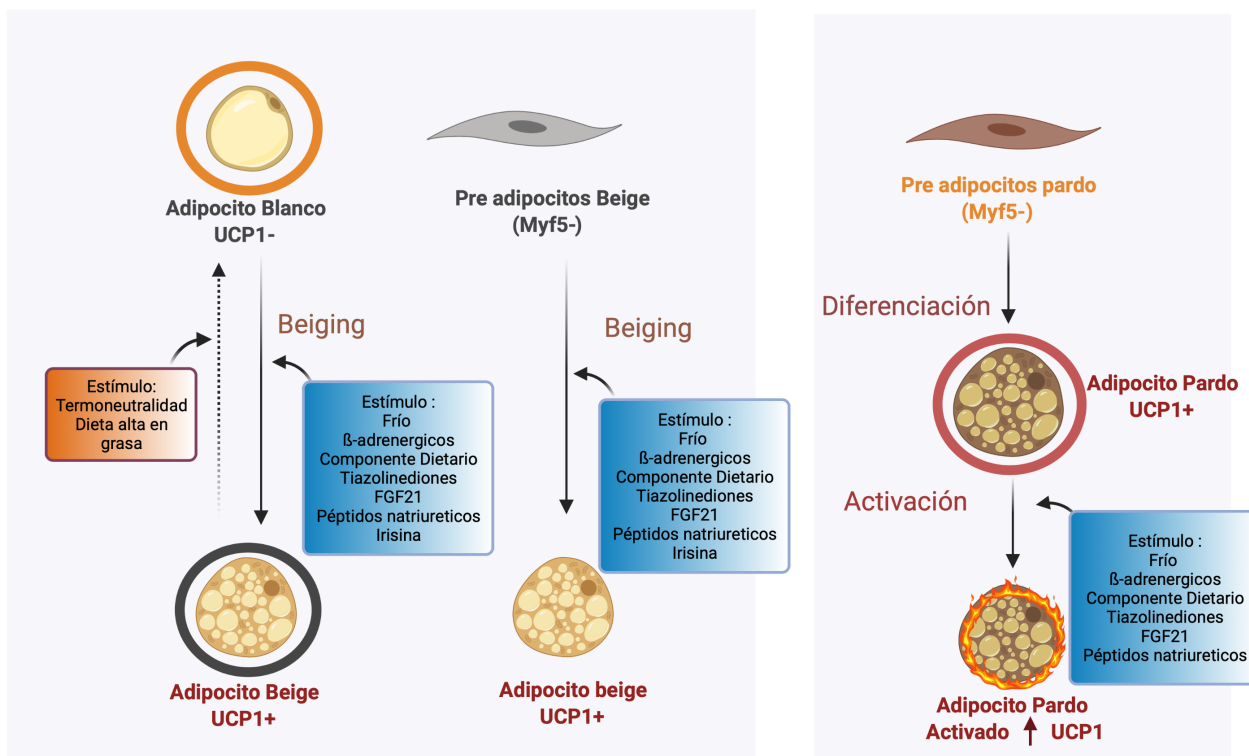


Figura 5.3: Tipos de adipocitos (tejido adiposo) y el proceso de beiging, Proteína desacoplante 1 (UCP1), factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), imagen basada en [3]

Entre los genes que expresa el TABe se encuentran algunos factores de transcripción que comparte en común con el TAP como PRDM16, la proteína de la muerte celular DFFA efectora A (CIDEA), *PGC1 α* y otros propios del TABe como la proteína T-box 1 (TBX1) y la proteína transmembranal 26 (TMEM26) [3, 34, 22, 41]. Tanto la activación del TAP como la diferenciación del beige necesitan de un estímulo para que se lleve a cabo [3]. Actualmente se ha reportado que el frío, las tiazolinediones, los péptidos natriuréticos, la hormona tiroidea, el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) y en el caso del TABe la irisina generada en el músculo esquelético activan el programa termogénico [42, 22, 34] (figura 5.3). Los depósitos en donde se encuentra el TABe en humanos son la zona supraclavicular e intervertebral y en el caso de los roedores principalmente en el tejido adiposo blanco inguinal y en menor

cantidad en el visceral [3, 36]. Se ha observado que en ratones el incremento en el beiging y la activación del TAP eleva el consumo de oxígeno [45, 4], y por lo tanto el gasto energético, además incrementa la sensibilidad a la insulina, la reducción de peso y de la masa grasa [46, 47, 48]. Debido a los efectos benéficos del beiging sobre la tolerancia a la glucosa y el gasto energético, la búsqueda de nuevos compuestos que promuevan este efecto se ha incrementado con el tiempo.

5.4. Genisteína, compuesto dietario que activa la termogénesis.

La isoflavona genisteína es un polifenol que se encuentra asociado a la proteína de soya [49], se encuentra disponible en diferentes tipos de glucósidos como 6-O- malonil glucósido, 6-O-acetil glucósido y β glucósidos de genisteína [50]. Estos glucósidos son biológicamente inactivos y una vez ingeridos son hidrolizados por las glucosidasas a agliconas como genisteína, la cual es absorbida a nivel intestinal [50]. En humanos el consumo constante de soya en la dieta incrementa rápido la concentración plasmática de isoflavonas que llega hasta el rango de concentraciones micromolares [51]. El consumo directo de genisteína tiene diferentes efectos a nivel fisiológico. En modelos animales se ha observado que la genisteína disminuye la ganancia de peso en los ratones que consumieron una dieta alta en grasa, esta disminución se acompaña de un incremento en la sensibilidad a la insulina y de un incremento en el consumo de oxígeno (VO_2) (figura 5.4 A-D) [4]. En este estudio se determinó que en el tejido adiposo subcutáneo, el consumo de genisteína incrementa la expresión y la abundancia de las proteínas de marcadores de beiging, como UCP1, PRDM16 y TBX1 (figura 5.4E) [4]. También se demostró mediante análisis inmunohistoquímicos en cortes histológicos de tejido adiposo, que en los animales que consumieron genisteína la abundancia de UCP1 es mayor en comparación con los que no la consumieron. Se observó que los adipocitos del tejido adiposo blanco inguinal de animales que fueron alimentados con el compuesto son de menor tamaño con respecto a los adipocitos de animales que no lo consumieron. Este efecto se observó a pesar del consumo de una dieta alta en grasa

[4].

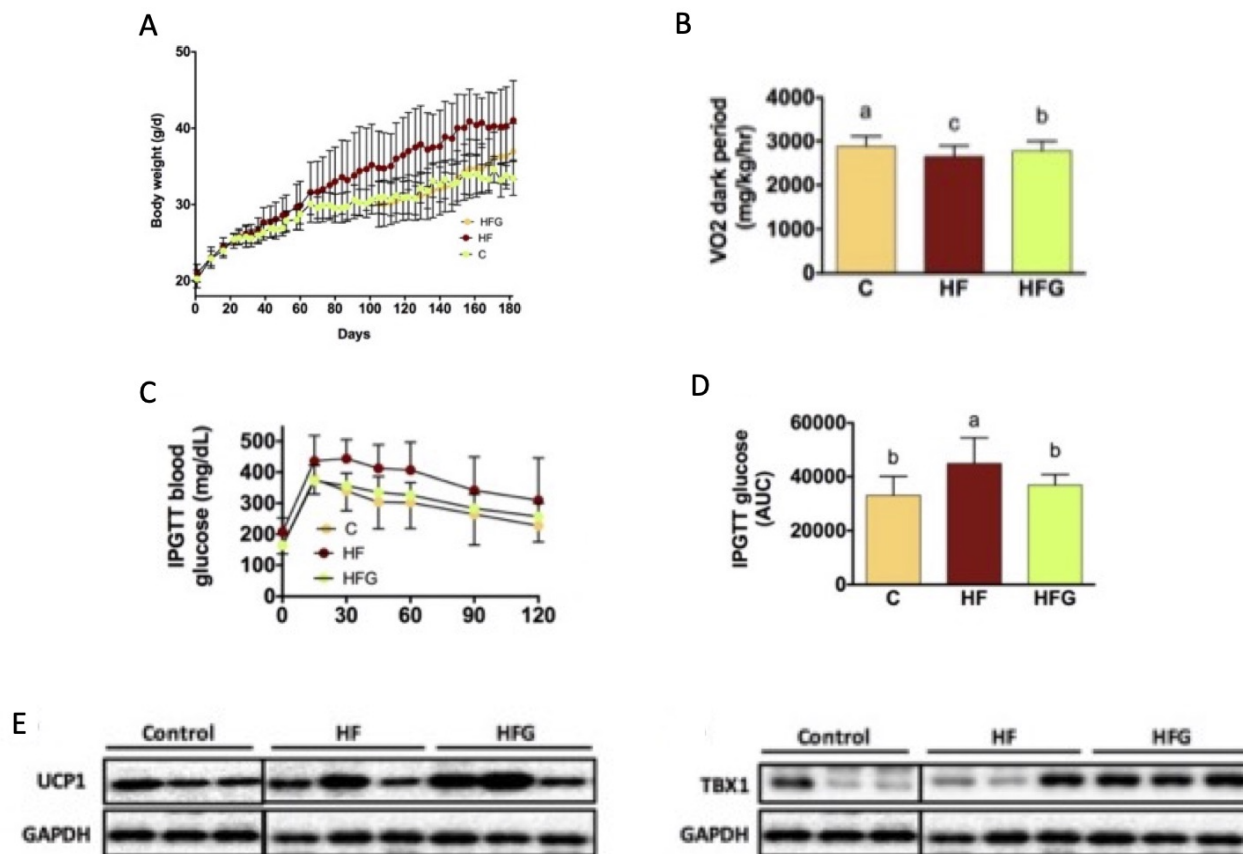


Figura 5.4: Efecto de la genisteína en el peso (A), consumo de VO_2 (B), tolerancia a la glucosa (C-D) y contenido de proteína de genes relacionados a la termogénesis (E) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Dieta alta en grasa (HF), dieta alta en grasa más genisteína (HFG). Los datos son expresados en promedio \pm SD, las diferencias se indican con letras donde $a > b > c$. Tomado de [4].

En otro estudio realizado en ratones que consumieron una dieta control, se observó que al igual que lo reportado previamente, los ratones que consumieron genisteína ganaron menos peso, tuvieron un mayor consumo de O_2 y una mejora en la tolerancia a la glucosa. En este mismo trabajo se observó que en tejido adiposo blanco inguinal la genisteína incrementó la expresión de UCP1 y $PGC1\alpha$ y el contenido de las proteínas UCP1 y TBX1 (figura 5.5 A) [5]. De igual manera ensayos realizados *in vitro* para estudiar en mayor detalle el metabolismo de los adipocitos en presencia de este compuesto, demuestran que la genisteína incrementa el número de mitocondrias en adipocitos, así como la expresión de los genes UCP1 y TBX1 y el contenido de

proteína de UCP1 y de *PGC1 α* (figura 5.5 B,C) [5]. Estudios *ex vivo* mostraron que la genisteína incrementa la función mitocondrial de los adipocitos. Se observó que en adipocitos provenientes del estroma vascular (CEV) de ratones, la genisteína a concentraciones de 5 μ M incrementa la respiración máxima y la capacidad de reserva, lo que no se observa en las células estimuladas sólo con el vehículo. Este resultado indican que la capacidad oxidativa de la célula se encuentra elevada en respuesta al estímulo de genisteína (figura 5.5 D) [5].

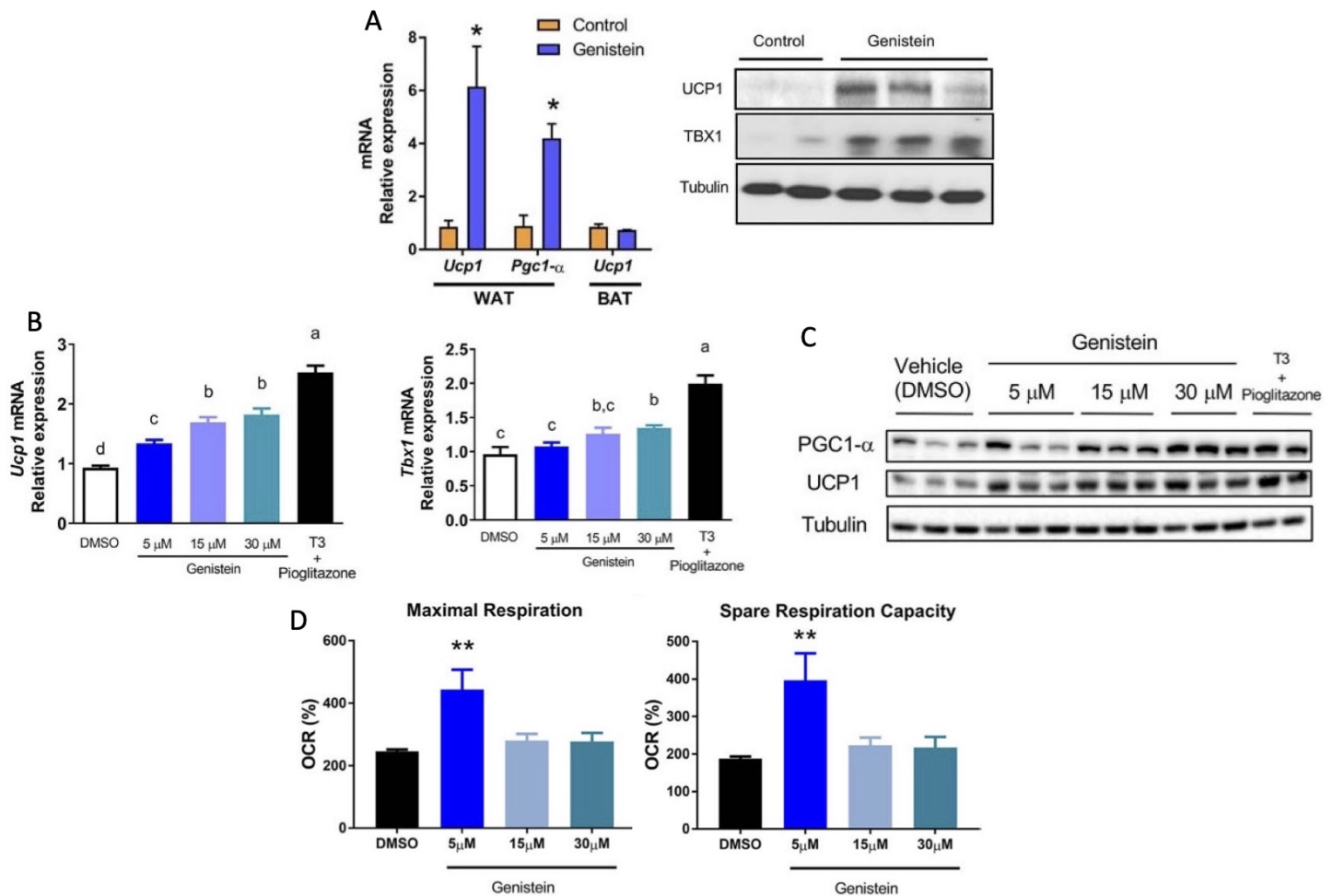


Figura 5.5: Efecto de la genisteína en animales alimentados con una dieta control: expresión de genes y contenido de proteína de marcadores termogénicos en el tejido adiposo blanco y pardo (A). Efecto de la genisteína en la expresión de genes termogénicos (B), contenido de proteína de marcadores termogénicos (C), y en la respiración máxima y capacidad de reserva celular (D) en adipocitos de CEV. Tejido adiposo blanco (WAT), tejido adiposo pardo (TAP). Los datos son presentados con promedio \pm SEM donde * p < 0.05, ** p < 0.01, $a > b > c > d$, p < 0.05. Tomado de [5]

La evidencia sugiere que la genisteína incrementa el beiging en y el consumo de

oxígeno el tejido adiposo, ya sea en modelos *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, sin embargo se desconoce el mediador o el receptor por el cual la genisteína promueve este efecto.

5.5. Efecto de la genisteína en el músculo esquelético.

Los efectos de la genisteína sobre el músculo esquelético se comenzaron a estudiar con el consumo de la proteína de soya. En un estudio, ratas *Zuckerfa/fa* (obesas genéticamente) fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y con proteína de soya, en este ensayo se observó que en comparación con las alimentadas con caseína, el músculo esquelético de las ratas que consumieron proteína de soya muestra un incremento en la fosforilación de la AMPK [6]. De igual forma se observó que la expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos esta incrementada [6]. Debido a que AMPK es una enzima que sensa el metabolismo energético y activa los mecanismos para la obtención de energía, el incremento en la fosforilación de la AMPK implica un incremento en la expresión de genes asociados a la oxidación de ácidos grasos, la biogénesis mitocondrial y la glucólisis, promoviendo un incremento en el metabolismo oxidativo [52]. Posteriormente se determinó que el compuesto de la soya relacionado a estos efectos es la genisteína. En este mismo estudio se evaluó los efectos de este compuesto en un modelo de obesidad inducida por dieta, en el que ratones C56BL/6 fueron alimentados por 8 semanas con una dieta alta en grasa con y sin genisteína. Se determinó que la genisteína disminuyó la ganancia de peso en estos ratones a pesar de consumir una dieta alta en grasa (figura 5.6 A), también se reportó que a semejanza del consumo de la proteína de soya, la fosforilación de AMPK en el músculo se incrementa con el consumo de genisteína en comparación con los ratones que solo consumieron la dieta alta en grasa (figura 5.6 C) [6]. Aunado a esto, se observó que los ratones alimentados con genisteína incrementan su consumo de VO_2 (figura 5.6 D), lo que indica un incremento en el gasto energético [6].

En el músculo de los ratones que consumieron genisteína y una dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS), la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos como el receptor activado por proliferador de peroxisomas delta (*PPAR δ*), la carnitin

pamitoil transferasa 1 (CPT-1) y genes relacionados con biogénesis mitocondrial y termogénesis como *PGC1 α* y la proteína desacoplante 3 (UCP3) (figura 5.6 B) se encuentran incrementados por el consumo de genisteína [6].

Como posible mecanismo responsable de estos efectos se ha reportado que, en un modelo *in vitro* de músculo esquelético, el estímulo de la genisteína promueve la elevación de las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), lo que indica que un receptor o una enzima relacionada a la producción o a la acumulación de AMPc podría estar involucrada en esta respuesta [6]. En otros estudios y modelos *in vitro* se ha reportado que la genisteína eleva las concentraciones de AMPc [10, 53], sin embargo, poco se conoce de como la genisteína puede estimular la producción de este segundo mensajero.

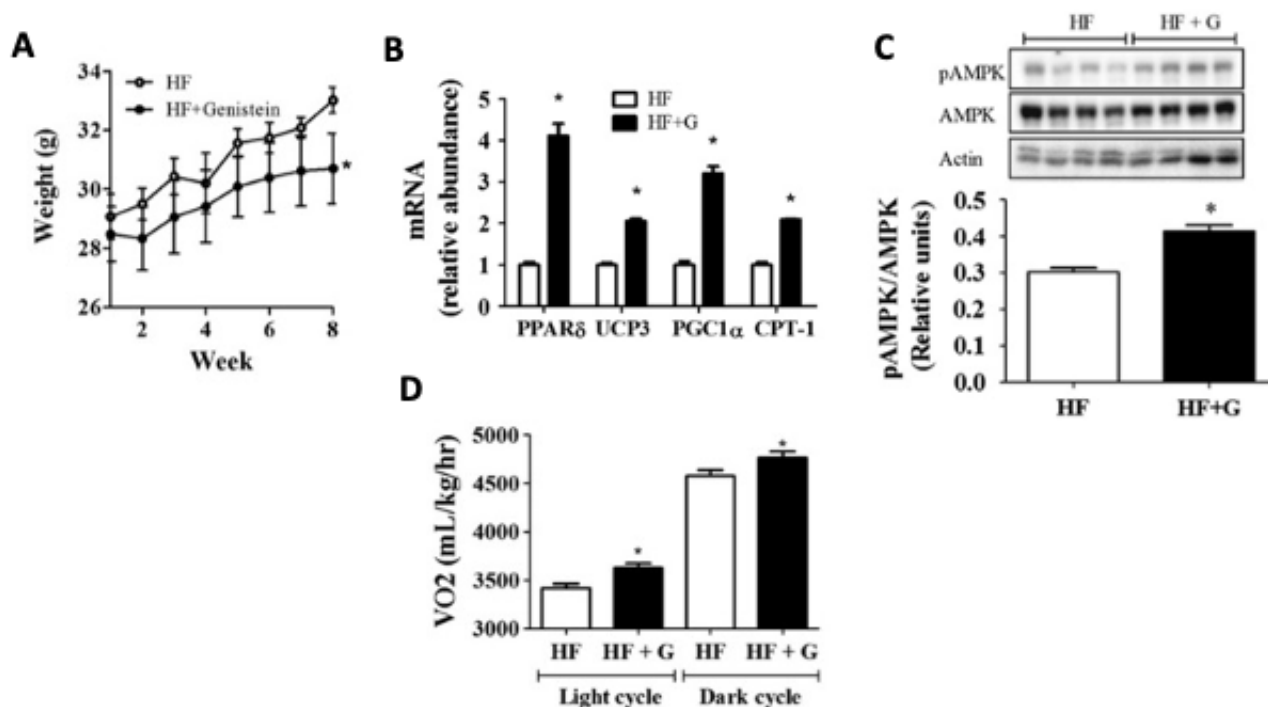


Figura 5.6: Efecto de la genisteína en el peso (A), la expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos (B), la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético (C) y el consumo de VO_2 (D) en ratones alimentados con una dieta alta en grasa con o sin genisteína, dieta alta en grasa (HF), dieta alta en grasa y genisteína (HF+G). Los datos son presentados con promedio \pm SEM donde $*p < 0.05$. Tomado de [6]

5.6. GPR30 como posible mediador de efectos metabólicos de la genisteína.

GPR30 o GPER1 (receptor de estrógenos acoplado a proteína G 1) es un receptor de 7 dominios transmembranales acoplado a proteína G. El receptor GPR30 que se expresa en el humano está formado por 375 aminoácidos con un peso molecular teórico de aproximadamente $41kD$ [54]. La región N-terminal de este receptor está localizada en la compartimento extracelular y contiene muchos residuos de aspartato modificados mediante glucosilación [54]. GPR30 es un receptor que media los efectos no genómicos de los estrógenos incluyendo la generación de segundos mensajeros como AMPc, Ca^{2+} , óxido nítrico (NO), así como la activación de receptores tirosin cinasas [55]. Existe evidencia acerca de las funciones en las que interviene GPR30. GPR30 participa en la regulación del crecimiento celular [56], en la regulación del tamaño del timo [57], en el sistema vascular [58], en la tolerancia a la glucosa (figura 5.7 A,B,C) [7], la supervivencia de los islotes pancreáticos [8] y en la liberación de la insulina mediante este receptor por parte de los estrógenos (figura 5.7 D) [8]. GPR30 se expresa en abundancia en tejido adiposo, músculo esquelético, ovarios y páncreas [59]. Los ratones GPR30^{-/-} fueron inicialmente diseñados para determinar el papel de GPR30 en la atrofia del timo mediada por estrógenos [57], pero estudios posteriores demuestran que GPR30 es importante en la homeostasis energética y el metabolismo. Existe evidencia que indica que la ausencia de GPR30 incrementa la grasa abdominal de ratones adultos hembras y machos [60], y en el caso de los adultos machos la ausencia de GPR30 promueve un incremento en el tejido adiposo visceral [60], resistencia a la insulina y acumulación anormal de lípidos en el páncreas [7], dislipidemia [7], disminución en el gasto energético [61], incremento de citocinas proinflamatorias y disminución de la adiponectina circulante [7]. Esta evidencia sugiere que GPR30 tiene un papel en el metabolismo de lípidos, en el tejido adiposo, en la homeostasis de la glucosa y la regulación energética [59].

La genisteína por su estructura molecular posee actividad estrogénica. Esta isoflavona tiene la capacidad de unirse a ambos receptores de estrógenos (ERs), teniendo

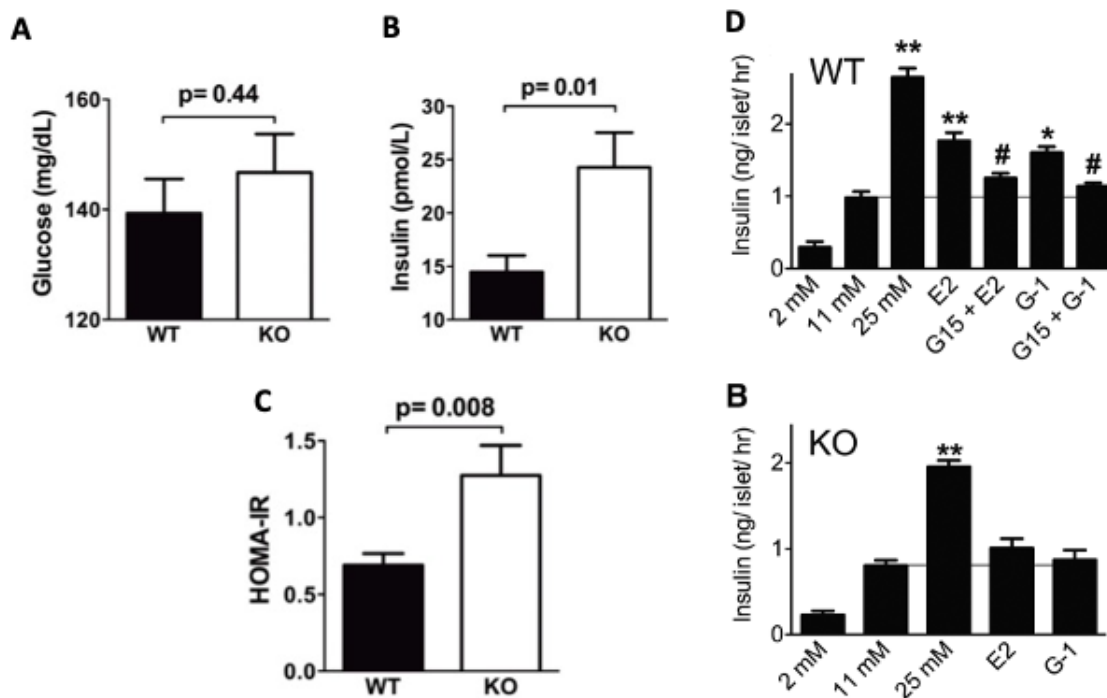


Figura 5.7: Efecto de la ausencia de GPR30 en las concentraciones de glucosa (A), insulina (B) y la resistencia a la insulina (C) en ratones macho silvestres (WT) y deficientes de GPR30 (KO). Los datos están expresados en promedio \pm SEM. Tomado de [7]. Secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratones WT y GPR30 KO estimulados con: 11 mM de glucosa, estrógenos (E2) y el agonista de GPR30 G-1 a 100nM (1h), en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con el antagonista de GPR30 G15 a 1 μ M (1h) (D), también se utilizó 2 mM y 25 mM de glucosa. Los datos están expresados en promedio \pm SEM donde * p < 0.05, ** p < 0.01 # p < 0.05 con respecto a E2 o G-1. Tomado de [8]

una preferencia por el receptor de estrógenos β ($ER\beta$), sin embargo, su actividad es 1000 más débil que la del β -estradiol (E2) [62]. Existen varios estudios que describen que los efectos de la genisteína no son a través de los receptores nucleares de estrógenos sino a través de GPR30. Estudios en células SKBR3, línea celular de cáncer de mama que no expresa ERs, muestran que la genisteína puede inducir la expresión de una proteína asociada a proliferación celular a través de GPR30 (figura 5.8)[9].

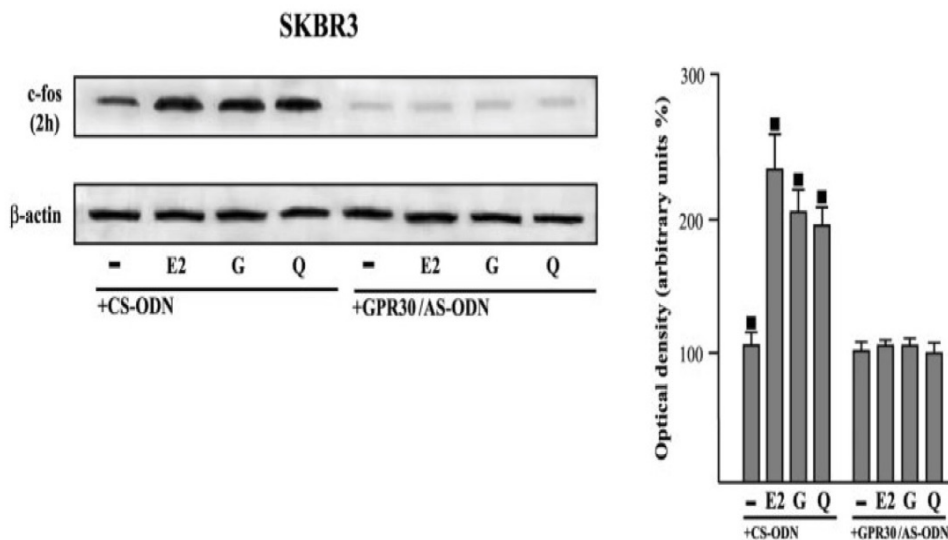


Figura 5.8: GPR30 media los efectos de la genisteína sobre *c-fos* en células de cáncer de mama negativas para ERs transfectadas con codón con control (+*Cs-ODN*), y un codón antisentido para GPR30 (+*GPR30/AS-ODN*), estimulados con estrógenos (E2), genisteína (G), quercetina (Q). Los datos están expresados en promedio \pm SD donde ■ $p < 0.05$ Tomado de [9]

Otro grupo de investigación demostró que el efecto de la genisteína en las células β pancreáticas tanto en la línea celular INS1 como en el cultivo primario de estas células aumenta la fosforilación de la proteína 1 de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB1) (figura 5.9 A,B). Un incremento de la fosforilación de CREB1 promueve una mejora en la supervivencia de estas células [10]. Este grupo reportó que el efecto de la genisteína sobre las células β pancreáticas es dependiente de GPR30, ya que demostraron que la disminución en la expresión y el contenido de proteína de GPR30 en el páncreas tiene como consecuencia una disminución en la fosforilación de CREB1 en respuesta al estímulo de genisteína (figura 5.9 C) [10].

A pesar de que existe evidencia de que algunos efectos de la genisteína involucran a GPR30, no se conoce si este receptor está involucrado en el efecto de la genisteína sobre la activación de la termogénesis en el tejido adiposo.

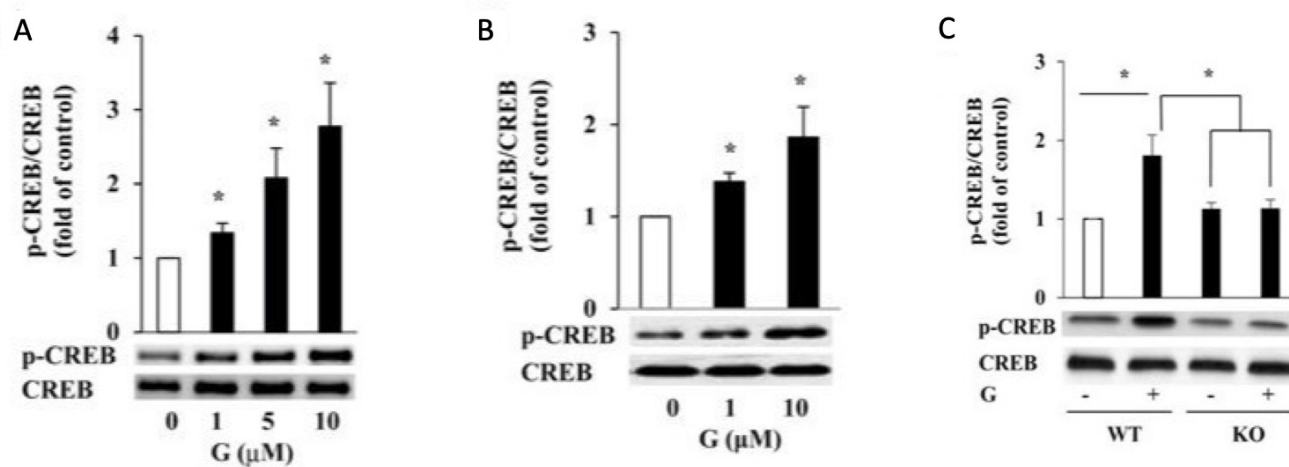


Figura 5.9: Incremento en la fosforilación de CREB1 en células INS1 (A) e islotes pancreáticos humanos (B). Disminución de la fosforilación de CREB1 por efecto de la genisteína en islotes páncreas de ratones GPR30^{+/+} (WT) y GPR30^{-/-} (KO) (C). Genisteína (G). Los datos están expresados en promedio \pm SEM donde $*p < 0.05$. Tomado de [10]

Capítulo 6

Hipótesis

El consumo de genisteína incrementará la termogénesis y tolerancia a la glucosa a través de GPR30 en el tejido adiposo y el músculo.

Capítulo 7

Objetivo General

Evaluar el papel de GPR30 como mediador de los efectos de la genisteína en el tejido adiposo blanco y en el músculo esquelético.

Capítulo 8

Objetivos específicos

8.1. Objetivos sistémicos:

1. Evaluar el efecto de la genisteína sobre la ganancia de peso, composición corporal, y parámetros bioquímicos en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o una DAGS.
2. Evaluar el efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.
3. Determinar el efecto de la genisteína sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.

8.2. Objetivos sobre el TABi y TAP:

1. Evaluar el efecto de la genisteína en el estatus bioenergético en adipocitos blancos en ausencia y presencia de GPR30.
2. Determinar el contenido de marcadores asociados a la termogénesis en TABi y TAP en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS.

8.3. Objetivos sobre el músculo esquelético:

1. Evaluar el efecto de la genisteína sobre la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético gastrocnemio de un modelo *in vivo* de ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y una DAGS.
2. Evaluar la fosforilación de AMPK en un modelo *in vitro* de músculo esquelético silenciado para GPR30 (GPR30 knock down) y en un modelo *ex vivo* de músculo esquelético de miotúbulos GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}.

Capítulo 9

Materiales y Métodos

9.1. *In vivo*

9.1.1. Mantenimiento y cuidado de los animales de bioterio.

Todos los protocolos descritos en esta sección fueron aprobados por el comité de ética del INCMNSZ, FNU-1900-17-20. Con el objetivo de evaluar las diferencias en los efectos de la genisteína y el papel del receptor de GPR30, se obtuvieron mediante donación dos parejas reproductoras de ratones homocigotos $GPR30^{-/-}$. La donación fue realizada por parte de la Dra. Halina Offner DeLynn Rohrbacher, US Veterans Hospital Road, Portland Oregon. Los ratones $GPR30^{+/+}$ utilizados en este estudio provienen del mismo fondo genético C57BL/6 que los ratones $GPR30^{-/-}$. Para el estudio, se seleccionaron ratones macho $GPR30^{+/+}$ y ratones homocigotos $GPR30^{-/-}$ de 8 semanas de edad con un peso entre 22 y 25 gr. Los ratones se mantuvieron en jaulas a libre demanda de comida y agua con un ciclo de luz-obscuridad de 12 hrs a 22°C por 60 días. Los ratones fueron asignados aleatoriamente en 4 grupos (n=8-9 ratones por grupo) para consumir una de las dietas experimentales: Dieta AIN-93 (control), dieta AIN-93 suplementada con 0.2% de genisteína, DAGS y DAGS con 0.2% de genisteína. Las concentraciones de genisteína utilizadas en este estudio fueron las previamente reportadas en estudios anteriores donde se observaron los efectos previamente mencionados en el marco teórico de este trabajo. [6, 4, 5]. La dieta fue

Ingredientes	Control (%)	Control+Genisteína(%)	DAGS (%)	DAGS+Genisteína(%)
Almidón de maíz	39.74	39.54	9	8.8
Caseína	20	20	24	24
Dextrosa	13.2	13.2	11.4	11.4
Sacarosa	10	10	21.3	21.3
Aceite de soya	7	7	3.1	3.1
Fibra	5	5	5	5
Mezcla de minerales	3.5	3.5	3.5	3.5
Mezcla de vitaminas	1	1	1	1
L-Cisteína	0.3	0.3	0.3	0.3
Bitartrato de Colina	0.25	0.25	0.25	0.25
Manteca de cerdo	0	0	21.88	21.88
TBHQ	0.0014	0.0014	0.0013	0.0013

Tabla 9.1: Composición de las diferentes dietas, control (AIN-93) y dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS) con y sin genisteína.

administrada en forma seca y la composición de la misma se describe en la tabla 9.1. El consumo de alimento y el incremento de peso se determinó dos veces a la semana. El diseño experimental se encuentra en la figura 10.1 en la sección de diseños experimentales.

9.1.2. Determinación de la composición corporal en los ratones con distintas dietas.

La evaluación de la composición corporal se llevó a cabo con el equipo de análisis de composición corporal Echo MRI (Echo MRI, Houston TX USA). Las mediciones se realizaron individualmente, y se determinó el porcentaje de grasa con base al peso corporal tomado el día de la medición. La medición fue tomada en dos ocasiones, antes de realizar el estudio con el fin de determinar la homogeneidad entre los grupos, y la segunda después del día 58 del estudio.

9.1.3. Estudio de la curva de tolerancia a la glucosa.

En el día 48 del estudio se llevó a cabo el ensayo de la curva de tolerancia a la glucosa. Para este estudio los animales se dejaron en ayuno durante un periodo de 7 horas previas al mismo. Antes de la inyección intraperitoneal de la glucosa, los animales fueron pinchados en la cola para la recolección de una muestra de sangre como medición basal de la curva. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con solución glucosada a una concentración de 2gr/kg de peso. Se obtuvieron muestras de sangre de la cola a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos después de la inyección. Las concentraciones de glucosa fueron medidas en un glucómetro OneTouch-Ultra™ (Accu-Check Sensor, Roche Diagnostics). Los resultados se presentaron en una gráfica de curso temporal, y se determinó el área bajo la curva de cada uno de los grupos.

9.1.4. Calorimetría Indirecta.

En el día 48 se llevó a cabo la medición de calorimetría indirecta utilizando el sistema Comprehensive Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, OH, USA). Los ratones se colocaron en jaulas individuales 24 hrs previas al estudio como periodo de aclimatación. El estudio se llevó a cabo las 24 hrs posteriores al periodo de aclimatación a 22°C con un periodo de luz-obscuridad de 12-12 hrs. Durante todo el estudio los ratones tuvieron agua a libre acceso y alimento en la fase oscura o posprandio (19:00-7:00 hrs). El gasto energético (GE) se calculó con la siguiente fórmula $GE = (3.815 + 1.232 * RER) * VO_2$. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple con el objetivo de evaluar las pendientes de cambio de VO_2 (ml/hr) y gasto energético (GE Kcal/hr) con respecto al cambio en el peso y la masa grasa (MG). Este análisis se hizo para cada ratón de los diferentes grupos.

9.1.5. Medición de parámetros en suero.

Las concentraciones de colesterol, triglicéridos y glucosa se midieron en un equipo COBAS c111 analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Para medir las concentraciones de insulina se utilizó un kit comercial de ensayo por inmunoabsorción

ligado a enzimas (ELISA) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

9.1.6. Análisis de contenido de proteína mediante Western blot.

El músculo esquelético, tejido TABi, y TAP, fueron homogenizados en amortiguador para ensayos de radio-inmunoprecipitación (por sus siglas en inglés RIPA), preparado con amortiguador PBS), deoxicolato de sodio, azida de sodio, nonidet P-40 (NP40) e inhibidores de proteasas y fosfatasas comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La proteína fue obtenida por centrifugación a 14 000 RPM durante 20 minutos. Las proteínas se cuantificaron mediante un fluorómetro (Qbit 4, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) usando el kit de cuantificación de proteína de la misma marca. Las proteínas fueron preparadas en un amortiguador de corrida preparado con β mercaptoetanol y amortiguador laemmli 2x en una proporción 1 a 20 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las proteínas fueron separadas por un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos específicos como lo indica la tabla 9.2 y 9.3. Las bandas fueron detectadas usando Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Temecula, CA, USA). Las imágenes de quimioluminiscencia se digitalizaron mediante el equipo ChemiDoc MP imaging system (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) y analizados mediante un software de procesamiento de imagen (ImageJ 1.51 (100) 2015).

Tejido	Anticuerpo Primario	Concentración
TABi	UCP1 (abcam Inc)	1:10000
TABi	PGC1 – α (santa cruz biotechnology)	1:2500
TABi	TBX1 (abcam Inc)	1:7500
TABi	PRDM16(abcam Inc)	1:5000
TABi	CIDEA (abcam Inc)	1:5000
Gastrocnemio	AMPK(santa cruz biotechnology)	1:2000
Gastrocnemio	pAMPK(santa cruz biotechnology)	1:750
Todas las muestras de tejido adiposo	GAPDH(abcam Inc)	1:25000
Todas las muestras de músculo	GAPDH(abcam Inc)	1:40000

Tabla 9.2: Lista de anticuerpos primarios usados en inmunoblots de muestras de tejidos.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	dilución
UCP1	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20 000
PGC1 – α	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20 000
TBX1	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20 000
PRDM16	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20 000
CIDEA	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20 000
AMPK	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:10 000
pAMPK	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:5000-1:10000-1:7500
GAPDH	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20000-1:40000

Tabla 9.3: Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunoblots de muestras de tejidos.

9.2. *In vitro y Ex vivo*

9.2.1. Cultivo celular.

Para medir los efectos de la genisteína en adipocitos, se obtuvieron preadipocitos de la fracción vascular estromal del tejido TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}. Los tejidos inguinales fueron diseccionados y digeridos durante 30 minutos a 37°C con colagenasa tipo IV al 0.25 % (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). El tejido digerido fue colado mediante un colador de 100 μ M, las células obtenidas se centrifugaron a 1500xg por 15 minutos, la pastilla celular fue lavada dos veces y las células resuspendidas en DMEMF12 (Medio de Eagle modificado de Dulbecco-medio F12 de Ham, Gibco [®] Life Technologies). Las células se sembraron en un pozo de 9.6 cm_2 con medio con DMEMF12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco [®] Life Technologies) y 1 % antibiótico- antimicótico 100x (AA) (Caisson, Labs Smithfield, UT, USA) considerado el medio completo e incubadas a 37°C con 5 % de CO_2 (Thermo Fisher, Waltham MA, USA). Una vez llegado a una confluencia del 75 %, se cambió el medio por medio fresco y dos días después (día 0) las células se expusieron a un medio de inducción de diferenciación con el medio completo y los siguientes compuestos: dexametasona 1 μ M (Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany), insulina 1 μ M (Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany), 0.5 mM 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany). En el día 0 además del coctel de diferenciación las células fueron estimuladas con genisteína 20 μ M (Sigma Aldrich-Merck, Darmstad, Germany) o vehículo (DMSO, Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany) por 96 horas. En el día 4 de diferenciación las células fueron plaqueadas en microplacas XFe96 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) (15,000 células/pozo) con medio de maduración (DMEM F12 completo + insulina 1 μ M) con genisteína 20 μ M (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) o el vehículo por 6 días más. El medio se cambió cada 48 horas hasta el día 6.

Para llevar a cabo los estudios en músculo esquelético se utilizó dos estrategias celulares: la línea celular de mioblastos C2C12 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) y cultivo primario de mioblastos a partir de un conjunto de músculos esqueléticos de

las patas traseras de los ratones. Para el crecimiento y mantenimiento de la línea celular se emplearon frascos de 75cm^2 con DMEM alto en glucosa (Gibco [®] Life Technologies) suplementado con SFB al 10 % y 1 % de AA. Se permitió el crecimiento de las células hasta que alcanzaron una confluencia del 60 al 70 %. Posteriormente las células se pasaron a otro frasco para su amplificación. Para obtener los miotúbulos C2C12, se sembraron las células en placas de 6 pozos. Una vez obtenida una confluencia del 90 % se inició la inducción de la diferenciación usando DMEM alto en glucosa suplementado con 2 % de suero de caballo (HS) (ATCC, Manassas, Virginia, USA) y antibiótico/antimicótico al 1 % (día 1). Se cambió el medio cada 48 h hasta el día 5 de diferenciación en el que se realizaron los experimentos. Para la realización del cultivo primario de mioblastos se extrajo y se juntó las células de diferentes músculos esqueléticos de las patas traseras de 2 animales de 5 a 6 semanas de edad, tanto de ratones GPR30^{+/+} como de GPR30^{-/-}. Se extrajeron y juntaron las células de el músculo tibial anterior, gastrocnemio, soleo, cuádriceps y el músculo extensor largo de los dedos de ambos miembros traseros. Todos los músculos fueron lavados tres veces con amortiguador de fosfatos salino (por sus siglas en inglés PBS) para retirar restos de pelos y sangre. En un gabinete de esterilidad los músculos se cortaron en segmentos pequeños y se lavaron una vez más en amortiguador de PBS. Los fragmentos de músculos se colocaron en un tubo con la solución de digestión previamente filtrada, elaborada con DMEM hg, AA al 1 %, HEPES 2.5 % y colagenasa tipo II (Gibco [®] Life Technologies) a una concentración de 400U/ml . Los tubos se colocaron en baño con agitación a 37°C a 200 revoluciones por minuto (RPM) durante 45 minutos. Se agitó la solución cada 15 minutos. Posterior a la incubación, se centrifugó la mezcla a 1400 RPM durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en solución neutralizante (DMEM hg+10 %SFB+1 %AA), la suspensión se pasó por una coladera de $70\ \mu\text{M}$ para obtener los mioblastos. Para obtener la pastilla celular se centrifugó la solución colada a 1400 RPM durante 5 minutos. La pastilla se resuspendió en medio de crecimiento preparado con medio Ham'sF10 (Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany), suplementado con 20 % SFB (Gibco [®] Life Technologies), 1 % AA y factor de crecimiento para fibroblastos a una concentración de $10\ \text{ng/ml}$

(Gibco [®] Life Technologies). Las células en medio de crecimiento se sembraron en un placa petri de 10 cm previamente tratada con matrigel al 10%. Las células se colocaron en una incubadora de células a 37°C con 5% de CO_2 durante 72 hrs. Posterior a las 72 hrs, las células fueron lavadas con amortiguador PBS 2 veces para quitar el debris celular. Se tripsinizó la caja petri posterior a los lavados con PBS, se separaron los mioblastos de los fibroblastos poniendo la suspensión de células en un caja sin matrigel durante 20 minutos. Las células que se adhirieron a la placa se desecharon y las células en suspensión que no se adhirieron se colocaron en una caja de petri recubierta previamente con matrigel para promover su adhesión y crecimiento. Este procedimiento se realizó dos veces en total con el fin de obtener la mayor cantidad de mioblastos y desechar los fibroblastos. Para obtener miotúbulos primarios, se sembraron 500,000 células en placas de 12 pozos con medio de crecimiento. Una vez obtenida una confluencia del 85% al 90% se inició la inducción de la diferenciación usando DMEM alto en glucosa, filtrado y suplementado con 2% de suero de caballo (ATCC, Manassas, Virginia, USA) y AA al 1% (día 1). Se cambió el medio cada 48 hrs, al día 3 de diferenciación se utilizaron para realizar el experimento.

9.2.2. Medición del estatus bioenergético celular (respirometría).

La respiración mitocondrial o la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los adipocitos provenientes del estroma vascular de ambos genotipos, se determinó mediante ensayos de estrés mitocondrial en placas XFe96 usando el analizador de flujo extracelular XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Previos a la medición, las células fueron lavadas con medio básico XF (XF basal medium, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) suplementado con glucosa 11 mM , piruvato 1 mM y glutamina 2 mM . Posterior al lavado, las células se incubaron por 1 hr en una incubadora libre de CO_2 con 180 μ l del mismo medio. Para determinar la respiración mitocondrial, durante el protocolo se inyectaron consecutivamente tres compuestos diferentes: oligomicina 2 μM para inhibir la actividad

de la ATP sintasa, Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (por sus siglas en inglés FCCP) $1 \mu M$ con el fin de promover un estado de desacoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, y una combinación de rotenona-antimicina A $1 \mu M$ utilizado para detener por completo la actividad de la cadena transportadora de electrones inhibiendo la actividad de el complejo I y el complejo III (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Las mediciones del (OCR) fueron obtenidas y analizadas siguiendo las recomendaciones del fabricante Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Los resultados fueron normalizados mediante la cuantificación total de las células usando una tinción nuclear de Hoechst, la fluorescencia fue medida usando el equipo Cytation-1-cell-imaging-multi-mode-reader (BioTek, Winooski, Vermont USA).

9.2.3. Tinción de Bodipy y cálculo del número de adipocitos.

Para determinar la diferenciación de adipocitos y el número total de células, se utilizó la tinción de Bodipy (Invitrogen, Thermofisher Scientific, Waltham, MA;USA) y tinción nuclear de Hoechst (Invitrogen, Thermofisher Scientific, Waltham, MA;USA). Los adipocitos provenientes del estroma vascular fueron incubados con 250 n M de Bodipy y $2 \mu M$ de Hoechst por 20 minutos, la fluorescencia se cuantificó usando Cytation-1-cell-imaging-multi-mode-reader (BioTek, Winooski, Vermont USA). El número de adipocitos por condición se determinó calculando la tasa entre el número total de adipocitos teñido con bodipy con respecto al número total de células por cada condición.

Para determinar el efecto de la genistéina sobre la cantidad de células diferenciadas se calculó la proporción entre los adipocitos tratados con genistéina y los que fueron tratados solo con el vehículo, tanto para adipocitos GPR30^{+/+} como para GPR30^{-/-}.

9.2.4. Diseño y elaboración de la construcción de shRNA mediante un vector de lentivirus.

Para la construcción del ácido ribonucleico corto en horquilla (por sus siglas en inglés shRNA) en un vector de lentivirus, primero se diseñaron los insertos para elaborar el shRNA para el gen de GPR30. Se consultó la página de GPP webportal del BROAD Institute que contiene una base de datos de shRNA para distintos genes los cuales han sido probados anteriormente. Se diseñaron 2 insertos diferentes con base a una estructura establecida para shRNA. En estos oligos se incluye la secuencia que corresponde al gen específico que se va a silenciar, la secuencia que corresponde al “loop” del shRNA, y una secuencia que corresponde al sitio de restricción para XhoI. Para la realización de la construcción se utilizó el plásmido pLentiLox 3.7 (Addgene, Watterton, MA, USA) el cuál posee el gen de la proteína verde fluorescente o green fluoresce protein (por sus siglas en inglés GFP), un promotor de lentivirus, un cassette de resistencia contra ampicilina y la región en donde se va a clonar el shRNA (figura 9.1). A continuación se enumeran los insertos utilizados:

1. sh3: Oligo 1: 5'TGAGCATCAGCAGTACGTGATTTTCAAGAGAAATCACG-TACTGCTGATGCTCTTTTTTC 3'.

Oligo2: 5'TCGAGAAAAAAGAGCATCAGCAGTACGT GATTTCTCTTGAA AATCACGTA CTGCTGATGCTCA 3'.

2. sh4: Oligo 1: 5'TACAGGCCACATAGTCAACCTTTTCAAGAGAAAGGTT-GACTATGTGGCCTGTTTTTTTC 3'.

Oligo 2: 5'TCGAGAAAAAACAGGCCACATAGTCAAC CTTTCTCTTGAA AAGGTTGACTATGTGGCCTGTA 3'.

Los insertos (Sigma-Aldrich Merk, Darmstadt, Germany) fueron resuspendidos a una concentración de 100 μM , el oligo sentido y el antisentido fueron fosforilados con una cinasa a 37°C para poder promover la ligación al plásmido. Después del tiempo de incubación se dejó que la temperatura descendiera poco a poco. Se hizo la restricción del plásmido pLentiLox 3.7 durante tres horas con 2 μl de XhoI (100u/ml)

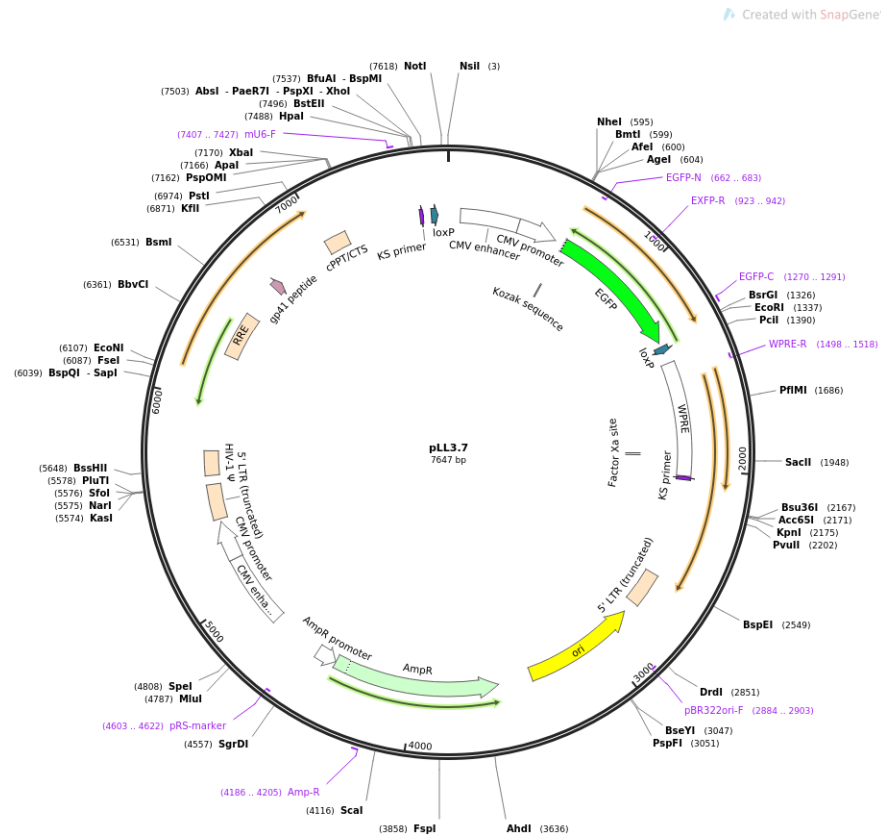


Figura 9.1: Mapa del plásmido pLentiLox 3.7. Obtenido de addgene

(New England biolabs, Ipswich, MA,USA) 4 μ l de HpaI (5000u/ml) (New England biolabs, Ipswich, Massachusetts,USA) y 2 μ g del plásmido. Se realizó el tratamiento con fosfatasa alcalina (New England biolabs, Ipswich, MA,USA) para evitar que el plásmido se vuelva a ligar. El plásmido se corrió en un gel de agarosa al 1% y se purificó el plásmido linealizado mediante un kit de purificación (Zymo research, Buenos Aires, Argentina). El plásmido puro se cuantificó mediante espectrometría (Nanodrop 2000, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se realizó la ligación a 16°C durante 12 hrs con cada uno de los insertos. La relación inserto-plásmido usada fue de 1:6. Una vez ligado el plásmido se transformó el plásmido mediante choque térmico en *E.colli*. Primero se colocaron 3 μ l de cada una de las construcciones en las bacterias, después se dejaron incubar en hielo por 30 min, posteriormente recibieron un choque térmico durante 45 seg a 52°C, se les colocó 250 μ l de medio Luria Bertani (LB) y se dejó que se recuperaran 1 h a 37°C en agitación. Posterior a la hora

de recuperación, las bacterias se sembraron en placas de agar LB con ampicilina, se sembraron dos placas por construcción una con 30 μ l de medio con las bacterias y la otra con el medio restante. A las 14 h se corroboró el crecimiento de las colonias. Se picaron 4 colonias por constructo y se sembraron en medio LB con ampicilina, se crecieron a 37°C durante 12-14 h. Posterior a la incubación se comprobó el crecimiento de las bacterias, se purificó el ácido desoxiribonucleico (por sus siglas en inglés DNA) mediante el kit de purificación de DNA (Zymo research, Irvin, CA, USA) y se cuantificó mediante espectrometría (Nanodrop 2000, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para comprobar si las clonas poseen el inserto se realizó una restricción con XbaI y NotI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) y se corrió en un gel de agarosa al 2%, la inserción causa un cambio de 60 bp en el fragmento que se cortó del plásmido clonado en comparación con el vector sin el inserto. Las posibles clonas se secuenciaron y una vez obtenida la secuencia se alinearon en Serial Cloner para comprobar si el inserto se encuentra en el vector.

9.2.5. Obtención de la línea celular knock down estable para el gen GPR30

. Una vez obtenidos los plásmidos con las construcciones deseados se procedió a obtener los lentivirus de shRNA para GPR30. Se sembraron células HEK 293TH17 en medio DMEM (Gibco ® Life Technologies) hasta obtener una confluencia de 70%, y en ese momento las células se transfectaron con lipofectamina 2000, 6 μ g de DNA de interés, junto con las proteínas de empaquetamiento del virus como: el plásmido que expresa la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular VSV-G, (pMD2G) (Addgene, Warrington, MA, USA) y el plásmido para empaquetamiento de virus psPAX2 (Addgene, Warrington, MA, USA). Esta transfección se dejó 24 h y se observó al microscopio después de este periodo. Cuando las células se observaban verdes tanto en el control LeGo como en las transfectadas con el shRNA para GPR30 se les cambió el medio y se dejaron crecer, a las 24 h se recuperó el medio tanto de las células control como en las transfectadas para el gen de interés, el medio se guardó a

4°C. Se les colocó medio nuevo a las células, se dejaron crecer 24 h más, se recolectó el medio y se juntó con el de 24 hrs antes. Para obtener los virus producidos por la células, se agregó polietilenglicol al medio recolectado y se centrifugó a 3000 RPM durante 1 h, se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla con los virus en 200 μ l de PBS estéril. Se elaboraron alícuotas de 20 μ l y se congelaron a -80°C. Durante los días que las células estuvieron produciendo los virus se documentó con fotos la transfección y la producción de virus.

Para realizar la transducción de las células C2C12, se sembraron mioblastos en placas de 6 pozos con medio completo a una confluencia del 30 % aproximadamente, se les colocó el virus, y se dejaron en la incubadora a 37 °C por un tiempo de 3 a 5 días. Se monitoreó la fluorescencia mediante microscopía. En el día 5 las células se despegaron y se resuspendieron en medio de crecimiento, este medio se colocó en un tubo de citometría. Las células se seleccionaron mediante el marcaje con GFP en un sorteador. Las células se recolectaron en un tubo nuevo de citometría con medio completo suplementado con suero fetal bovino al 20 %. Mediante esta técnica se separaron aquellas células que contienen el plásmido de las que no lo expresaban. Se obtuvieron aproximadamente 10,000 células control como células con shRNA para GPR30. Las células recién sorteadas se resembraron en frasco de 25 cm^2 y se dejaron crecer hasta obtener una cantidad suficiente para amplificarlas. Se sembró una caja de 6 pozos para cada una de las células, se diferenciaron, se lisaron unos pozos para determinar el contenido de la proteína GPR30 y otros para determinar la expresión tanto en células control como en células con el shRNA para GPR30.

9.2.6. Extracción de RNA y cuantificación relativa.

Se evaluó la expresión de GPR30 en la línea celular de miotúbulos C2C12 para determinar la efectividad de los shRNA en disminuir la expresión de GPR30. Se recolectaron muestras de los pozos del cultivo diferenciado tanto en las células transducidas con el lentivirus control como con los shRNA para GPR30. Se obtuvo RNA total mediante el reactivo de Trizol (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA;USA), utilizando 200 μ l cloroformo para separar las fases, 500 μ l de isopropanol

para precipitar el ácido ribonucleico (por sus siglas en inglés RNA) y 1 ml de etanol al 75 % para lavar la pastilla de RNA. Posterior al lavado la pastilla de RNA se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió en 20 μ l de agua libre de DNAsas y RNAsas. Una vez obtenido el RNA se cuantificó mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A partir del RNA se obtuvo DNA complementario (por sus siglas en inglés cDNA) mediante el uso de retrotranscripción; se utilizaron 3000 ng de RNA para realizar la reacción. Para realizar la cuantificación de la abundancia relativa del ácido ribonucleico mensajero (por sus siglas en inglés mRNA) se utilizó Syber Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y un equipo de reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) en tiempo real (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La expresión se determinó por triplicado y se utilizaron 150 ng/μ l del cDNA de cada una de las muestras y un par de oligonucleótidos (tabla 9.4) previamente diseñados para cada gen. Se utilizó el gen Rer1 y RPL27 para la normalización.

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
GPR30 (ratón)	5'TCATTCTGCCATGCACCCA	5'-GTGGACAGGGTGTCTGATGT
Rer1 (ratón)	5'-ACCGGAGCTGCGAGTTACA	5'-GGCTGTGTAGGGGGTAGACT
Rpl27 (ratón)	5'-TGTTTCAGGGACCCAGCTTTG	5'-CCCTGTCTTGTATCGCTCCTC

Tabla 9.4: Secuencias de Oligonucleotidos para realizar qPCR.

9.2.7. Análisis de contenido de proteína mediante Western blot.

En el caso de los experimentos realizados *in vitro*, para obtener la proteína total, tanto en la línea celular de miotúbulos C2C12 como el cultivo primario de mioblastos, las células se lavaron posterior al estímulo con amortiguador de PBS, se lisaron con amortiguador RIPA previamente suplementado con inhibidores fosfatasa y proteasas. Los cúmulos de células se disgregaron pasando el líquido a través de una aguja

de insulina. La proteína total se obtuvo por centrifugación a 14 000 RPM durante 20 minutos. El procedimiento para la cuantificación, preparación, separación de la muestra se llevó a cabo de la manera antes mencionada. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos específicos mencionados en la tabla 9.2, se usó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. La detección y análisis de las bandas se realizó con el mismo procedimiento usado en los tejidos.

Tipo Celular	Anticuerpo Primario	Concentración
Miotúbulos C2C12	AMPK(santa cruz biotechnology)	1:1250
Miotúbulos C2C12	pAMPK(santa cruz biotechnology)	1:1000
Miotúbulos primarios	AMPK(santa cruz biotechnology)	1:1250
Miotúbulos primarios	pAMPK(santa cruz biotechnology)	1:600
Todas las muestras de células	GAPDH(abcam Inc)	1:40000

Tabla 9.5: Lista de anticuerpos primarios usados en inmunoblots de muestras obtenidas de células.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	dilución
AMPK	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:10 000
pAMPK	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:5000-1:10000-1:7500
GAPDH	anti-rabbit IgG-H&L-HPR (abcam Inc)	1:20000-1:40000

Tabla 9.6: Lista de anticuerpos secundarios usados en inmunoblots muestras obtenidas de células.

9.3. Análisis estadístico.

Los resultados están presentados con promedios \pm SEMs. El análisis de dos grupos se realizó mediante una t de Student. El análisis de más de dos grupos se realizó mediante una ANOVA de dos vías en caso de comparar dos variables seguida de una prueba de diferencia de mínimos cuadrados protegida de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas con una $p < 0.05$.

Capítulo 10

Diseño Experimental

A continuación se presentan los diseños experimentales correspondientes a cada una de los ensayos llevados a cabo.

10.1. Diseño experimental *in vivo*

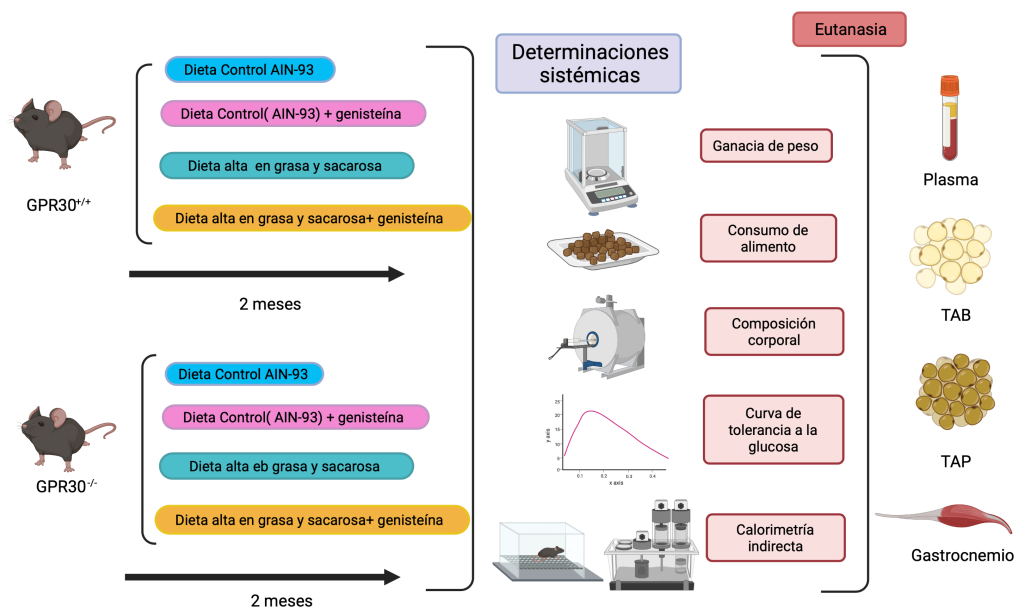


Figura 10.1: Diseño experimental del modelo *in vivo* en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}, Tejido adiposo Blanco (TAB), Tejido adiposo pardo (TAP).

10.2. Diseños experimentales *in vitro* y *ex vivo*

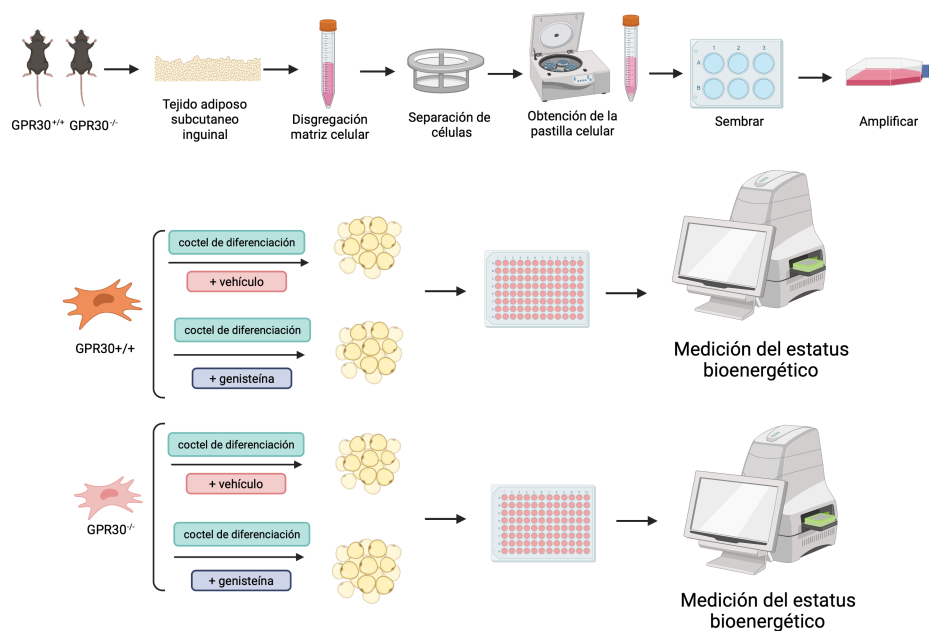


Figura 10.2: Diseño experimental de la respirometría en adipocitos de CEV TABi de ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ estimulados con genisteína. $n=5/7$ por grupo.

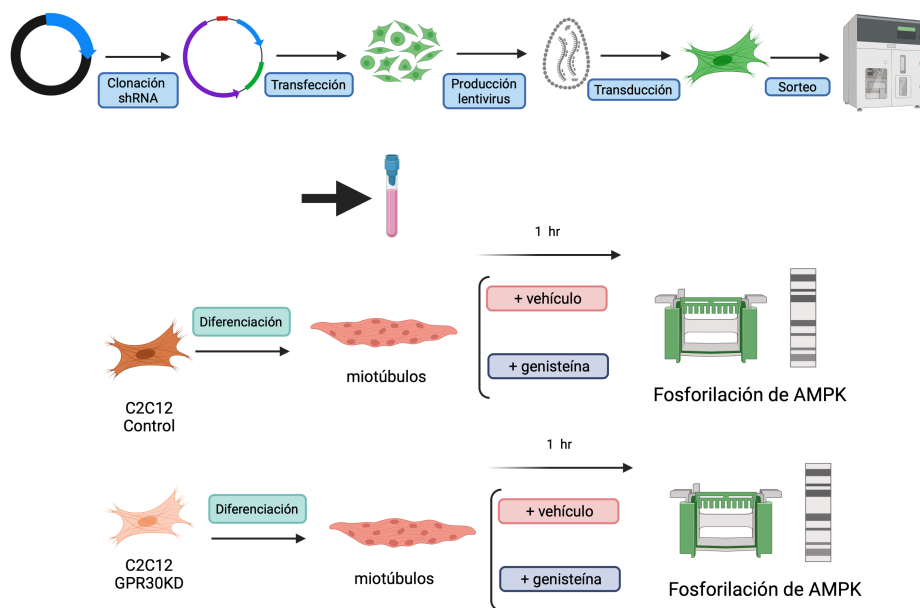


Figura 10.3: Diseño experimental sobre el desarrollo de una línea celular estable de miotúbulos C2C12 GPR30 KD.

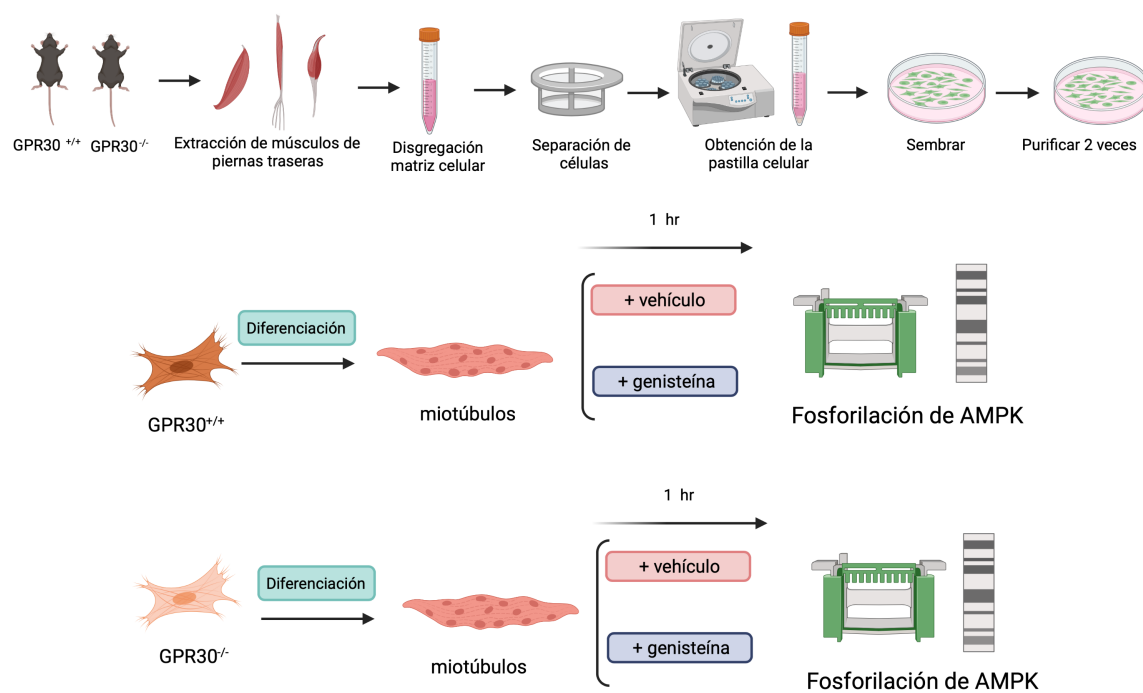


Figura 10.4: Diseño experimental sobre el cultivo primario de miotubulos $GPR30^{+/+}$, y $GPR30^{-/-}$.

Capítulo 11

Resultados

11.1. Evaluación del efecto de la genisteína sobre la ganancia de peso, composición corporal, y parámetros bioquímicos en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.

Para evaluar los efectos sistémicos de la genisteína, se determinó la ganancia de peso y parámetros bioquímicos en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} que consumieron una dieta control o DAGS con o sin genisteína durante 8 semanas. Como se puede observar en la gráfica (figura 11.1 A), los ratones que consumieron genisteína ganaron menos peso sin importar el genotipo, en el caso de los ratones GPR30^{+/+} la ganancia fue 59% menos y los GPR30^{-/-} 98.4% menos que sus controles. Las diferencias que existen entre los grupos que consumieron genisteína con respecto a los que no la consumieron, no se deben al consumo de alimento, ya que no existió diferencia significativa entre los grupos con respecto al consumo energético (figura 11.1 B). Ya que uno de los objetivos del trabajo fue determinar los efectos de la genisteína en un modelo de obesidad se evaluó si la genisteína modificaba el peso y la composición corporal, y si este efecto variaba en ausencia de GPR30 en los grupos alimentados con una DAGS. Como se ha observado en estudios anteriores [63, 64, 65], la DAGS incrementó la ganancia de peso ambos genotipos, sin embargo, se observó que esta ganancia dependía del la presencia o ausencia de GPR30 (figura 11.1 C). En ambos

casos la genisteína disminuyó la ganancia de peso, 58 % y 73 % en los GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} respectivamente. Las diferencias en el peso no se debieron a diferencias en el consumo de alimento (figura 11.1 D).

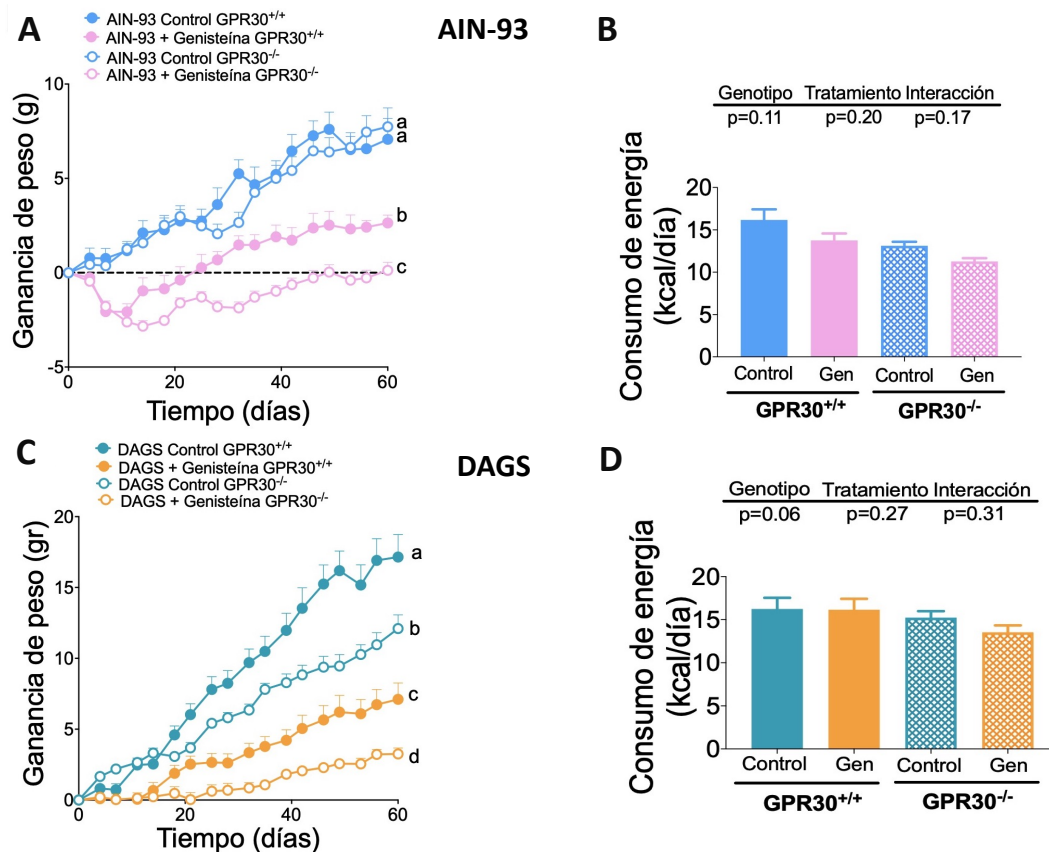


Figura 11.1: Ganancia de peso (AyC) y consumo calórico en ratones (ByD) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con dieta AIN-93 y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c > d$ indican las diferencias entre grupos. $n=7/8$ por grupo.

Un parámetro importante a evaluar en términos de balance energético, es la composición corporal, ya que tanto el tejido adiposo como músculo esquelético juegan un papel importante en este parámetro. Por esta razón, se determinó la composición corporal para ambos genotipos que consumieron dieta control con o sin genisteína. Los resultados mostraron que en ratones GPR30^{+/+} el consumo de genisteína disminuyó el porcentaje de grasa e incrementó la masa magra en un 4.8 % ($p=0.07$) y 6 % ($p=0.03$), en comparación con el grupo que no consumió genisteína (figura 11.2 A,B). Los ratones GPR30^{-/-} también presentaron una disminución de masa grasa corporal de

7.3 % ($p=0.008$) acompañado de un aumento en la masa magra en un 4.4 % ($p=0.06$) (figura 11.2 A,B).

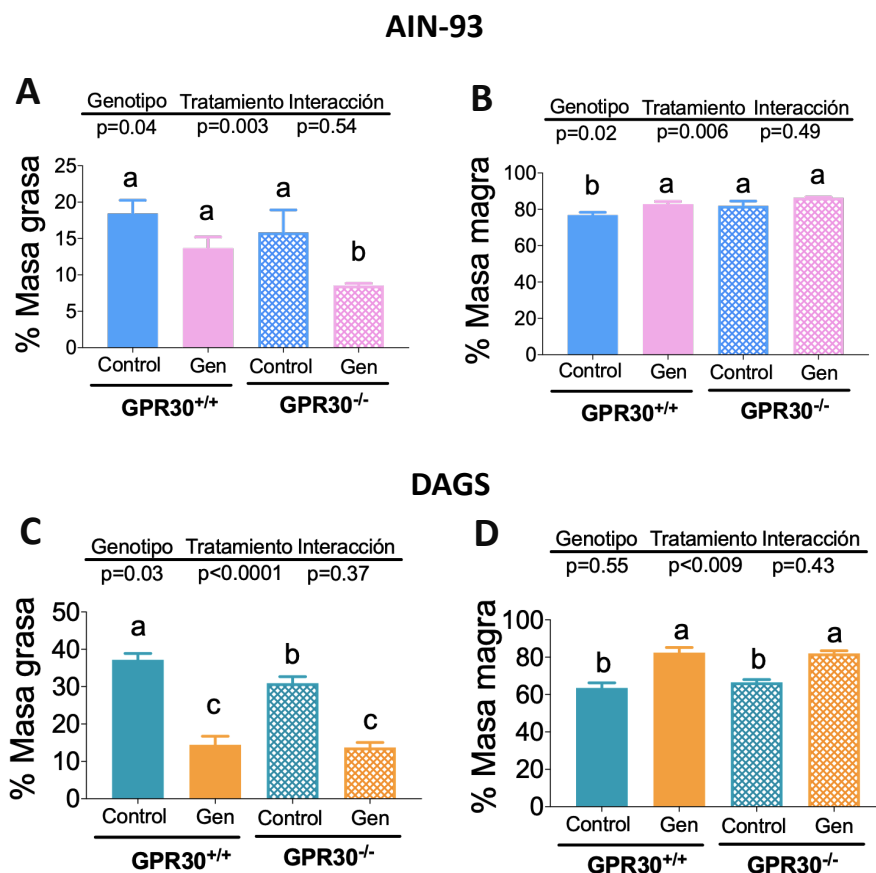


Figura 11.2: Porcentaje de masa grasa (AyC) y de masa magra (ByD) en ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ alimentados con dieta AIN-93 y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. $n=7/8$ por grupo.

Con respecto a la composición corporal en los animales que consumieron DAGS, la genisteína disminuyó el porcentaje de masa grasa en ambos genotipos e incrementó la ganancia de músculo en comparación con sus controles (figura 11.2 C,D). Con respecto a los parámetros bioquímicos tanto en ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ el consumo de una dieta control y genisteína mostró una tendencia en disminuir parámetros como insulina (figura 11.3 A), glucosa (figura 11.3 B) triglicéridos (figura 11.3 C) y colesterol (figura 11.3 D) (figura 11.3) pero no se observó diferencias significativas.

En el caso de los ratones alimentados con DAGS el consumo de genisteína dismi-

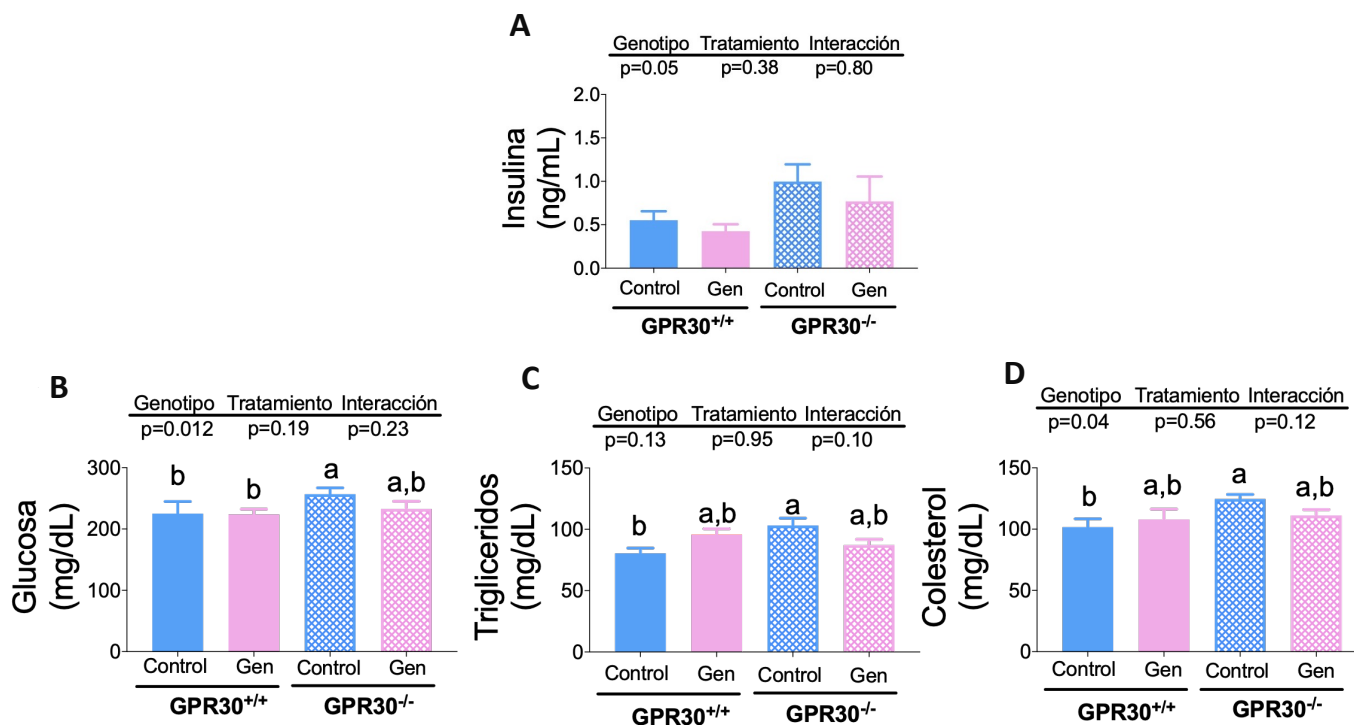


Figura 11.3: Parámetros bioquímicos, insulina (A), glucosa (B), triglicéridos (C) y Colesterol (D) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con dieta control con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. $n=7/8$ por grupo. $n=7/8$ por grupo.

nuyó las concentraciones de insulina plasmática en un 71 % en los ratones GPR30^{+/+} con respecto al grupo que solo consumió DAGS, en el caso de los ratones GPR30^{-/-} la genisteína solo redujo las concentraciones plasmáticas en un 51 % (figura 11.4 A). En relación a parámetros bioquímicos como glucosa, triglicéridos y colesterol, la genisteína redujo la glucosa y colesterol solo en ratones GPR30^{-/-} (figura 11.4 B,D), y en el caso de los ratones GPR30^{+/+} la genisteína redujo las concentraciones séricas de triglicéridos (figura 11.4 C), este efecto no se observó en los ratones con ausencia de GPR30. Para determinar con más exactitud el efecto de la genisteína se realizaron estudios sobre gasto energético en todos los grupos.

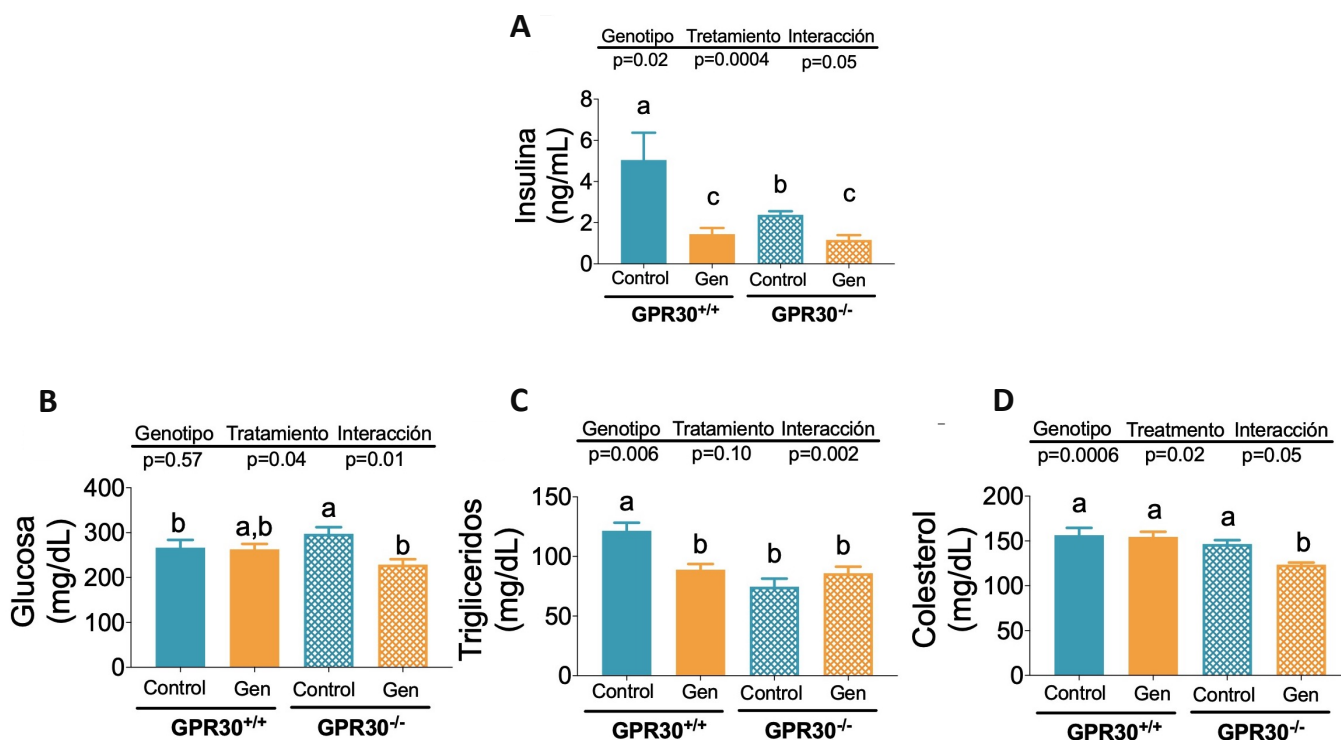


Figura 11.4: Parámetros bioquímicos, insulina (A), glucosa (B), triglicéridos (C) y Colesterol (D) en ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos. $n=7/8$ por grupo. $n=7/8$ por grupo.

11.2. Evaluación del efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.

Para poder entender el efecto de la genisteína sobre la termogénesis, el GE y el consumo de oxígeno (VO_2), se determinaron los cambios del VO_2 y del GE en relación a el peso y a la composición corporal de cada ratón, mediante un análisis de regresión lineal. Este análisis calcula el cambio en las pendientes de VO_2 y GE con respecto al cambio por unidad de peso (gr) o por masa grasa (gr) en fase de posprandio. El análisis se realizó tanto para ratones GPR30^{+/+} como para GPR30^{-/-} con ambos tipos de dieta con o sin genisteína. En el caso de los cambios en el VO_2 con respecto al peso, los cambios más notables se observaron en los ratones con dieta DAGS. Tanto en ratones GPR30^{+/+} como GPR30^{-/-} el consumo de genisteína incrementó el VO_2 ,

pero se observó que los ratones GPR30^{+/+} presentan mayores valores de VO₂ en comparación con los GPR30^{-/-}, tanto en los animales que consumieron genisteína como los que no la consumieron (figura 11.5). La pendiente de cambio de VO₂ con respecto a la cantidad de masa grasa en los GPR30^{+/+} fue negativa en el grupo control, indicando que conforme se aumenta la masa grasa el VO₂ disminuye, mientras que los ratones tratados con genisteína y dieta control mantuvieron la pendiente positiva. Este efecto solo se observó en el caso de los GPR30^{+/+} (figura 11.6), indicando que la genisteína incrementa el (VO₂) en el tejido adiposo y que este efecto solo se observa en presencia de GPR30, ya que los ratones GPR30^{-/-} tratados con genisteína tuvieron un pendiente negativa (figura 11.6). Esta tendencia se mantiene en los análisis de GE. En los ratones alimentados con DAGS, el (VO₂) fue el mismo con respecto a la cantidad de masa grasa en ambos genotipos. Notablemente, los ratones tratados con genisteína y con DAGS incrementaron el (VO₂) en 4.6 ml/hr por gramo de grasa para los ratones silvestres y solo 2 ml/hr en los ratones GPR30^{-/-} (figura 11.6). De manera semejante, la pendiente de cambio del GE por unidad de masa grasa (gr) tiene el mismo patrón de comportamiento que los observados para el (VO₂) (figura 11.6). Estos resultados indican que la genisteína incrementa el GE en la masa grasa y que la ausencia de GPR30 afecta parcialmente el efecto de la genisteína en el tejido adiposo.

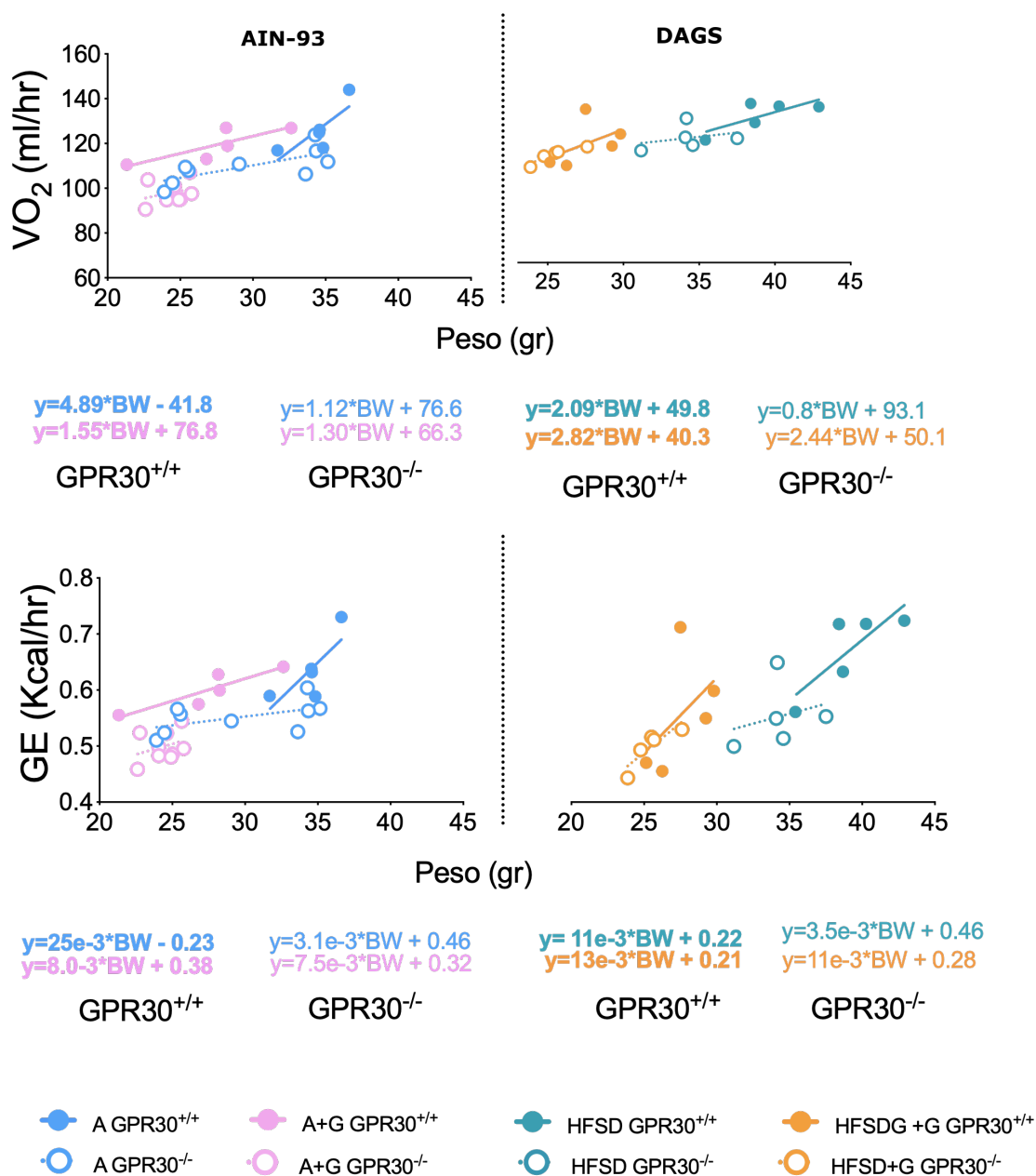


Figura 11.5: Efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno (arriba) y el GE (abajo) en relación con el cambio de peso corporal en ratones GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS, dieta control (A) dieta control más genisteína (A+G), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS+G), círculos llenos corresponden a ratones GPR30^{+/+}, círculos vacíos a ratones GPR30^{-/-}. n=5/8 por grupo.

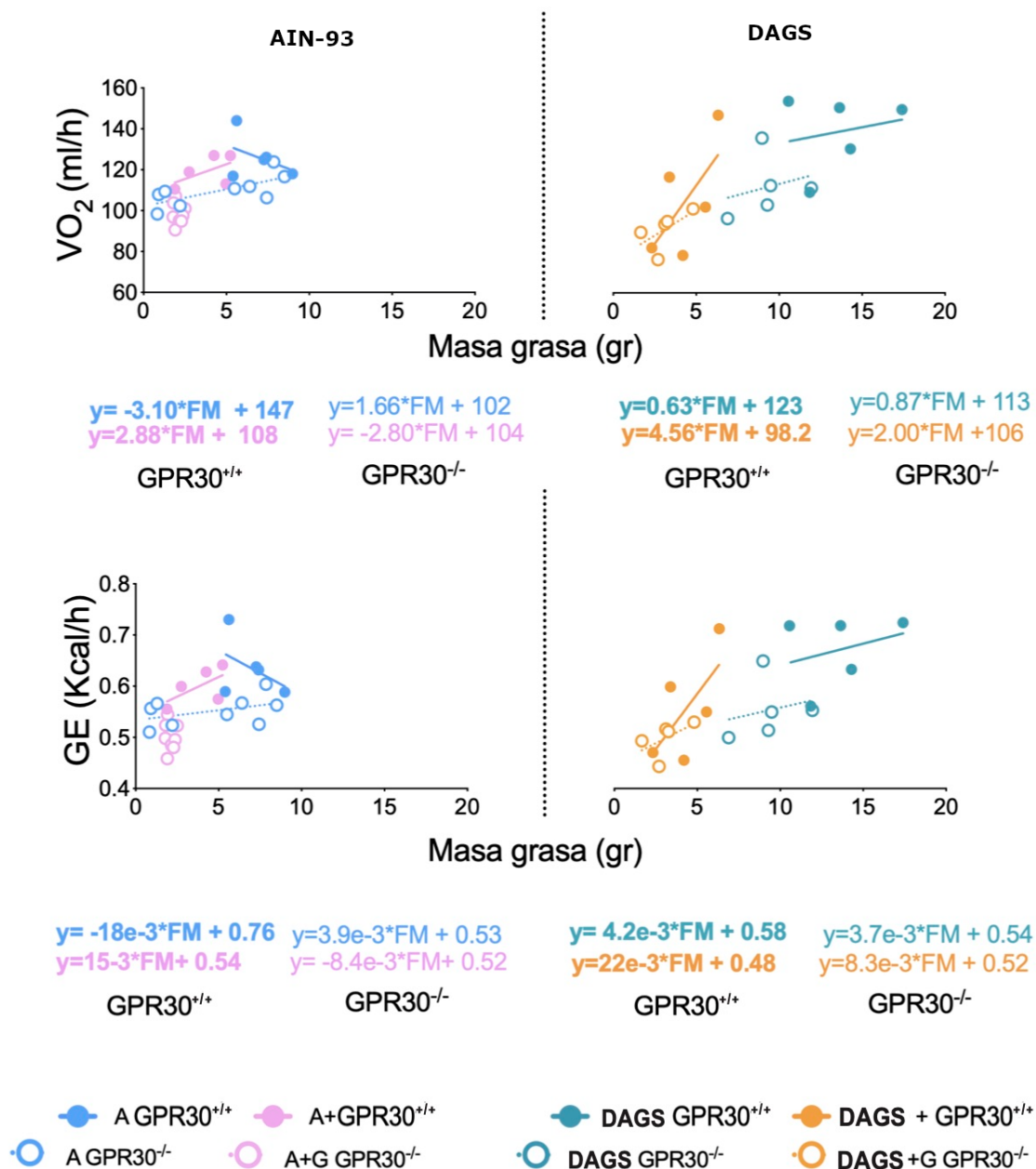


Figura 11.6: Efecto de la genisteína sobre el consumo de oxígeno (arriba) y el GE (abajo) en relación con el cambio en la masa grasa en ratones GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS, dieta control (A) dieta control más genisteína (A+G), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS), dieta alta en grasa y sacarosa (DAGS+G), círculos llenos corresponden a ratones GPR30^{+/+}, círculos vacíos a ratones GPR30^{-/-}. n=5/8 por grupo.

11.3. Determinación del efecto de la genisteína sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho GPR30^{+/+} y ratones GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control o DAGS.

Se ha demostrado que uno de los efectos benéficos de la genisteína es mejorar la tolerancia a la glucosa [4, 26] por lo que se estudió si el consumo de la genisteína modificaba este parámetro y si GPR30 está involucrado en su efecto. Los resultados demostraron que la genisteína mejoró la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta control y DAGS (figura 11.7 A,B,D,E), sin embargo esta mejora en la respuesta solo se observó en los ratones GPR30^{+/+}, no en los ratones GPR30^{-/-} (figura 11.7 A,B,D,E) . En el caso de la dieta control, los ratones GPR30^{+/+} alimentados con genisteína disminuyeron el área bajo la curva (ABC) en un 26.8% (figura 11.7 C), mientras que los alimentados con DAGS y genisteína la disminución fue de 39.3% (figura 11.7 F) en comparación con el grupo sin tratamiento. En ratones GPR30^{-/-} alimentados con DAGS la genisteína tiene una tendencia a disminuir el área bajo la curva, sin embargo no fue estadísticamente significativa (figura 11.7 F). Estos resultados sugieren que la mejora en la tolerancia a la glucosa promovida por la genisteína disminuye en ausencia de GPR30.

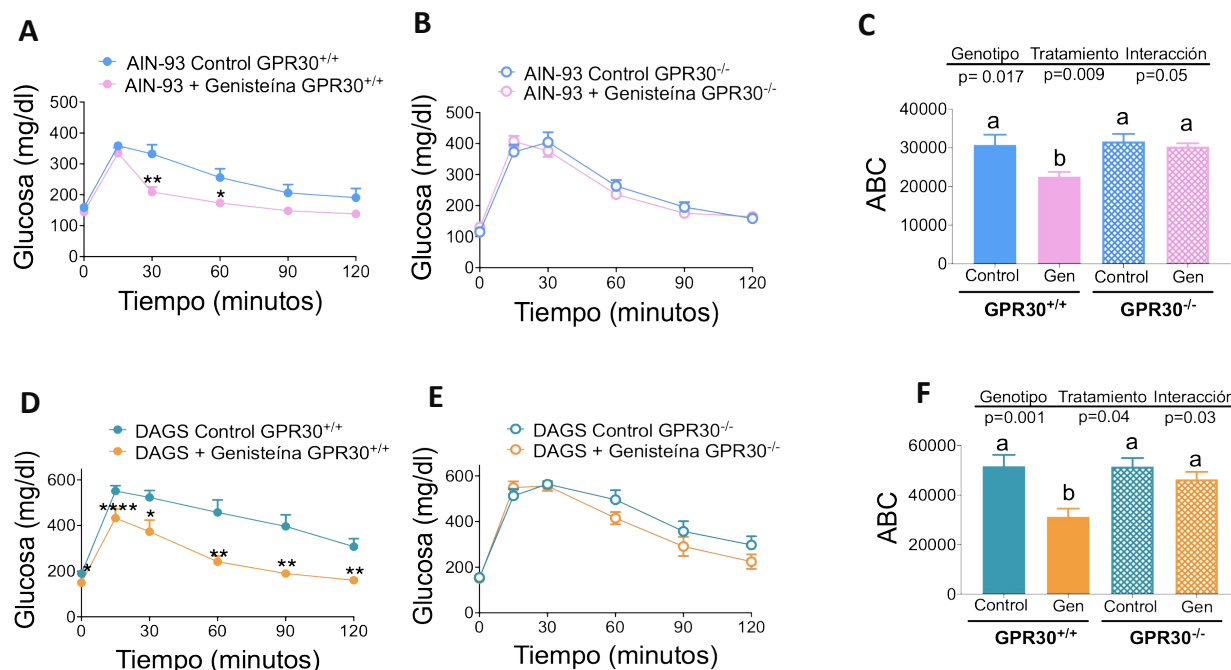


Figura 11.7: Curva de tolerancia a la glucosa (A,B,D,E) y área bajo la curva (C,F) de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} alimentados con una dieta control y DAGS con o sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. $n=7/8$ por grupo.

11.4. Evaluación del efecto de la genisteína en el estatus bioenergético en adipocitos blancos en ausencia y presencia de GPR30.

Para entender y profundizar en la importancia de los efectos de la genisteína sobre el tejido adiposo y el papel de GPR30 como mediador de estos efectos, se evaluó si la genisteína es capaz de incrementar el gasto energético mediante la activación del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}. Se analizó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (respirometría) de adipocitos obtenidos de células del estroma vascular (CEV) del tejido adiposo blanco inguinal inguinal de ambos genotipos (figura 10.2). Para demostrar la diferenciación de las CEV en adipocitos en ambos genotipos se realizó una tinción de bodipy y una tinción nuclear de Hoechst con el fin de contabilizar el número de adipocitos para cada condición (figura 11.8). El número de adipocitos obtenidos

de las células $GPR30^{-/-}$ fue significativamente menor en comparación con los provenientes de las células $GPR30^{+/+}$ (figura 11.9 A). En este resultado se observa que la genisteína disminuye la cantidad de adipocitos diferenciados en ambos genotipos, sin embargo el efecto es más notorio en los adipocitos $GPR30^{+/+}$ (figura 11.9 A). En la figura 11.9 B se observa que la disminución proporcional entre células tratadas con genisteína y su control correspondiente fue mayor en las células provenientes de los ratones $GPR30^{+/+}$, indicando un mayor efecto en células que expresan $GPR30$ (figura 11.9 B).

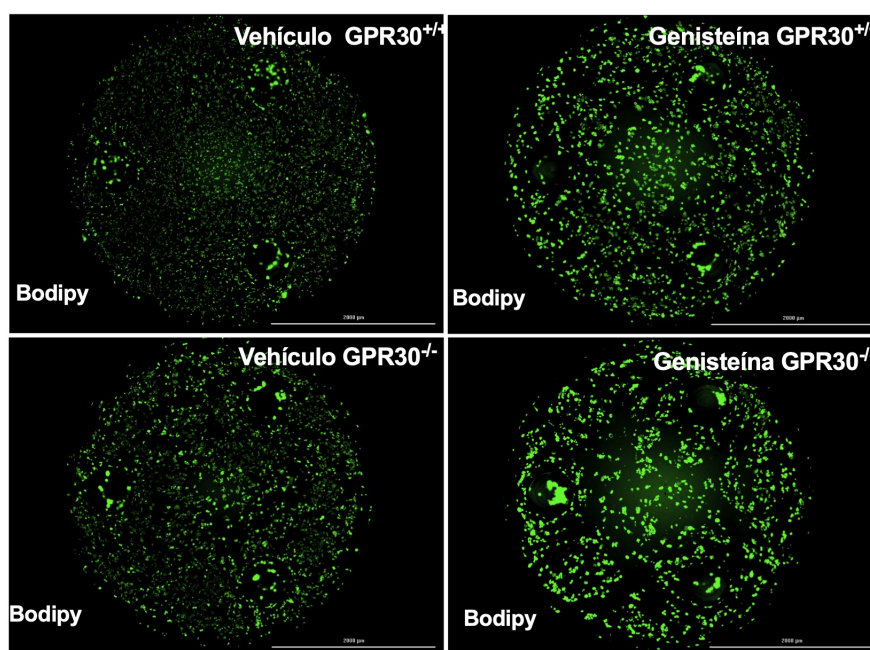


Figura 11.8: Adipocitos de CEV de TABi de ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ teñidos con Bodipy, tratados con y sin genisteína. $n=5/7$ por grupo.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de respirometría (figura 11.10 A) mostraron que los adipocitos estimulados con genisteína incrementaron la respiración máxima y la capacidad de reserva de las células de los ratones $GPR30^{+/+}$. En adipocitos $GPR30^{+/+}$ la genisteína incrementó la respiración máxima en un 85 % y la capacidad de reserva en un 150 % (figura 11.10 B,C). La genisteína no fue capaz de incrementar estos parámetros en adipocitos $GPR30^{-/-}$ (figura 11.10 B,C). Es notable que, en los adipocitos $GPR30^{-/-}$ sin estímulo la respiración máxima y la capacidad de reserva están más elevadas que en los adipocitos $GPR30^{+/+}$. En el caso de la

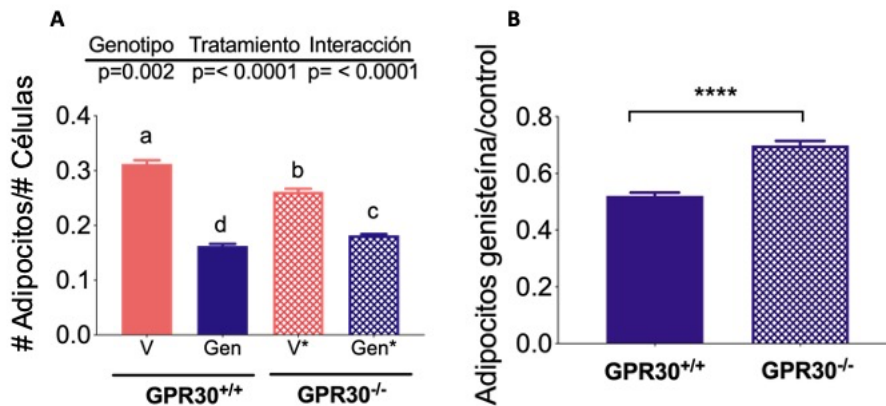


Figura 11.9: Número de adipocitos (A) y efecto de la genisteína en la de diferenciación (B) de adipocitos de CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c > d$ indican las diferencias entre grupos **** $p < 0.0001$. $n=5/7$ por grupo.

respiración no-mitocondrial la genisteína fue capaz de disminuir este parámetro sólo en las células GPR30^{+/+} (figura 11.11 A). Este parámetro está relacionado con la respiración no dependiente de la mitocondria, es decir aquel metabolismo asociado principalmente a procesos glucolíticos, lo que indica que la genisteína promueve el incremento en el metabolismo oxidativo sólo en adipocitos GPR30^{+/+}. La respiración basal en adipocitos GPR30^{+/+} estimulados con genisteína solo tiende a incrementarse con respecto a su control, en cambio en adipocitos GPR30^{-/-} este parámetro está incrementado significativamente (figura 11.11 B). La respiración asociada a la producción de ATP es incrementada por la genisteína sin importar el genotipo (figura 11.11 C). No se observaron cambios en la respiración relacionada en la fuga de protones sin importar el tratamiento o genotipo (figura 11.11 D). Estos resultados indican que los efectos de la genisteína sobre la respiración mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva se ven afectados en la ausencia de GPR30. Contrariamente, el incremento en la respiración asociada a la producción de ATP no se afecta con la ausencia de GPR30 (figura 11.11 D).

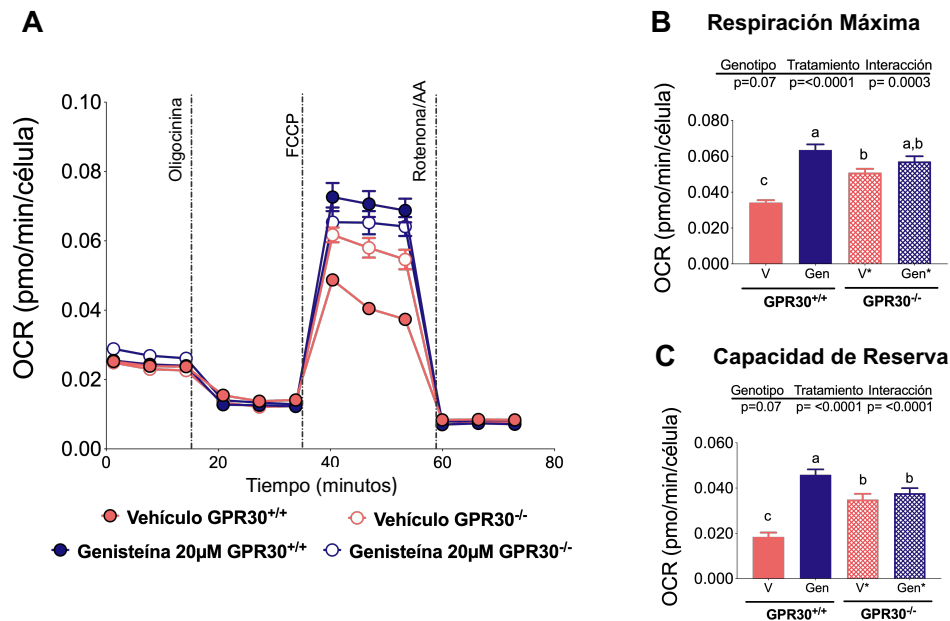


Figura 11.10: Curso temporal del ensayo de mito-estrés (derecha) respiración no mitocondrial y capacidad de reserva (izquierda) de adipocitos del CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos, $n=5/7$ por grupo.

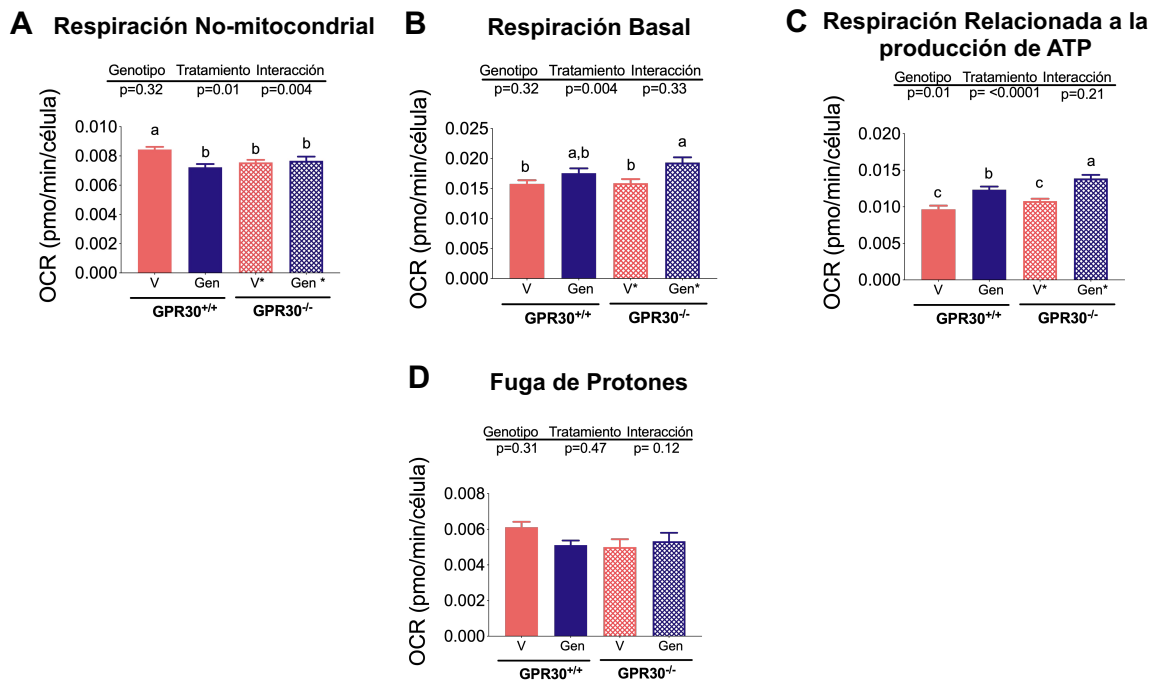


Figura 11.11: Respiración basal (A), Respiración no-mitocondrial (B), Fuga de protones (C) y respiración relacionada a la producción de ATP de adipocitos del CEV del TABi de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b > c$ indican las diferencias entre grupos $n=5/7$ por grupo.

11.5. Determinación de la abundancia de marcadores asociados a la termogénesis en TABi y TAP en ratones macho $GPR30^{+/+}$ y ratones $GPR30^{-/-}$ alimentados con una dieta control o DAGS.

Para determinar el efecto de la genisteína en marcadores asociados a la termogénesis se evaluó el contenido de proteína de UCP1, *PGC1 α* , TBX-1, PRDM16 y CIDEA en el TABi y TAP. En el TABi de los ratones $GPR30^{+/+}$ la genisteína incrementó significativamente la abundancia de UCP1 y de los otros marcadores evaluados, tanto en los ratones que consumieron genisteína con dieta control como con DAGS, siendo mas notorio el efecto en los ratones alimentados con DAGS (figura 11.12 y 11.13). En el caso de los ratones $GPR30^{-/-}$ alimentados con la dieta control la abundancia de UCP1 mostró una tendencia a incrementarse sin ser significativa ($p= 0.09$), en cambio los animales $GPR30^{-/-}$ alimentados con DAGS la abundancia de proteína de UCP1 mostró un pequeño pero significativo incremento de 56 % en comparación con el grupo que no consumió genisteína (figura 11.12, y 11.13). En relación a los demás marcadores de beiging, no se observó diferencia significativa en los ratones $GPR30^{-/-}$ que consumieron genisteína, sin importar el tipo de alimentación (figuras 11.12 y 11.13). Mediante estos análisis se observó que en el TABi de ratones $GPR30^{-/-}$, la proteína *PGC1 α* se encuentra basalmente incrementada comparación con los ratones $GPR30^{+/+}$, principalmente en el caso de los animales alimentados con DAGS.

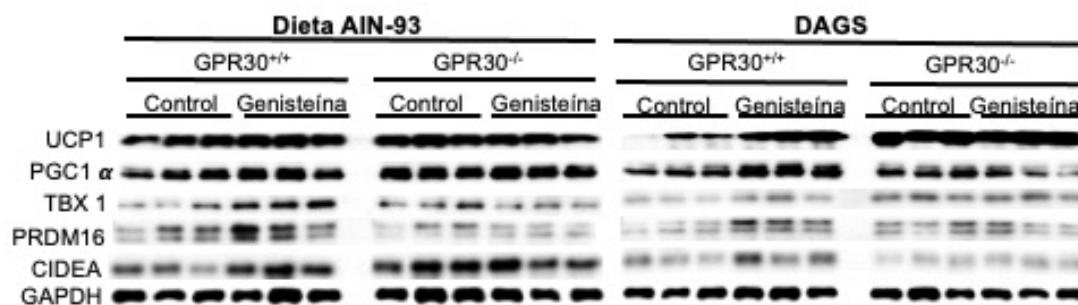


Figura 11.12: Blot representativo del TABi de las proteínas UCP1, *PGC1 α* , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TABi de ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ con dieta control y DAGS con y sin genisteína. n=4 por grupo.

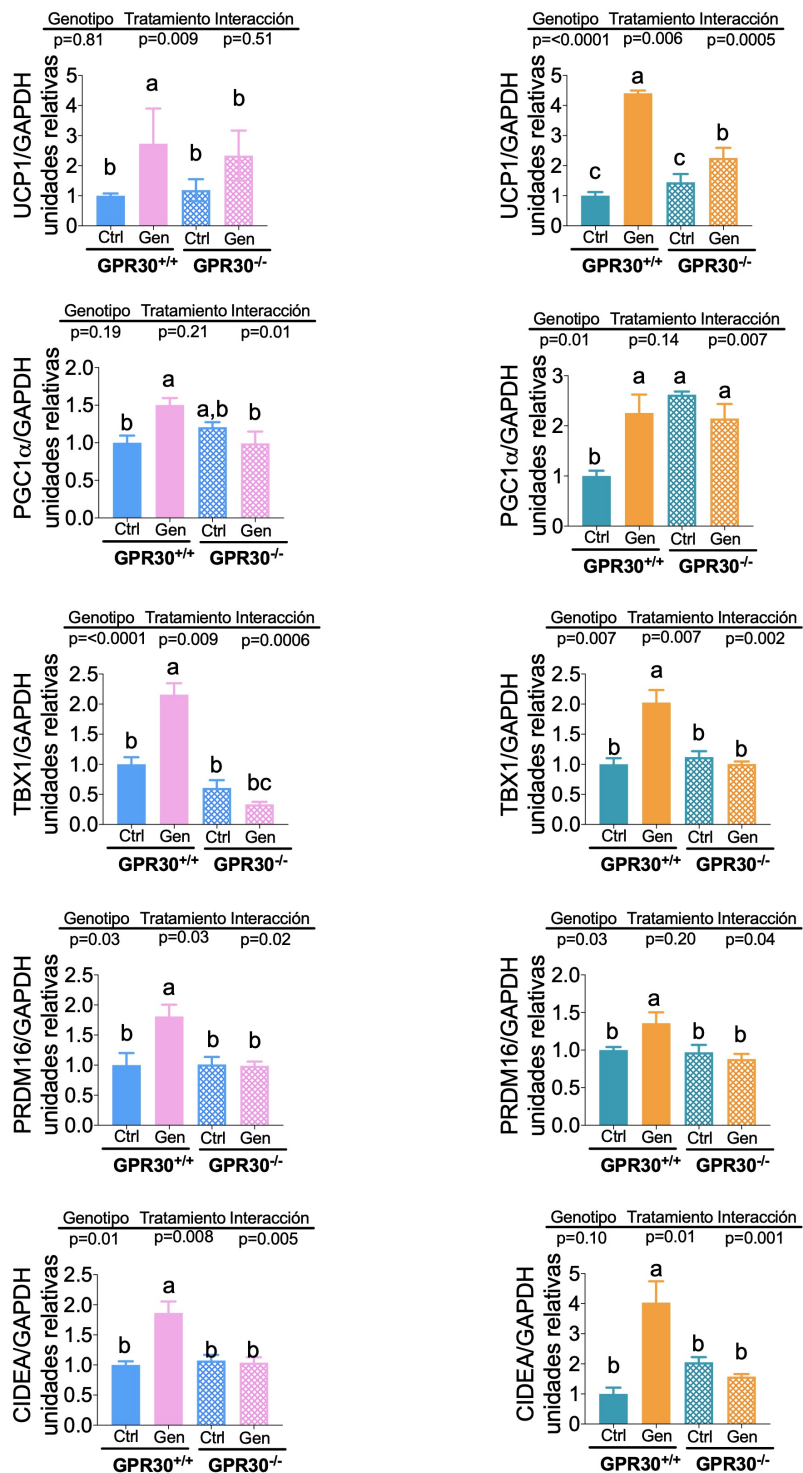


Figura 11.13: Análisis densitométrico de UCP1, PGC1 α , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TABi de ratones *GPR30*^{+/+} y *GPR30*^{-/-} con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, $n=4$ por grupo.

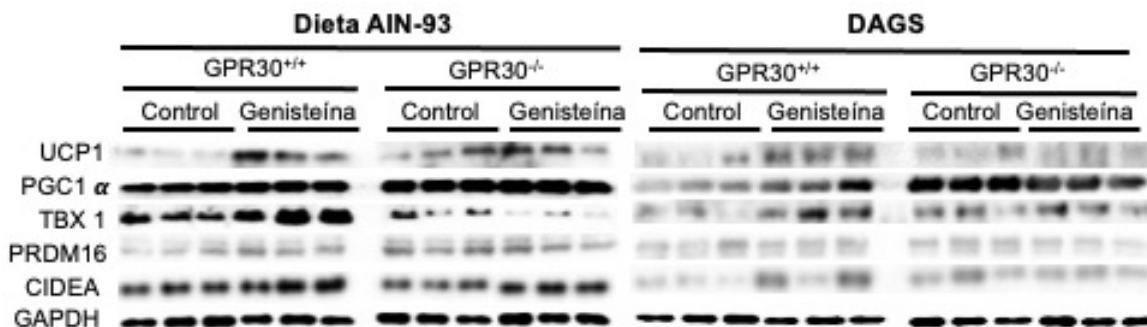


Figura 11.14: Blot representativo del TAP de las proteínas UCP1, *PGC1α*, TBX1, PRDM16 y CIDEA del TAP de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} con dieta control y DAGS con y sin genisteína. n=4 por grupo.

En el caso del TAP el contenido de UCP1 y de las otras proteínas termogénicas incrementó significativamente con el consumo de genisteína, tanto en UCP1 como en las demás proteínas evaluadas; este efecto sólo se observó en el caso de los ratones GPR30^{+/+} que consumieron genisteína sin importar el tipo de dieta (figura 11.14 y 11.15). En conjunto estos resultados indican que, la ausencia de GPR30 afecta en parte la mejora en la función mitocondrial promovida por la genisteína, y por lo tanto la mejora en el incremento del metabolismo oxidativo. De igual manera el incremento en la abundancia proteica de ciertos marcadores relacionados al beiging y la termogénesis como consecuencia del consumo de genisteína se ven disminuidos en ausencia de GPR30.

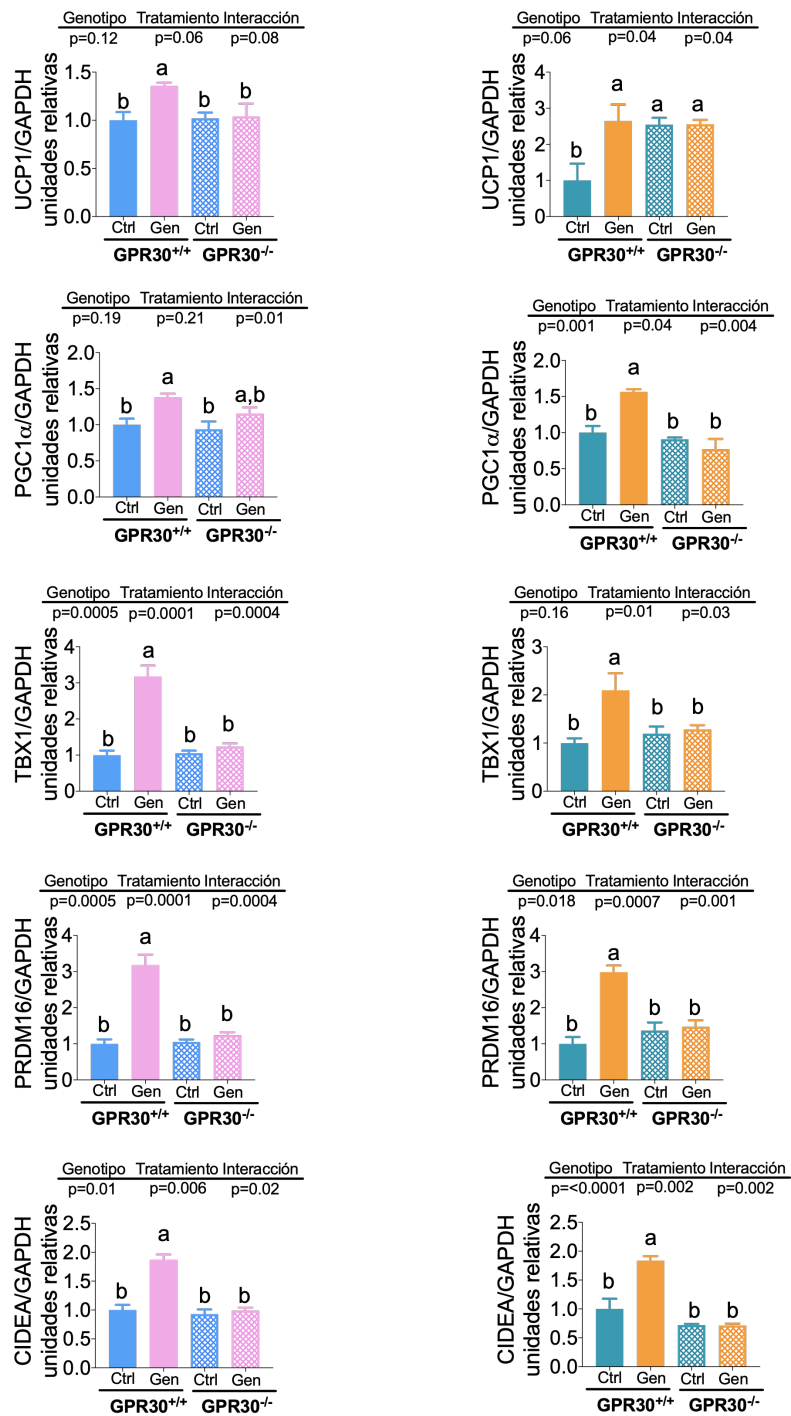


Figura 11.15: Análisis densitométrico de UCP1 *PGC1 α* , TBX1, PRDM16 y CIDEA del TAP de ratones *GPR30*^{+/+} y *GPR30*^{-/-} con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genistéina. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, $n=4$ por grupo. $n=4$ por grupo.

11.6. Evaluar el efecto de la genisteína sobre la fosforilación de AMPK en ratones macho $GPR30^{+/+}$ y ratones $GPR30^{-/-}$ alimentados con una dieta control y DAGS.

El músculo esquelético es uno de los principales órganos involucrados en la captación de glucosa y por lo tanto en la tolerancia de la misma. Adicionalmente, en estudios previos se ha demostrado que la genisteína tiene la capacidad de promover la fosforilación de AMPK, lo que incrementa la oxidación de ácidos grasos y mejora la tolerancia a la glucosa [4, 6]. Se determinó la fosforilación de esta cinasa en músculo esquelético de ambos genotipos con ambas dietas con o sin genisteína. Los resultados muestran que la genisteína incrementa la fosforilación de AMPK en los $GPR30^{+/+}$ en una magnitud mayor que en los $GPR30^{-/-}$ (figura 11.16), este efecto fue mas claro en los grupos de los ratones que consumieron una DAGS (figura 11.16). Esto nos indica que la fosforilación de AMPK por efecto de la genisteína disminuye parcialmente en ausencia de GPR30, esto podría explicar en parte los resultados observados en la curva de tolerancia a la glucosa.

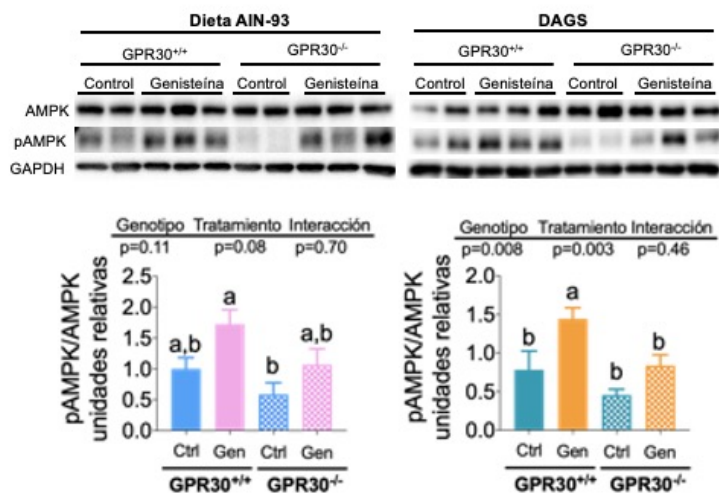


Figura 11.16: BLot representativo de AMPK y pAMPK de músculo esquelético de ratones $GPR30^{+/+}$ y $GPR30^{-/-}$ con dieta control (izquierda) y DAGS (derecha) con y sin genisteína. Los resultados están presentados con promedio \pm SEM donde $a > b$ indican las diferencias entre grupos, $n=4/5$ por grupo.

11.7. Evaluación de la fosforilación de AMPK en modelos *in vitro* de músculo esquelético GPR30 Knock down y en un modelo *ex vivo* en presencia y ausencia de GPR30.

Con el objetivo de profundizar en el papel que tiene GPR30 al mediar los efectos de la genisteína en el músculo en relación con la fosforilación de AMPK se utilizaron dos estrategias para evaluar este papel. Se desarrolló un modelo *in vitro* de músculo esquelético de la línea celular C2C12 que expresa menos GPR30 establemente (figura 10.3, sección: diseño experimental). Este modelo se implementó creando un lentivirus que exprese un shRNA para GPR30 e infectando con el virus las células C2C12. Para la creación del lentivirus que expresa shRNA para el gen GPR30 se utilizó el vector LeGo y lo insertos previamente diseñados. Se realizó la restricción, alineación, purificación y ligación de los plásmidos, y para comprobar las clonas se realizó una restricción con XbaI y NotI. Posterior a la restricción, se corrieron las muestras en un gel de agarosa. La inserción de las secuencias causa un cambio de 60 pares de bases (pb) en el fragmento que se cortó con respecto al fragmento del vector original. Para la obtención de al menos dos vectores con dos secuencias posibles para el shRNA se realizaron diferentes repeticiones. Las posibles clonas aparecen en los siguientes gels (figura 11.17).

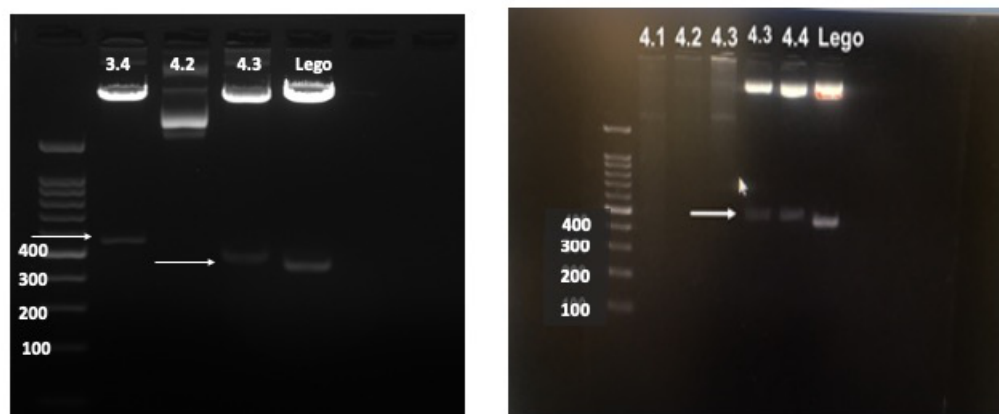


Figura 11.17: Gel de agarosa, después de una restricción para comprobar el inserto en las clonas obtenidas. Clona de shRNA 3 (derecha), clona del shRNA 4 (izquierda).

Una vez obtenido las posibles clonas las muestras se secuenciaron. Los resultados de la secuenciación fueron alineados con los insertos diseñados y se observó que existe una coincidencia del 100 % entre los plásmidos secuenciados y las secuencias diseñadas (figura 11.18).

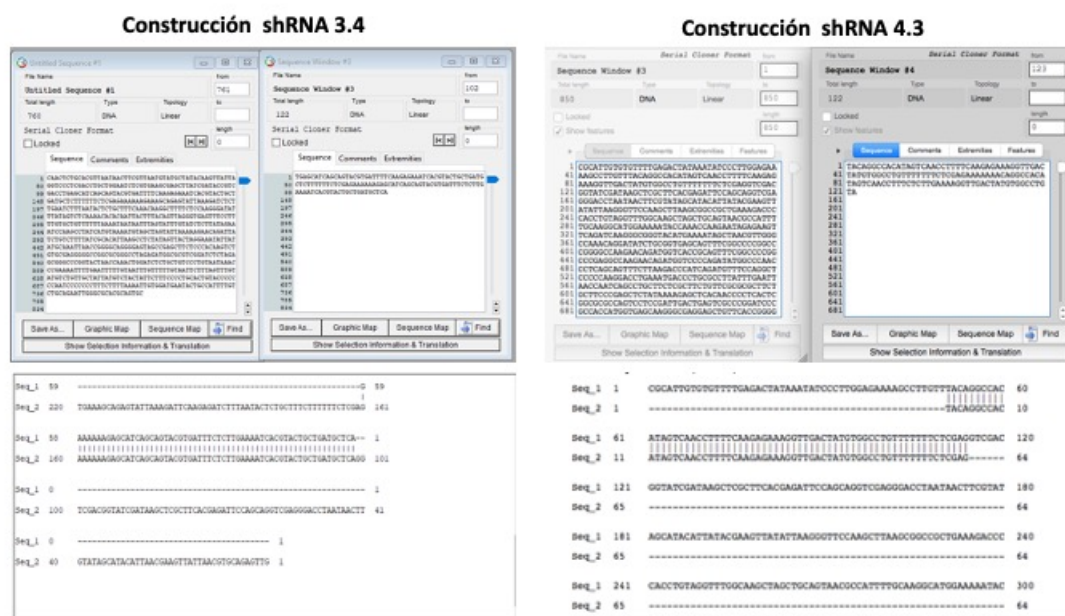


Figura 11.18: Alineamiento de las clonas secuenciadas y los insertos para shRNA 3 y shRNA 4.

Posterior a la obtención de los plásmidos, se sintetizaron los virus usando células HEK293 T17, el shRNA de las construcciones 3 y 4, y los plásmidos de los genes psPax y PM2D.G para sintetizar el virus. Estos virus se emplearon para transducir los mioblastos C2C12. Se seleccionaron las células que expresan el plásmido mediante sorteo usando el marcador GFP, cultivadolas y diferenciando a miotúbulos para realizar los experimentos. El modelo muestra que la transducción con el virus shRNA para GPR30 (shRNA-GPR30) disminuye la expresión del receptor en un 63 % en la construcción 3 y un 58 % en la construcción 4 (figura 11.19 A) por lo que se determinó el contenido de GPR30 en la construcción con menor expresión en este caso la número 3. Como se observa en la figura 11.19 B, existe una disminución del 60 % del contenido proteico de GPR30 con respecto a las células control, por lo que se utilizó la construcción 3 para los siguientes experimentos denominada como GPR30 KD.

Las células se crecieron y se diferenciaron para realizar el ensayo. Con este mo-

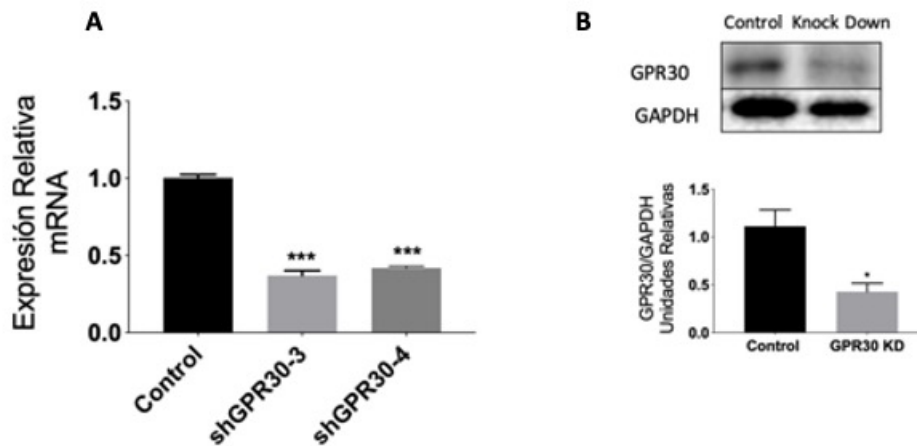


Figura 11.19: Expresión y abundancia protéica de GPR30 en mioblastos C2C12 transducidos con el control y con el shGPR30 3. n=3/4 por grupo. Los asteriscos indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$.

delo se evaluó la fosforilación de AMPK en presencia de distintas concentraciones de genisteína en células C2C12 diferenciadas control y GPR30 KD. Se estimuló las células por 1 h, tiempo reportado anteriormente en el cuál la genisteína incrementa la fosforilación de AMPK en esta línea celular [6]. En los resultados se observa que, solo en células control, la genisteína a concentraciones pequeñas y fisiológicas de $0.3 \mu\text{M}$ induce un incremento en la fosforilación de AMPK, lo que no se observa en células GPR30 KD (figura 11.20). Cabe destacar que el contenido basal de AMPK en las células GPR30 KD es alto en comparación con las de las células control. Debido a que el modelo usado tiene un porcentaje de disminución en la expresión de GPR30 de el 60 %, se empleó un modelo *ex vivo* de mioblastos del músculo esquelético de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} para evaluar la fosforilación de AMPK en completa ausencia de GPR30 (figura 10.4, sección: diseño experimental).

Se obtuvieron los mioblastos extraídos del conjunto de músculos de las patas traseras de ratones de ambos genotipos. Las células se obtuvieron mediante la disgregación y separación de la matriz extracelular y se purifican dos veces posterior a la extracción. Los mioblastos de ambos genotipos se amplificaron y posteriormente se diferenciaron para obtener miotúbulos. Se evaluó la fosforilación de AMPK en respuesta a distintas concentraciones de genisteína durante 1 hora (h) en los miotúbulos primarios de ratones GPR30^{+/+}, y GPR30^{-/-}. Al igual que en el modelo *in vitro* de

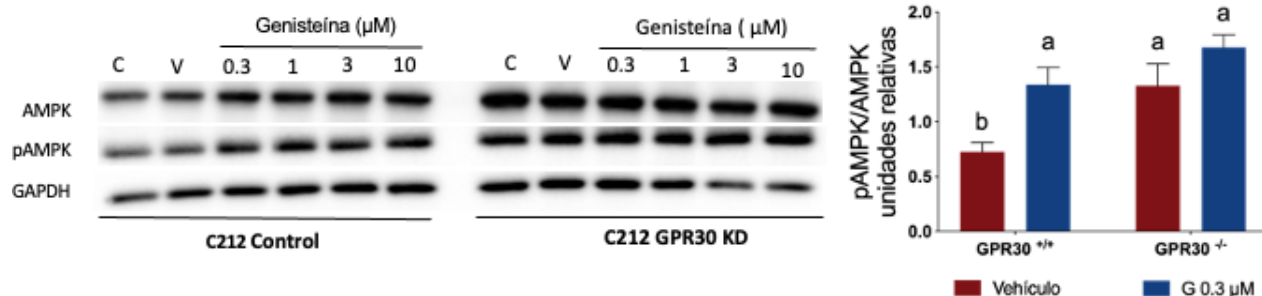


Figura 11.20: Blot de la fosforilación de AMPK en mioblastos C2C12 control y GPR30 KD en presencia de genisteína. n=3 por grupo. Las letras indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$.

miotúbulos silenciados para GPR30, los resultados reflejan que en comparación con las células estimuladas con el vehículo, el efecto de la genisteína a concentraciones pequeñas ($0.3 \mu\text{M}$) sobre la inducción de la fosforilación de AMPK solo se observa en los miotúbulos GPR30^{+/+}, no en los GPR30^{-/-} (figura11.21). Este resultado nos indica que en ausencia de GPR30 la inducción de la fosforilación de AMPK por efecto de la genisteína en el músculo esquelético no esta presente. Estos resultados concuerdan con los resultados *in vivo* previamente mencionados en este trabajo, donde la fosforilación de AMPK en respuesta a la genisteína se encuentra disminuida en los ratones GPR30^{-/-} en comparación con los ratones GPR30^{+/+}.

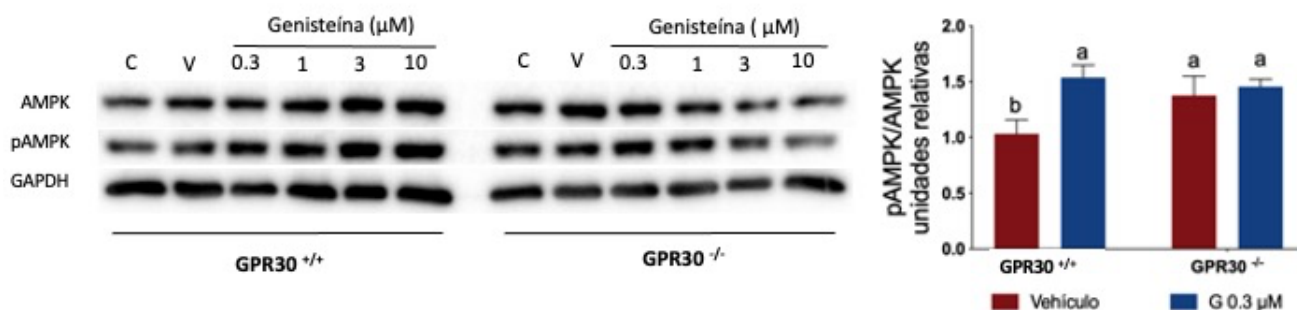


Figura 11.21: BLot de al fosforilación de AMPK en mioblastos de cultivo primario de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. n=3 por grupo. Las letras indican la diferencia entre grupos $a > b > c > d$.

Capítulo 12

Discusión

En la actualidad existe un esfuerzo mundial por buscar estrategias y alternativas que contribuyan al tratamiento de enfermedades metabólicas como la obesidad, la resistencia en la insulina, la diabetes y enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios realizados en diferentes modelos en animales y humanos indican que el consumo de la genisteína incrementa el GE e incrementa el programa termogénico en el TAB [4, 5, 26]. Aunado a esto, la genisteína tiene la capacidad de mejorar la tolerancia a la glucosa, incrementar la oxidación de ácidos grasos y mejorar la función mitocondrial incrementando de esta manera el metabolismo oxidativo en el tejido adiposo [26, 5, 4]. A pesar de que se sugiere que varios de los efectos benéficos anteriormente mencionados son debidos a la activación del programa termogénico y a la mejora en la actividad mitocondrial, se desconoce como es que la genisteína promueve estos efectos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la ausencia de GPR30 disminuye la magnitud de algunos efectos promovidos por la genisteína, incluso se observó que la falta de GPR30 disminuyó de manera significativa la mejoría de algunos parámetros que se producen por el consumo de genisteína. El papel de GPR30 en los distintos tejidos todavía se encuentra en estudio, pero el hecho de que este receptor se exprese en distintos órganos, especialmente los relacionados con funciones metabólicas, indica que este receptor tiene un papel importante en la homeostasis energética [59, 66]. En este estudio se observó que los ratones GPR30^{-/-} tienen una tendencia a ganar menos peso que los ratones GPR30^{+/+}. Se ha reportado que GPR30

está involucrado en la adipogénesis, por lo que su ausencia inhibe la diferenciación de adipocitos, la acumulación de grasa y la ganancia de peso. Sin embargo este efecto solo se ha observado hasta ahora en hembras con deficiencia de este receptor [41]. Este aspecto podría explicar el por qué los ratones $GPR30^{-/-}$ que se estudiaron en el presente proyecto no ganaron tanto peso como los ratones que sí expresan el receptor. Se observó que tanto en los ratones $GPR30^{+/+}$ como en los $GPR30^{-/-}$ la genisteína disminuyó la ganancia de peso sin importar el genotipo o dieta. Esto también se observó con respecto a la acumulación de masa grasa, siendo estos efectos no debidos a la ingesta calórica ya que no hubo diferencia en el consumo entre los distintos grupos. La genisteína tuvo efectos similares con respecto al peso y el porcentaje de grasa, sin embargo los cambios fueron de diferente magnitud entre los diferentes genotipos. De forma particular, se observó que el efecto de la genisteína en cada genotipo modificó de manera diferente el porcentaje de masa grasa. Se observó una disminución en la masa grasa de los ratones $GPR30^{-/-}$ que consumieron dieta control con genisteína, sin embargo el efecto de la genisteína en los ratones con DAGS fue más grande en los ratones $GPR30^{+/+}$ en comparación con el efecto observado en los $GPR30^{-/-}$ alimentados con la misma dieta. Se utilizaron análisis de regresión lineal para determinar el cambio de las pendientes y por lo tanto el comportamiento del VO_2 y del GE con respecto al cambio en la ganancia de peso y grasa de cada ratón. Estos análisis son usados para tener una perspectiva más precisa de lo que sucede en diferentes tejidos y establecer las diferencias entre genotipos [67, 68, 69]. Como se puede apreciar en los análisis de regresión lineal, en los ratones $GPR30^{+/+}$ que consumieron una dieta control o una DAGS, la genisteína incrementó el consumo de VO_2 y el GE. Este efecto no se observó en el caso de los ratones $GPR30^{-/-}$ alimentados con dieta control y se vió disminuido en el caso del grupo que consumió DAGS. Esto concuerda con lo reportado previamente, que indica que los ratones $GPR30^{-/-}$ tienen un menor gasto energético con respecto a los $GPR30^{+/+}$ [61]. En este estudio se pudo demostrar que esta diferencia entre genotipos con respecto al efecto de la genisteína está relacionada con el consumo de VO_2 y del GE en el tejido adiposo, y que este efecto se pierde parcialmente como se observó en los ratones $GPR30^{-/-}$. Habiendo observado

que existen diferencias entre los genotipos respecto al efecto de la genisteína en el tejido adiposo, y ya que la actividad mitocondrial forma parte del incremento del metabolismo de este tejido consecuencia de la activación de la termogénesis, resultó importante estudiar esta actividad mitocondrial, por lo que se decidió profundizar en este aspecto realizando análisis de respirometría en adipocitos provenientes del CEV de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-} estimulados con genisteína. Durante la diferenciación de las CEV se observó que los adipocitos provenientes de las células de los ratones GPR30^{-/-} muestran menos cantidad de células diferenciadas, lo cual puede explicarse con el hecho de que GPR30 juega un papel importante en la adipogénesis y que su ausencia afecta este proceso[41]. Con respecto al estudio del estatus bioenergético de los adipocitos, en este estudio se observó que la genisteína es capaz de incrementar la respiración máxima y la capacidad de reserva de las células GPR30^{+/+}. El aumento en estos parámetros indica que la capacidad oxidativa de la células adiposas se incrementa en respuesta al estímulo de la genisteína, efecto que solo se observa en los adipocitos GPR30^{+/+}. Otro parámetro relacionado al incremento en la actividad mitocondrial es la respiración-no mitocondrial, una disminución en este parámetro indica que procesos metabólicos relacionados principalmente con la glucólisis están disminuidos, lo que indica que la mayor parte de la actividad metabólica proviene de la actividad mitocondrial. En este estudio se observó que la genisteína disminuyó la respiración no-mitocondrial en células GPR30^{+/+} y no en las GPR30^{-/-}, indicando que hay un incremento en los procesos metabólicos llevados a cabo por la mitocondria, los cuales incrementan con la presencia de la genisteína en adipocitos GPR30^{+/+}. Existen efectos que no se ven afectados por la ausencia de GPR30, ya que se observó que la genisteína incrementa el consumo de oxígeno relacionado a la producción ATP en ambos genotipos. Adicionalmente se notó que los adipocitos GPR30^{-/-} tiene una respiración máxima basalmente incrementada, esto puede deberse a un mayor contenido mitocondrial, lo que coincide con el incremento observado en el contenido de proteína de *PGC1α* en el TABi con respecto al de los ratones GPR30^{+/+}, pero se necesitan más estudios para determinar la causa de este comportamiento. Ya que se observó que existen diferencias en el consumo de VO₂, tanto en mediciones *in vivo* e

in vitro entre los genotipos y con el antecedente de que la genisteína incrementa el beiging, se evaluó marcadores relacionados con este proceso. Como se ha reportado previamente, se observó [4, 5] que la genisteína incrementó el contenido de UCP1 y de otros marcadores en el TABi y TAP de los ratones GPR30^{+/+} que consumieron genisteína en ambas dietas, sin embargo, este incremento no se observó en los ratones GPR30^{-/-}. El incremento en la proteína UCP1 está relacionado con un incremento en la capacidad oxidativa, principalmente en la oxidación de ácidos grasos [70]. En el presente estudio también se observó en un modelo *in vitro* que la genisteína incrementó parámetros relacionados con la capacidad oxidativa celular y que estos incrementos solo se dieron en los adipocitos GPR30^{+/+} ya que este efecto se perdió en las células GPR30^{-/-}. Este hallazgo coincide con lo observado en la calorimetría, donde el efecto de la genisteína sobre el VO₂ consumido con respecto a la cantidad del tejido adiposo de los ratones GPR30^{-/-} es menor en comparación con lo observado en los GPR30^{+/+}, indicando que la presencia de GPR30 interviene parcialmente en la promoción de ciertos efectos de la genisteína sobre el tejido adiposo. Un órgano importante sobre el cual actúa la genisteína y que está relacionado con la tolerancia a la glucosa, es el músculo esquelético [6]. Estudios previos han demostrado que en modelos animales y humanos la genisteína mejora este parámetro [26, 4]. Se ha observado [4] que la genisteína, además de incrementar el beiging y actuar sobre el tejido adiposo, también incrementa la tolerancia a la glucosa. En ratones GPR30^{+/+} se observó que sin importar el tipo de dieta, la genisteína mejora la tolerancia a la glucosa y disminuye el área bajo la curva (ABC) de manera significativa en comparación con los ratones que no fueron alimentados con genisteína. Es importante mencionar que este efecto solo se observó en los ratones que expresan GPR30 y no en los ratones GPR30^{-/-}, en donde la genisteína no mejoró este parámetro. Estudios previos han reportado que este efecto puede estar relacionado con el incremento en la fosforilación de AMPK [6]. La activación de AMPK está relacionada con la estimulación de las vías catabólicas, como la activación de la oxidación de ácidos grasos, e incluso con la biogénesis mitocondrial [52, 71]. Se realizó la medición de la fosforilación de AMPK, que es la forma activa de esta enzima, en músculo esquelético de ambos genotipos con

las distintas dietas, tanto con y sin genisteína. En este resultado se observó que el mayor efecto se presentó en los ratones con DAGS en donde la genisteína incrementó la fosforilación de AMPK en ratones GPR30^{+/+}, sin embargo este efecto se perdió en los ratones GPR30^{-/-}. Estos hallazgos observados *in vivo* se corroboraron *in vitro* y *ex vivo*. La disminución de GPR30 en la línea celular de mioblastos C2C12 muestra que una disminución del 63% de la expresión de GPR30 promueve que el efecto de la genisteína en la fosforilación de AMPK se vea disminuido, algo que no sucede en las células control en donde la genisteína induce el incremento en la fosforilación de AMPK. Por último, este mismo aspecto se observó en los cultivos celulares de mioblastos de cultivo primario provenientes de músculo de ratones GPR30^{+/+} y GPR30^{-/-}, en donde la fosforilación de AMPK por efecto de la genisteína se incrementa en los miotúbulos provenientes de los ratones GPR30^{+/+}, pero se pierde en los miotúbulos que no expresan el receptor, indicando que GPR30 interviene en el incremento de la fosforilación de AMPK en el músculo por efecto de la genisteína. Estos resultados concuerdan con los resultados observados *in vivo* en donde la ausencia de GPR30 afecta la fosforilación de AMPK en respuesta a la genisteína.

Capítulo 13

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto de la genisteína sobre el incremento en el VO_2 y el GE en el tejido adiposo principalmente blanco se ve afectado o disminuido en ausencia de GPR30. La ausencia de GPR30 disminuye el efecto de la genisteína sobre parámetros como la respiración máxima y la capacidad de reserva, parámetros que indican la facultad de la célula para incrementar su capacidad oxidativa. Estos datos asociados al incremento de la expresión de UCP1, TBX1, PRDM16 y CIDEA observados en el TABi y TAP de ratones GPR30^{+/+} principalmente alimentados con DAGS y genisteína sugieren que GPR30 parcialmente media los efectos de la genisteína en el tejido adiposo.

Con respecto a la tolerancia a la glucosa, la genisteína mejora la tolerancia en los ratones GPR30^{+/+} lo que no se observa en los GPR30^{-/-}, esto podría explicarse con los resultados observados en la fosforilación de AMPK tanto en el modelo *in vivo* como en el *in vitro* y *ex vivo*, donde se observa que la inducción en la fosforilación de AMPK promovida por genisteína disminuye con la ausencia de GPR30.

Estos resultados en conjunto demuestran que GPR30 interviene parcialmente como mediador de los efectos de la genisteína sobre el tejido adiposo y que la ausencia de este receptor disminuye los efectos de este compuesto en el músculo esquelético.

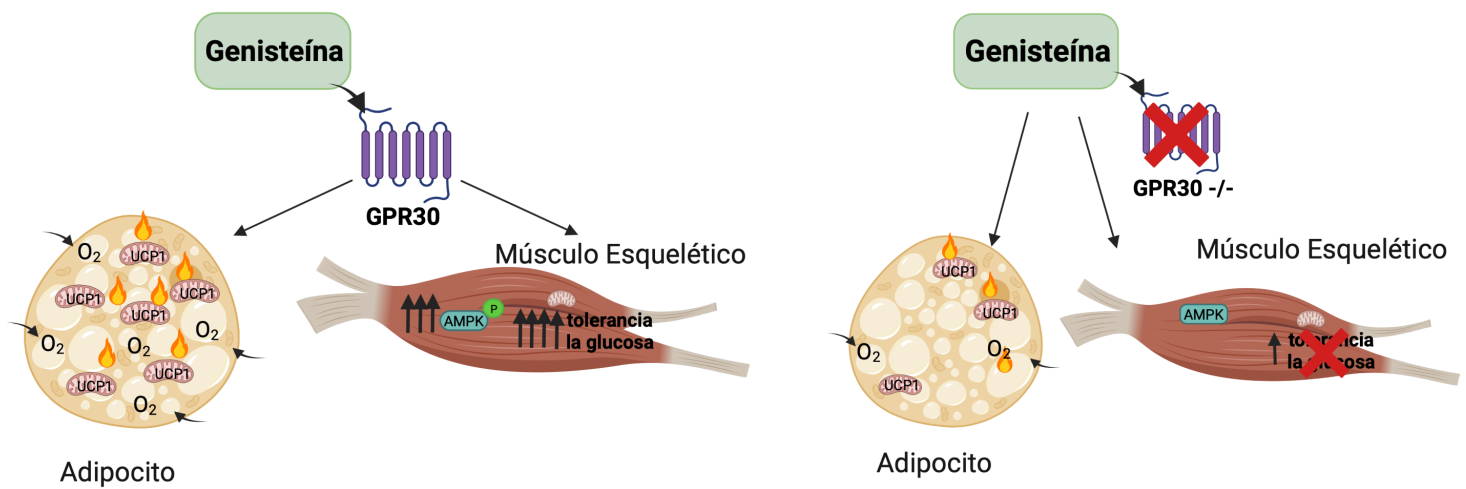


Figura 13.1: Efecto de la genisteína sobre el tejido adiposo y músculo esquelético en presencia y ausencia de GPR30

Bibliografía

- [1] Paul Lee, Sheila Smith, Joyce Linderman, Amber B Courville, Robert J Brychta, William Dieckmann, Charlotte D Werner, Kong Y Chen, and Francesco S Celi. Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, 63(11):3686–3698, November 2014.
- [2] Takeshi Yoneshiro, Sayuri Aita, Mami Matsushita, Takashi Kayahara, Toshimitsu Kameya, Yuko Kawai, Toshihiko Iwanaga, and Masayuki Saito. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.*, 123(8):3404–3408, August 2013.
- [3] Matthew Harms and Patrick Seale. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.*, 19(10):1252–1263, October 2013.
- [4] Patricia López, Mónica Sánchez, Claudia Perez-Cruz, Laura A Velázquez-Villegas, Tauqeerunnisa Syeda, Miriam Aguilar-López, Ana K Rocha-Viggiano, María Del Carmen Silva-Lucero, Ivan Torre-Villalvazo, Lilia G Noriega, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Long-term genistein consumption modifies gut microbiota, improving glucose metabolism, metabolic endotoxemia, and cognitive function in mice fed a high-fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.*, 62(16):e1800313, August 2018.
- [5] Berenice Palacios-González, Ariana Vargas-Castillo, Laura Alejandra Velázquez-Villegas, Sarai Vasquez-Reyes, Patricia López, Lilia G Noriega, Gabriela Aleman, Claudia Tovar-Palacio, Iván Torre-Villalvazo, Li-Jun Yang, Angel Zarain-Herzberg, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Genistein increases the thermo-

- genic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice. *J. Nutr. Biochem.*, 68:59–68, June 2019.
- [6] Berenice Palacios-González, Angel Zarain-Herzberg, Isabel Flores-Galicia, Lilia G Noriega, Gabriela Alemán-Escondrillas, Teresa Zariñan, Alfredo Ulloa-Aguirre, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1841(1):132–140, January 2014.
- [7] Geetanjali Sharma, Chelin Hu, Jonathan L Brigman, Gang Zhu, Helen J Hathaway, and Eric R Prossnitz. GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology*, 154(11):4136–4145, November 2013.
- [8] Geetanjali Sharma and Eric R Prossnitz. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 152(8):3030–3039, August 2011.
- [9] Marcello Maggiolini, Adele Vivacqua, Giovanna Fasanella, Anna Grazia Recchia, Diego Sisci, Vincenzo Pezzi, Daniela Montanaro, Anna Maria Musti, Didier Picard, and Sebastiano Andò. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 279(26):27008–27016, June 2004.
- [10] Jing Luo, Aihua Wang, Wei Zhen, Yao Wang, Hongwei Si, Zhenquan Jia, Hana Alkhalidy, Zhiyong Cheng, Elizabeth Gilbert, Bin Xu, and Dongmin Liu. Phytonutrient genistein is a survival factor for pancreatic β -cells via GPR30-mediated mechanism. *J. Nutr. Biochem.*, 58:59–70, August 2018.
- [11] Matthias Blüher. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 15(5):288–298, May 2019.

- [12] Lindsay M Jaacks, Stefanie Vandevijvere, An Pan, Craig J McGowan, Chelsea Wallace, Fumiaki Imamura, Dariush Mozaffarian, Boyd Swinburn, and Majid Ezzati. The obesity transition: stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 7(3):231–240, March 2019.
- [13] André Tchernof and Jean-Pierre Després. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.*, 93(1):359–404, January 2013.
- [14] Atilla Engin. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 960:1–17, 2017.
- [15] David W Haslam and W Philip T James. Obesity. *Lancet*, 366(9492):1197–1209, October 2005.
- [16] Wouter D van Marken Lichtenbelt and Patrick Schrauwen. Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 301(2):R285–96, August 2011.
- [17] James O Hill, Holly R Wyatt, and John C Peters. Energy balance and obesity. *Circulation*, 126(1):126–132, July 2012.
- [18] Sung Sik Choe, Jin Young Huh, In Jae Hwang, Jong In Kim, and Jae Bum Kim. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 7:30, April 2016.
- [19] Alexandros Vegiopoulos, Maria Rohm, and Stephan Herzig. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.*, 36(14):1999–2017, July 2017.
- [20] Liangyou Rui. Brown and beige adipose tissues in health and disease. *Compr. Physiol.*, 7(4):1281–1306, September 2017.
- [21] Alexander Bartelt and Joerg Heeren. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 10(1):24–36, January 2014.

- [22] Alina Kuryłowicz and Monika Puzianowska-Kuźnicka. Induction of adipose tissue browning as a strategy to combat obesity. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(17):6241, August 2020.
- [23] A Kaisanlahti and T Glumoff. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem.*, 75(1):1–10, February 2019.
- [24] Sasan Amanat, Mohammad Hassan Eftekhari, Mohammad Fararouei, Kamran Bagheri Lankarani, and Seyed Jalil Massoumi. Genistein supplementation improves insulin resistance and inflammatory state in non-alcoholic fatty liver patients: A randomized, controlled trial. *Clin. Nutr.*, 37(4):1210–1215, August 2018.
- [25] Rui Yang, Qiang Jia, Shomaila Mehmood, Shanfeng Ma, and Xiaofen Liu. Genistein ameliorates inflammation and insulin resistance through mediation of gut microbiota composition in type 2 diabetic mice. *Eur. J. Nutr.*, 60(4):2155–2168, June 2021.
- [26] Martha Guevara-Cruz, Einar T Godinez-Salas, Monica Sanchez-Tapia, Gonzalo Torres-Villalobos, Edgar Pichardo-Ontiveros, Rocio Guizar-Heredia, Liliana Arteaga-Sanchez, Gerardo Gamba, Raul Mojica-Espinosa, Alejandro Schcolnik-Cabrera, Omar Granados, Adriana López-Barradas, Ariana Vargas-Castillo, Ivan Torre-Villalvazo, Lilia G Noriega, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Genistein stimulates insulin sensitivity through gut microbiota reshaping and skeletal muscle AMPK activation in obese subjects. *BMJ Open Diabetes Res. Care*, 8(1):e000948, March 2020.
- [27] Berenice Palacios-González, Angel Zarain-Herzberg, Isabel Flores-Galicia, Lilia G Noriega, Gabriela Alemán-Escondrillas, Teresa Zariñan, Alfredo Ulloa-Aguirre, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1841(1):132–140, January 2014.

- [28] Eric R Prossnitz, Jeffrey B Arterburn, and Larry A Sklar. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 265-266:138–142, February 2007.
- [29] IUPSThermal Commission. Iupsthermal commission. glossary of terms for thermal physiology. *3rd ed, J Therm Biol.*, 28:75–106, 2003.
- [30] Max Kleiber. Body size and metabolism. *Hilgardia*, 6(11):315–353, January 1932.
- [31] Barbara Cannon and Jan Nedergaard. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.*, 84(1):277–359, January 2004.
- [32] S L J Wijers, W H M Saris, and W D van Marken Lichtenbelt. Recent advances in adaptive thermogenesis: potential implications for the treatment of obesity. *Obes. Rev.*, 10(2):218–226, March 2009.
- [33] Nedergaard J Cannon B. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem.*, 20:111–163, february 1985.
- [34] Ariana Vargas-Castillo, Rebeca Fuentes-Romero, Leonardo A Rodriguez-Lopez, Nimbe Torres, and Armando R Tovar. Understanding the biology of thermogenic fat: Is browning a new approach to the treatment of obesity? *Arch. Med. Res.*, 48(5):401–413, July 2017.
- [35] Long Cheng, Jingkang Wang, Hongyu Dai, Yuhui Duan, Yongcheng An, Lu Shi, Yinglan Lv, Huimin Li, Chen Wang, Quantao Ma, Yaqi Li, Pengfei Li, Haifeng Du, and Baosheng Zhao. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte*, 10(1):48–65, December 2021.
- [36] Joan Sanchez-Gurmaches, Chien-Min Hung, and David A Guertin. Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol.*, 26(5):313–326, May 2016.

- [37] Nevena Jeremic, Pankaj Chaturvedi, and Suresh C Tyagi. Browning of white fat: Novel insight into factors, mechanisms, and therapeutics. *J. Cell. Physiol.*, 232(1):61–68, January 2017.
- [38] D G Nicholls and R M Locke. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.*, 64(1):1–64, January 1984.
- [39] Kenji Ikeda, Pema Maretich, and Shingo Kajimura. The common and distinct features of brown and beige adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.*, 29(3):191–200, March 2018.
- [40] Rezaee F. Role of adipose tissue in metabolic system disorders. *J. Diabetes Metab.*, 01(S13), 2013.
- [41] Wenshan Wang and Patrick Seale. Control of brown and beige fat development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17(11):691–702, November 2016.
- [42] A Rodríguez, S Becerril, S Ezquerro, L Méndez-Giménez, and G Frühbeck. Cross-talk between adipokines and myokines in fat browning. *Acta Physiol. (Oxf.)*, 219(2):362–381, February 2017.
- [43] Xin Cui, Ngoc Ly T. Nguyen, Eleen Zarebidaki, Qiang Cao, Fenfen Li, Lin Zha, Timothy Bartness, Hang Shi, and Bingzhong Xue. Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. *Physiological Reports*, 4(10):e12799, 2016.
- [44] Hyun Cheol Roh, Linus T. Y. Tsai, Mengle Shao, Danielle Tenen, Yachen Shen, Manju Kumari, Anna Lyubetskaya, Christopher Jacobs, Brian Dawes, Rana K. Gupta, and Evan D. Rosen. Warming induces significant reprogramming of beige, but not brown, adipocyte cellular identity. *Cell metabolism*, 27(5):1121–1137.e5, May 2018. 29657031[pmid].
- [45] Aaron M Cypess and C Ronald Kahn. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 17(2):143–149, April 2010.

- [46] Alexander Bartelt, Oliver T Bruns, Rudolph Reimer, Heinz Hohenberg, Harald Ittrich, Kersten Peldschus, Michael G Kaul, Ulrich I Tromsdorf, Horst Weller, Christian Waurisch, Alexander Eychmüller, Philip L S M Gordts, Franz Rinninger, Karoline Bruegelmann, Barbara Freund, Peter Nielsen, Martin Merkel, and Joerg Heeren. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.*, 17(2):200–205, February 2011.
- [47] Yun Chun Liu and Yasushi Hasegawa. Reducing effect of feeding powdered scallop shell on the body fat mass of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(1):86–92, January 2006.
- [48] Goiuri Alberdi, Víctor M Rodríguez, Jonatan Miranda, M Teresa Macarulla, Itziar Churruca, and María P Portillo. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem.*, 141(2):1530–1535, November 2013.
- [49] Christopher R Cederroth and Serge Nef. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 304(1-2):30–42, May 2009.
- [50] K D Setchell. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68(6 Suppl):1333S–1346S, December 1998.
- [51] Pamela J Magee and Ian R Rowland. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br. J. Nutr.*, 91(4):513–531, April 2004.
- [52] D Grahame Hardie, Fiona A Ross, and Simon A Hawley. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(4):251–262, March 2012.
- [53] Alina Uifălean, Stefanie Schneider, Corina Ionescu, Michael Lalk, and Cristina Adela Iuga. Soy isoflavones and breast cancer cell lines: Molecular mechanisms and future perspectives. *Molecules*, 21(1):E13, December 2015.

- [54] Yoichi Mizukami. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr. J.*, 57(2):101–107, 2010.
- [55] Eric R Prossnitz, Jeffrey B Arterburn, and Larry A Sklar. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 265-266:138–142, February 2007.
- [56] W Wei, Z-J Chen, K-S Zhang, X-L Yang, Y-M Wu, X-H Chen, H-B Huang, H-L Liu, S-H Cai, J Du, and H-S Wang. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.*, 5(10):e1428, October 2014.
- [57] Chunhe Wang, Babak Dehghani, I Jack Magrisso, Elizabeth A Rick, Edna Bonhomme, David B Cody, Laura A Elenich, Sandhya Subramanian, Stephanie J Murphy, Martin J Kelly, Jan S Rosenbaum, Arthur A Vandenbark, and Halina Offner. GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Mol. Endocrinol.*, 22(3):636–648, March 2008.
- [58] Matthias Barton and Matthias R Meyer. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. *Hypertension*, 54(1):11–18, July 2009.
- [59] Geetanjali Sharma and Eric R Prossnitz. GPER/GPR30 knockout mice: Effects of GPER on metabolism. *Methods Mol. Biol.*, 1366:489–502, 2016.
- [60] Elvira Haas, Indranil Bhattacharya, Eugen Brailoiu, Marlen Damjanović, G Cristina Brailoiu, Xin Gao, Laurence Mueller-Guerre, Nicole A Marjon, André Gut, Roberta Minotti, Matthias R Meyer, Kerstin Amann, Emerita Ammann, Ana Perez-Dominguez, Michele Genoni, Deborah J Clegg, Nae J Dun, Thomas C Resta, Eric R Prossnitz, and Matthias Barton. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ. Res.*, 104(3):288–291, February 2009.
- [61] Kathryn E Davis, Elizabeth J Carstens, Boman G Irani, Lana M Gent, Lisa M Hahner, and Deborah J Clegg. Sexually dimorphic role of G protein-coupled

- estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis. *Horm. Behav.*, 66(1):196–207, June 2014.
- [62] D T Zava and G Duwe. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr. Cancer*, 27(1):31–40, 1997.
- [63] Zhi-Hong Yang, Hiroko Miyahara, Jiro Takeo, and Masashi Katayama. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol. Metab. Syndr.*, 4(1):32, July 2012.
- [64] Philipp Lang, Solveig Hasselwander, Huige Li, and Ning Xia. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.*, 9(1):19556, December 2019.
- [65] Jinglei Li, Haishan Wu, Yuting Liu, and Liu Yang. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp. Anim.*, 69(3):326–335, August 2020.
- [66] Haifei Shi, Shiva Priya Dharshan Senthil Kumar, and Xian Liu. G protein-coupled estrogen receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 114:193–250, 2013.
- [67] Matthias H Tschöp, John R Speakman, Jonathan R S Arch, Johan Auwerx, Jens C Brüning, Lawrence Chan, Robert H Eckel, Robert V Farese, Jr, Jose E Galgani, Catherine Hambly, Mark A Herman, Tamas L Horvath, Barbara B Kahn, Sara C Kozma, Eleftheria Maratos-Flier, Timo D Müller, Heike Münzberg, Paul T Pfluger, Leona Plum, Marc L Reitman, Kamal Rahmouni, Gerald I Shulman, George Thomas, C Ronald Kahn, and Eric Ravussin. A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nat. Methods*, 9(1):57–63, December 2011.

- [68] Andrew A Butler and Leslie P Kozak. A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes*, 59(2):323–329, February 2010.
- [69] Karl J Kaiyala and Michael W Schwartz. Toward a more complete (and less controversial) understanding of energy expenditure and its role in obesity pathogenesis. *Diabetes*, 60(1):17–23, January 2011.
- [70] Edward T Chouchani, Lawrence Kazak, and Bruce M Spiegelman. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond. *Cell Metab.*, 29(1):27–37, January 2019.
- [71] Maria M Mihaylova and Reuben J Shaw. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.*, 13(9):1016–1023, September 2011.