



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA FRACCIÓN
VASCULAR DEL ESTROMA A ADIPOCITOS BEIGE ESTÁ CONSIDERABLEMENTE
REDUCIDA EN SUJETOS CON SOBREPESO/OBESIDAD Y RESISTENCIA A LA
INSULINA: EFECTO DE LA GENISTEÍNA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. LEONARDO ALEJANDRO RODRÍGUEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

COMITÉ TUTOR
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Santísimo Padre, hay muchos que, al aplicar su débil juicio sobre lo que está escrito sobre los grandes logros de los romanos: las hazañas de armas, la ciudad de Roma y la maravillosa habilidad demostrada en la opulencia, ornamentación y grandeza de sus edificios - han llegado a la conclusión de que es más probable que estos logros sean fábulas que hechos. Sin embargo, yo siempre he visto, y sigo viendo, las cosas de manera diferente. Porque, teniendo en cuenta la cualidad divina de las mentes de los antiguos, tal como se revela en los restos que aún se pueden ver entre las ruinas de Roma, no me parece irrazonable creer que mucho de lo que consideramos imposible les parecía excesivamente simple.”

Raffaello Sanzio

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACYT) (Concesión Número 261843 a Armando Roberto Tovar Palacios) y apoyado por la Fundación Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Leonardo Alejandro Rodríguez López recibió una beca CONACYT con el número 605708 para el programa de Doctorado Directo en Ciencias Biomédicas (Investigación Biomédica Básica) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Hay muchísimos a quién agradecer en esta parte, nunca me ha gustado esta sección debido a que tienes que poner nombres y todos los que participaron directa e indirectamente merecen un lugar. Pero quisiera agradecer a todos los participantes en este artículo y su gran esfuerzo literalmente día y noche, jornadas que realmente eran estresantes física y mentalmente. Se dice fácil casi 6 años de doctorado, no solo es el estudio si no el sobrellevar el sacrificio que implica hacerlo (familia, amigos, salud, planes, etc.).

Lo que es de agradecer son las acciones que se llevaron a cabo y eso sí lo voy a mencionar: que te acepten en un departamento donde te traten con cariño y respeto, cuando estabas totalmente solo entonces un ser humano te acompañe y sea tu amigo en las buenas y malas, cuando los que saben te comparten sus conocimientos sin prejuicios, que se me diera la oportunidad de aprender a dar clases (una pasión que creo que es el resultado del amor por el conocimiento), cuando no tenía literalmente nada, que me ayudaran con algo tan valioso como apoyo moral, que se me enseñara que hay cosas más valiosas que un título, que cuando buscas un objetivo lo más valioso es el llegar a él tranquilo, de que tu viaje por dicho objetivo fue divertido, al final llegas al objetivo sin darte cuenta, y finalmente sobre todo saber que si entras a un doctorado en busca de respuestas estas totalmente equivocado, lo único que te dará son más preguntas y la pasión por tratar de responder una y llevarte otras mil preguntas más, al final te das cuenta que no sabes absolutamente nada, pero por lo menos te llevas las herramientas de cómo responder una pregunta.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
ANTECEDENTES	8
Obesidad	8
Estrés del retículo endoplásmico	10
Adipogénesis y diferenciación a tejido termogénico <i>in vitro</i>	12
Fitoestrógenos con capacidad termogénica	18
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	22
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
METODOLOGÍA.....	24
Diseño general y tratamientos	24
Tamaño de la muestra	25
Técnicas y equipos utilizados en las mediciones de variables	28
Medidas antropométricas	28
Presión arterial	28
Determinación de parámetros bioquímicos	29
Técnicas quirúrgicas	29
Aislamiento de células precursoras del tejido adiposo	30
Cultivo celular e inmunofenotipo	30
Tinción de lípidos	31
Extracción de RNA y cuantificación de mRNA	32
Extracción de proteínas y western blot	33
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	34
Variables antropométricas y bioquímicas de los sujetos de estudio	34
La obesidad y la resistencia a la insulina inhiben el proceso de pardeamiento en las células de la fracción vascular estromal humanas de tejido adiposo.	37

La genisteína promueve el pardeamiento de la fracción vascular estromal humana, pero la obesidad y la resistencia a la insulina previenen este efecto.....	41
El resveratrol tiene un efecto insignificante sobre el pardeamiento de la fracción vascular estromal humana y reduce el efecto estimulante de la genisteína.....	43
La abundancia de marcadores de estrés del retículo se asocia con una menor capacidad de pardeamiento en las células de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo subcutáneo.....	46
Factores implicados en la respuesta de las células de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo al pardeamiento: análisis de componentes principales.....	48
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIÓN.....	55
PERSPECTIVAS.....	56
CONCLUSIÓN GRÁFICA.....	57
REFERENCIAS.....	57

RESUMEN

Antecedentes: se ha demostrado que los compuestos bioactivos de la dieta producen varios beneficios para la salud. La genisteína, una isoflavona de la proteína de soya, y el resveratrol, un polifenol de las uvas, mejoran la sensibilidad a la insulina y estimulan el oscurecimiento del tejido adiposo blanco (WAT), lo que lleva a un mayor gasto de energía. Sin embargo, no se ha demostrado en humanos si la genisteína o el resveratrol tienen la capacidad de estimular la diferenciación de las células de la fracción vascular del estroma de la grasa blanca a adipocitos beige.

Métodos: Con este objetivo, se evaluó si las células de la fracción vascular del estroma obtenidas de biopsias de los depósitos de grasa subdérmicos de sujetos con peso corporal normal (NW) o de sujetos con sobrepeso/obesidad con (OIR) o sin (OIS) resistencia a la insulina pueden diferenciarse en el linaje de tejido adiposo beige in vitro, al exponer las células a genisteína, resveratrol o la combinación de ambos.

Resultados: Los resultados mostraron que las células de la fracción vascular del estroma obtenidas de sujetos NW o OIS pudieron diferenciarse en adipocitos beige de acuerdo con una mayor expresión de biomarcadores beige, incluidos UCP1, PDRM-16, PGC1 α , CIDEA y SHOX2 tras la exposición a genisteína. Sin embargo, las células de la fracción vascular del estroma de sujetos OIR no pudieron diferenciarse en adipocitos beige con ninguno de los inductores. La exposición al resveratrol o la combinación de resveratrol/genisteína no estimuló significativamente la expresión de marcadores de pardeamiento en ninguno de los grupos estudiados. Encontramos que la falta de respuesta de las células de la fracción vascular del estroma de sujetos con obesidad y resistencia a la insulina a cualquiera de los inductores se asoció con un aumento en la expresión de marcadores de estrés del retículo endoplásmico.

Conclusión: El consumo de genisteína puede estimular el pardeamiento de WAT principalmente en sujetos NW u OIS. Por lo tanto, la obesidad asociada con la resistencia a la insulina puede considerarse como una condición que impide algunos efectos beneficiosos de algunos compuestos bioactivos de la dieta.

ABSTRACT

Background: Dietary bioactive compounds have been demonstrated to produce several health benefits. Genistein, an isoflavone of soy protein, and resveratrol, a polyphenol from grapes, have been shown to improve insulin sensitivity and to stimulate white adipose tissue (WAT) browning, leading to increased energy expenditure. However, it has not been demonstrated in humans whether genistein or resveratrol have the capacity to stimulate the differentiation of stromal vascular fraction cells from white fat into beige adipocytes.

Methods: With this aim, we assessed whether stromal vascular fraction cells obtained from biopsies of the subdermal fat depots of subjects with normal body weight (NW) or from subjects with overweight/obesity with (OIR) or without (OIS) insulin resistance were able to differentiate into the beige adipose tissue lineage in vitro, by exposing the cells to genistein, resveratrol, or the combination of both.

Results: The results showed that stromal vascular fraction cells obtained from NW or OIS subjects were able to differentiate into beige adipocytes according to an increased expression of beige biomarkers including UCP1, PDRM-16, PGC1 α , CIDEA, and SHOX2 upon exposure to genistein. However, stromal vascular fraction cells from OIR subjects were unable to differentiate into beige adipocytes with any of the inducers. Exposure to resveratrol or the combination of resveratrol/genistein did not significantly stimulate the expression of browning markers in any of the groups studied. We found that the non-responsiveness of the stromal vascular fraction cells from subjects with obesity and insulin resistance to any of the inducers was associated with an increase in the expression of endoplasmic reticulum stress markers.

Conclusion: Consumption of genistein may stimulate WAT browning mainly in NW or OIS subjects. Thus, obesity associated with insulin resistance may be considered as a condition that prevents some beneficial effects of some dietary bioactive compounds.

ANTECEDENTES

Obesidad

La obesidad es el resultado de un balance energético positivo donde la energía que se ingiere es mayor al gasto energético. Es un trastorno nutricional que se caracteriza por la expansión de los depósitos del tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés para white adipose tissue) y es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales, principalmente el consumo crónico de una dieta alta en energía y el sedentarismo. Esta condición está ligada a una variedad de alteraciones metabólicas tales como la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis [1]–[3].

Gran parte de las alteraciones metabólicas que se presentan durante la obesidad son consecuencia de una función inadecuada del tejido adiposo [4]. El tejido adiposo está compuesto principalmente por adipocitos maduros, los cuales representan hasta dos tercios del número total de células. Debido a su enorme tamaño constituyen más del 90% del volumen del tejido y son los que llevan a cabo las funciones del tejido adiposo. El resto del tejido adiposo está compuesto por la fracción vascular estromal donde se encuentran varios tipos celulares como: células troncales mesenquimales (que actúan como células precursoras de adipocitos), macrófagos, monocitos, pericitos y preadipocitos. En condiciones normales, el tejido adiposo lleva a cabo tres funciones principales: 1) almacenaje de energía en forma de triglicéridos; 2) hidrólisis de triglicéridos en periodos de demanda de energía, los cuales participan en distintos procesos metabólicos; 3) secreción de una amplia gama de hormonas y citocinas que son importantes reguladores de la homeostasis energética, tales como la adiponectina, leptina, resistina, factor de necrosis tumoral α (TNF α , por sus siglas en inglés: Tumor Necrosis Factor- α) e interleucinas [5], [6]. En la figura 1 se describen las funciones del tejido adiposo y la alteración que sufren durante la obesidad.

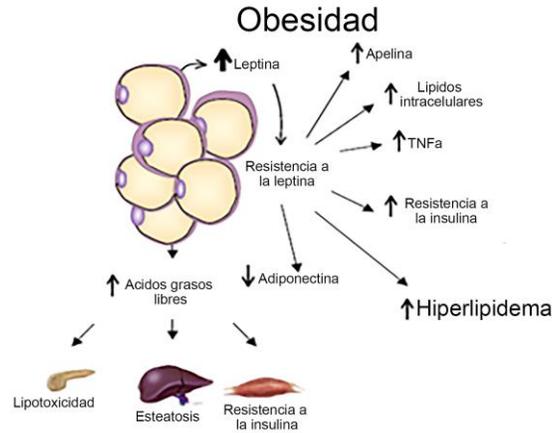


Figura 1. Respuesta del tejido adiposo blanco durante la obesidad. Durante la obesidad, los adipocitos se encuentran hipertróficos y secretan una gran cantidad de ácidos grasos libres y adipocinas que promueven la resistencia a la insulina, trayendo como consecuencia la acumulación excesiva de lípidos en páncreas, hígado y músculo esquelético [7].

En este contexto el tejido adiposo juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis energética corporal mediante el almacenamiento de triglicéridos y la secreción de adipocinas que son importantes para la regulación del metabolismo lipídico y de la glucosa. La disfunción adipocítica en la obesidad incluye la secreción de niveles anormales de citocinas asociadas con la resistencia a la insulina la cual se puede definir como una disminución en la acción de la insulina, falla en el almacenamiento de los triglicéridos y una lipólisis incrementada. Estas anomalías pueden contribuir a un nivel aumentado de ácidos grasos circulantes y llevar a una sobrecarga de ácidos grasos en el músculo esquelético y en el hígado, la cual se asocia con una respuesta disminuida a la insulina en estos tejidos en la obesidad [6]–[8].

Tanto la obesidad, la respuesta disminuida a la insulina y la respuesta inflamatoria del tejido adiposo pueden generar las condiciones que incrementan la demanda del retículo endoplásmico y sobrecargan su capacidad funcional provocando estrés en el retículo endoplásmico, donde el adipocito sufre cambios severos en su estructura, incrementando la síntesis de proteínas y de lípidos e incluso afectando su diferenciación [8], [9].

Estrés del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico juega un papel esencial en la biosíntesis de proteínas destinadas a la secreción o inserción en membranas de células eucariotas. Este organelo unido a la membrana nuclear puede reclutar ribosomas para la traducción del ARN mensajero en proteínas, translocar péptidos a su lumen, promover una amplia variedad de modificaciones postraduccionales y facilitar eventos de ensamblaje proteínico por las chaperonas [8], [10].

El retículo endoplásmico rugoso es considerado la fábrica productora de proteínas de células en mamíferos, y tiene la característica de ser un importante sensor de la sobrecarga metabólica (estrés), que pueden en un momento dado presentar las células, lo que puede generar una situación denominada estrés del retículo endoplásmico. El estrés del retículo endoplásmico se presenta cuando la capacidad del retículo para plegar proteínas se satura por factores que perjudican la glicosilación de las proteínas, la formación de enlaces disulfuro y las mutaciones de las proteínas que entran en la vía de secreción; en las células beta pancreáticas, este estrés puede afectar tanto la acción de la insulina como su producción para mantener el sistema homeostático de la glucosa en límites normales [8], [10].

En condiciones fisiológicas, al aumentar las demandas metabólicas, como un aumento progresivo en la acumulación de grasa o una demanda aumentada de secreción de insulina en la célula beta, pueden trastornar o alterar la homeostasis del retículo, provocando una actividad errónea en el ensamblaje proteico, causando que estas proteínas mal ensambladas se acumulen en gran cantidad en el lumen del retículo, dando como resultado una sobrecarga (estrés). Para aliviar esta sobrecarga, el retículo endoplásmico inicia un programa transcripcional denominado respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés: Unfolded Protein Response) diseñado específicamente para disminuir o detener la síntesis de proteínas para promover su rápida degradación[8].

El mecanismo de señalización de la UPR sigue cierta secuencia: cuando empieza a presentarse una acumulación excesiva de proteínas mal ensambladas en el lumen del retículo, se activa el factor de transcripción activador 6 (ATF6 por sus siglas en inglés: Activating Transcription Factor 6), ATF6 se transloca desde la membrana del retículo al aparato de Golgi, y es activado en el dominio luminal y en el dominio transmembrana del aparato de Golgi por la proteasa de sitio 1 (S1P por sus siglas en inglés: site-1 protease) y la proteasa de sitio 2 (S2P por sus siglas en inglés: site-2 protease). Como resultado, un dominio citosólico N-terminal de ATF6, que contiene un dominio de cremallera de leucina básico (bZIP por sus siglas en inglés: Basic Leucine Zipper Domain), se transloca al núcleo e induce la expresión de un número de genes blanco de la respuesta UPR, incluyendo chaperonas del retículo, como por ejemplo la proteína de unión a la inmunoglobulina (BIP por sus siglas en inglés: Binding immunoglobulin protein), la proteína disulfuro isomerasa (PDI por sus siglas en inglés: Protein disulphide isomerase) y la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1 por sus siglas en inglés: X-Box Binding Protein 1), lo que modula la respuesta UPR y la hace más eficaz.

En paralelo, IRE1 que es una proteína transmembrana del retículo de tipo I (IRE1 por sus siglas en inglés: Inositol-requiring enzyme 1) con actividad serina/treonina cinasa y actividad endorribonucleasa en su dominio citosólico C-terminal, se activa por la disociación de BIP del dominio luminal de IRE1. Las proteínas mal plegadas que se acumulan en el retículo se asocian con el dominio luminal de IRE1 α , lo que conduce a la oligomerización, la autofosforilación de su dominio cinasa y la activación del dominio RNasa de IRE1 α en respuesta al cambio conformacional induciendo el empalme citosólico no convencional del ARNm de XBP1 para expresar un factor transcripcional XBP1s. A su vez, XBP1s regula la transcripción de genes blanco de la UPR relacionados con el plegamiento de proteínas, el control de calidad y la producción de proteínas. Al mismo tiempo la proteína cinasa receptora similar a extensina rica en prolina, (PERK por sus siglas en inglés: proline-rich extensin-like receptor protein kinase) se activa y fosforila al factor

de iniciación eucariota 2 (EIF2 por sus siglas en inglés: Eukaryotic Initiation Factor 2). La dimerización y autofosforilación de PERK, junto con la fosforilación de eIF2 resulta en la inhibición generalizada de la traducción, siendo éste un paso clave en detener la síntesis proteica[8][10].

Durante el censo de proteínas mal plegadas, la proteína BIP la cual se encuentra unida a PERK, ATF6 e IRE1, hace que ATF6 al detectar cantidades grandes de proteínas mal plegadas se disocie de los receptores de estrés permitiendo su activación. Esta activación desencadena una vía de señalización desde el retículo hacia el núcleo, la cual es mediada por los factores transcripcionales como el factor de transcripción activador 4 (ATF4 por sus siglas en inglés: Activating Transcription Factor 4), ATF6, XBP1 y su objetivo también es aumentar la capacidad de plegamiento en el retículo para activar vías degradativas de las proteínas mal plegadas. Tanto la vía de ATF6 como de BIP, son vías encargadas de mantener viva a la célula y tratar de arreglar el problema lo más rápido posible, pero existe otra vía la cual provoca la muerte celular programada, esta es regulada por la proteína homóloga a C/EBP (CHOP por sus siglas en inglés: C/EBP homologous protein) un factor proapoptótico que aumenta su expresión por acción de ATF4 y ATF6 [11]. El factor de transcripción CHOP se activa en la cascada de señalización iniciada por PERK, el cual sería un mecanismo dirigido a favorecer la apoptosis celular ante el fracaso del intento de recuperar la homeostasis [12]. En síntesis, existen dos mecanismos que mantienen la homeostasis de plegamiento de proteínas, “la vía de supervivencia” por medio de ATF6 Y BIP y la vía de “muerte celular” generada por CHOP, estas diferentes vías pueden afectar múltiples linajes celulares, y se ha reportado que puede disminuir el potencial adipogénico de los preadipocitos alterando su diferenciación [9].

Adipogénesis y diferenciación a tejido termogénico *in vitro*

En el organismo los cambios en el consumo de energía se reflejan en un cambio en el tamaño del tejido adiposo. De este modo, un incremento en el número de adipocitos se le llama hiperplasia el cual aumenta el volumen de tejido adiposo para permitir el correcto

almacenaje de energía, mientras que por otro lado existe también el aumento de tejido adiposo por medio de la hipertrofia la cual se define como aumento de tamaño de los adipocitos provocando un aumento en el tejido adiposo, pero de una manera no tan saludable. La adipogénesis es la formación de adipocitos maduros a partir de células troncales de origen mesenquimal. La diferenciación de los adipocitos es un proceso complejo acompañado por cambios coordinados en la morfología, la sensibilidad a hormonas y la expresión génica [13]. Este proceso está regulado eficientemente por tres factores de transcripción: el receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR γ por sus siglas en inglés: Peroxisome proliferator- activated receptor gamma), la proteína de unión a CCAAT/enhancer α (C/EBP α por sus siglas en inglés: CEBP α CCAAT/enhancer binding protein), y la proteína de unión al elemento regulador del esteroide (SREBP1 por sus siglas en inglés: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1) [14].

La adipogénesis se divide principalmente en dos fases: fase de compromiso y fase de diferenciación terminal. La primera fase comienza cuando las células troncales mesenquimales se convierten en preadipocitos, y para que una célula troncal mesenquimal pueda llegar a este paso se necesita una secuencia de pasos muy bien ordenados y caracterizados. En modelos *in vitro* de células troncales mesenquimales, primero se detiene la proliferación de estas células lo cual se produce cuando llegan a una confluencia aproximada del 90%, y posteriormente se estimula la adipogénesis, tratando las células con inductores adipogénicos que incluyen agonistas de glucocorticoides como la dexametasona, un agente que incrementa la concentración de AMPc intracelular como la isobutilmetilxantina (IBMX por sus siglas en inglés: 3-isobutyl-1-methylxanthine) [15] e insulina que estimula a los receptores de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-IR por sus siglas en inglés: insulin-like growth factor type 1). De igual manera, se han utilizado ligandos de PPAR γ , las tiazolidinedionas (TZDs), que también son comúnmente utilizados para estimular la diferenciación en cultivo primario. Para la primera fase de la diferenciación mediante las señales producidas por los agentes inductores, los factores de transcripción como la proteína de unión a CCAAT/enhancer β (C/EBP β por sus siglas

en inglés: CEBP β CCAAT/enhancer binding protein) y la proteína de unión a CCAAT/enhancer δ (C/EBP δ por sus siglas en inglés: CEBPB CCAAT/enhancer binding protein) son expresados y debido a su acción transcripcional activan a su vez la expresión de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α , que son los genes maestros de todo el proceso de diferenciación (figura2). A nivel celular los cambios morfológicos son evidentes: la forma fibroblastoide de las células troncales mesenquimales cambia a una forma más redondeada, de igual manera en el citoplasma de la célula se generan gotas lipídicas que se irán fusionando hasta formar una gran gota lipídica que ocupara gran parte del citoplasma, mientras que a nivel molecular se empieza a observar la aparición de la expresión de la mayoría de los genes que caracterizan al fenotipo del adipocito: la ácido graso sintasa (FAS por sus siglas en ingles Fatty Acid Synthase), la proteína de unión a ácidos grasos (aP2/FABP por sus siglas ingles fatty acid binding protein), la glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH por sus siglas en inglés: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase), la acetil-CoA carboxilasa (ACC por sus siglas en inglés: acetyl-CoA carboxylase), además del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4 por sus siglas en inglés: glucose transporter type 4) [16].

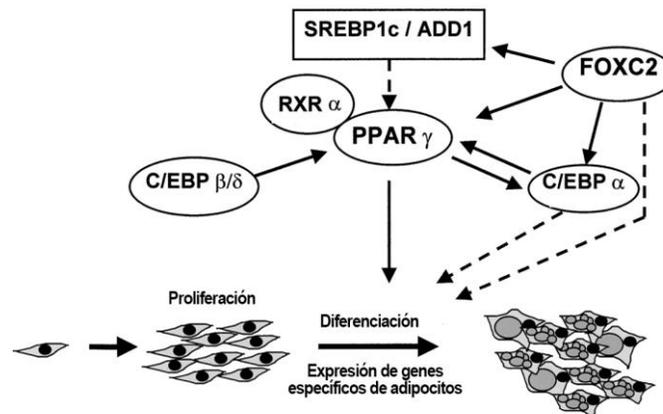


Figura 2. Control transcripcional de la adipogénesis. Después de la proliferación de los preadipocitos, se activan diversos factores de transcripción durante la diferenciación. Primero se expresan C/EBP β y C/EBP δ seguidos por PPAR γ y C/EBP α , los cuales ejercen una retroalimentación positiva para mantener la diferenciación. SREBP1 incrementa la actividad transcripcional de PPAR γ [17].

En los últimos años se han caracterizado dos tipos de tejidos adiposo diferentes al que solo contiene adipocitos blancos, mencionado anteriormente. El tejido adiposo pardo

(BAT, por sus siglas en inglés para Brown adipose tissue), que es un órgano encargado de la producción de calor (termogénesis) en los mamíferos. Los adipocitos pardos o también llamados marrones del tejido adiposo son ricos en mitocondrias y expresan a la proteína desacoplante-1 (UCP1 por sus siglas en inglés para Uncoupling protein 1), que desacopla la actividad de la cadena respiratoria con la síntesis de adenosin trifosfato (ATP por sus siglas en inglés: adenosine triphosphate). Este tejido en los humanos adultos se localiza en regiones bien delimitadas en la zona interescapular, perirrenal y rodeando la columna vertebral, mientras que en neonatos se encuentra en los mismos lugares pero de manera más abundante y mayormente activo en el área escapular [18], [19].

El segundo tipo de tejido adiposo, el cual fue descubierto recientemente, es llamado beige o brite (del inglés: brown in white) [20]. Los adipocitos de este tejido adiposo también expresan a la proteína UCP1, pero a diferencia del pardo, se diferencian en el interior del tejido adiposo blanco a partir de las células precursoras presentes en el tejido, proceso denominado pardeamiento o browning. Las células beige son definidas por su morfología multilocular, el alto contenido de mitocondrias y la expresión de un conjunto de genes específicos como: SHOX2 (por sus siglas en inglés: short stature homeobox 2), CIDEA (por sus siglas en inglés: cell death- inducing DFFA-like effector a), PRDM16 (por sus siglas en inglés: PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16), PGC1 α (por sus siglas en inglés: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) y UCP1, entre otros, que han servido también para su identificación como biomarcadores. Las células pardas y beige tienen algunas características que permiten diferenciarlas, por lo que deben ser consideradas como tipos de células distintas [21]; a continuación, se mencionan algunas de las características para diferenciarlas:

- Las células beige de los depósitos de tejido graso subcutáneo, no derivan de los mismos precursores embrionarios que dan origen a los adipocitos marrones; ejemplo

en los marrones se pueden determinar biomarcadores de una línea miogénica (ENG^+ , $MYF5^+$, $PAX7^+$), mientras que en células beige se encuentran otros biomarcadores diferentes específicos (SMA^+ , $PDGFRa^+$, $PDGFRb^+$)[22].

- Los adipocitos beige y marrones expresan distintos genes, ejemplo de ello, en adipocitos marrones se expresan los genes $COX7A$, $ZIC1$, entre otros; por otro lado, las células beige expresan los marcadores $UCP1$, $CIDEA$, $PGC1A$, $SHOX2$ Y $PRDM16$, entre otros[22].
- Los adipocitos pardos expresan altos niveles de $UCP1$ y otros genes termogénicos en condiciones basales (sin estimulación), mientras que los adipocitos beige expresan estos mismos genes en respuesta a activadores como la exposición al frío, biomoléculas alimentarias, a la exposición al sol, agonistas del receptor β -adrenérgico o de $PPAR-\gamma$ entre otros [22,90].

Varios factores regulan la diferenciación de adipocitos beige a través de la modulación de la expresión del factor de transcripción $PRDM16$ y el coactivador $PGC1\alpha$. $PGC-1\alpha$ es inducido por el frío, estimula la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo. $PGC-1\alpha$ también induce la expresión de $UCP1$ y otros componentes termogénicos. La expresión y la actividad del $PGC-1\alpha$ están reguladas directamente por la ruta de señalización adrenérgica. $PGC-1\alpha$ regula la expresión de los genes termogénicos a través de su interacción con $PPAR-\gamma$, con otros factores de transcripción, coactivadores, receptor de hormonas tiroideas y algunos otros factores (figura 3) [23]–[25].

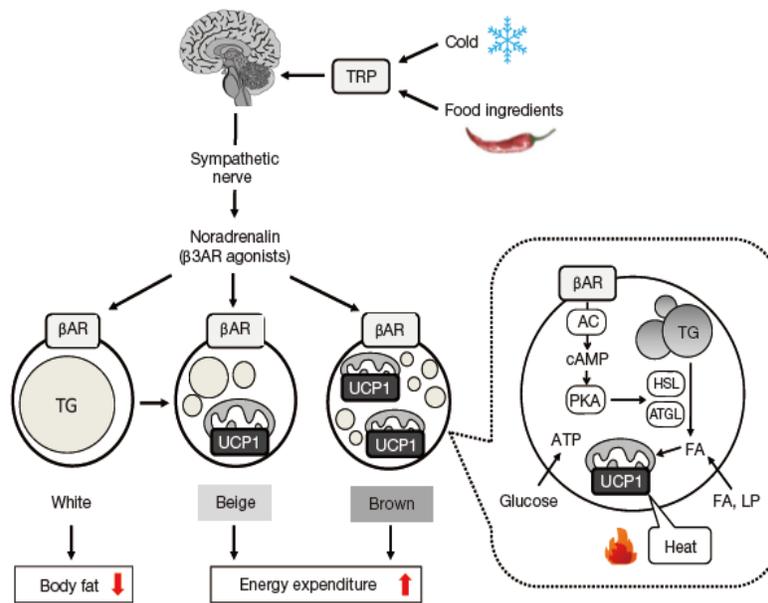


Figura 3: Diferenciación de células precursoras a adipocitos blancos, beige y pardos. La actividad nerviosa simpática del tejido adiposo se incrementa en respuesta a la exposición al frío y la ingestión oral de algunos ingredientes a través de la activación de los receptores de los canales potenciales transitorios (TRP, del inglés Transient receptor potential). Al unirse la noradrenalina a los receptores β adrenérgicos se inicia una cascada de señalización para la hidrólisis de triglicéridos. Estos ácidos grasos libres activan a la proteína UCP1 y son oxidados para ser utilizados como fuente de energía para termogénesis. Esta activación crónica produce no solo una hiperplasia de adipocitos pardos, sino también la inducción de adipocitos beige en el tejido adiposo blanco, activando de esta manera el gasto energético corporal y disminuyendo la grasa corporal [24].

Existen moléculas que pueden inducir al fenotipo termogénico como la pioglitazona, la cual es un fármaco del grupo de las TZD que aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce la producción hepática de glucosa. Al igual que otras TZD, disminuye la insulino-resistencia que se asocia a la diabetes tipo 2, sin estimular la liberación de insulina, actuando mediante la activación de receptores nucleares específicos como PPAR- γ y estimulando la activación del programa transcripcional termogénico [26]. Por otro lado también existen hormonas que son capaces de activar el sistema de pardeamiento o browning, que son la triyodotironina (T_3), induciendo la producción de adipocitos beige a partir de células del tejido adiposo blanco, o por medio del receptor β adrenérgico aumentando la expresión de ARNm de PRDM16 y UCP1 que ocurre independientemente del sistema nervioso simpático [27].

Por lo anterior, se propuso que el incremento en la diferenciación de adipocitos beige en sujetos con obesidad podría incrementar el gasto energético, reduciendo la acumulación de energía en forma de grasa, disminuyendo el peso y la acumulación de ácidos grasos intracelulares, mejorando la hiperglucemia y la resistencia a la insulina que son características de la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico, respectivamente [25], [31]. Por esa razón, se inició una serie de investigaciones que tuvieron por objetivo encontrar moléculas que puedan estimular la proliferación de células precursoras y la diferenciación de adipocitos beige; entre ellas se encuentran los fitoestrógenos debido a su capacidad de estimular la actividad termogénica.

Fitoestrógenos con capacidad termogénica

Los fitoestrógenos son compuestos químicos no esteroideos, se pueden encontrar en los vegetales siendo muy similares en estructura molecular a los estrógenos humanos. Entre los más estudiados se encuentran las isoflavonas como la genisteína [32]. La genisteína también es un polifenol y tiene su origen en una serie de plantas que incluye los lupinos, habas, soya, entre otras siendo estas la fuente de alimento primario [33].

Se ha demostrado en los últimos años que el efecto benéfico del consumo de proteína de soya se debe en parte a la fracción de isoflavonas que contiene, en particular la genisteína [34]. En nuestro grupo de trabajo, se demostró que la inyección intraperitoneal de genisteína durante 4 días en ratas sanas de la cepa Wistar, estimula la expresión de genes de la oxidación de ácidos grasos, biogénesis mitocondrial y termogénesis (PGC1 α y UCP3 respectivamente), así como la fosforilación de AMPK en músculo esquelético [35]. Por otra parte, se observó que la genisteína es capaz de activar genes musculares FNDC5 (siglas en inglés para Fibronectin type III domain-containing protein 5) que traduce una proteína llamada irisina y, de acuerdo al estudio realizado con roedores, actúa sobre adipocitos blanco estimulando la sobreexpresión de PGC-1 α y UCP1 [39].

Adicionalmente, también en nuestro grupo de trabajo se han demostrado que la genisteína es capaz de incrementar el gasto calórico en roedores, así como también de disminuir el cociente respiratorio, indicando que una de sus funciones es la de estimular la oxidación de ácidos grasos [32] (Figura 4).

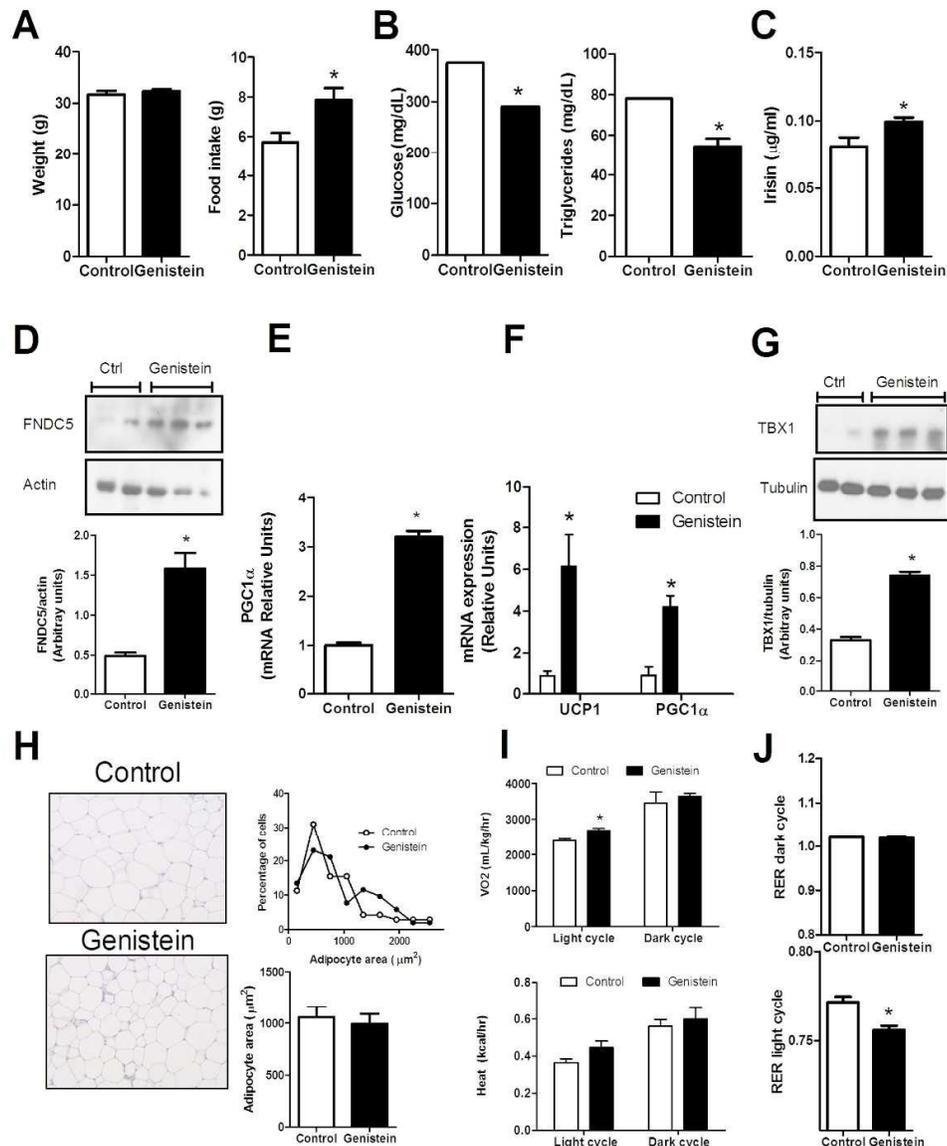


Figura 4: Efectos de la genisteína sobre el metabolismo energético y la función del tejido adiposo en ratones. (A) Peso corporal, ingesta de alimento (B, C) concentración de glucosa, triglicéridos e irisina en suero. (D) Contenido de mRNA y proteína de FNDC5 y (E) PGC1α en músculo esquelético. (F) Contenido de mRNA de UCP1 y PGC1α en tejido adiposo, (G) contenido de mRNA y proteína de TBX1, (H) área de adipocitos (I, J). Los resultados se muestran como las medias \pm S.E (del inglés standar error) (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$) [32] .

Otro fitoestrógeno con características importantes es el resveratrol (RSV), es otro polifenol dietario que ha sido asociados con disminución de la incidencia de enfermedad cardiovascular [36]–[38]. El RSV se sintetiza en algunos frutos, principalmente en las uvas de cascara roja. En un estudio se observó que el RSV aumenta la actividad mitocondrial de tejido adiposo subcutáneo y músculo [39] (figura 5).

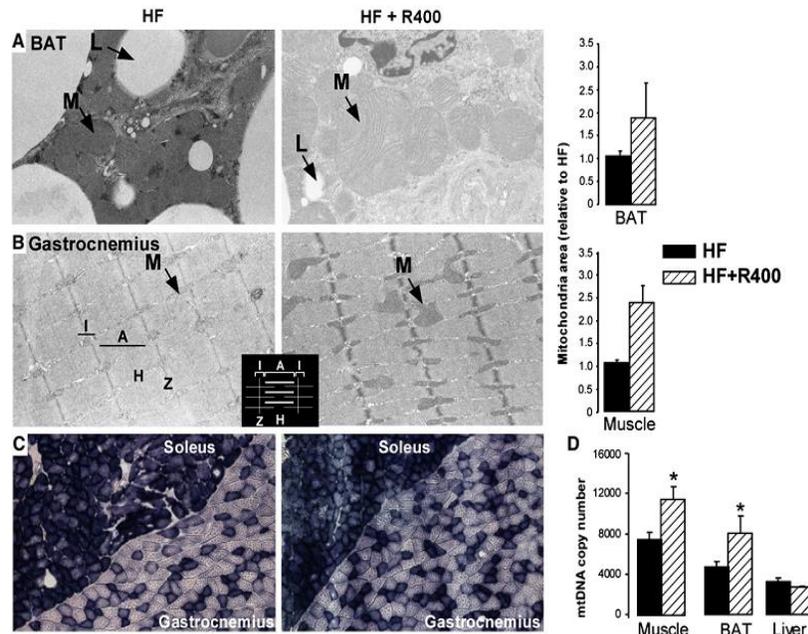


Figura 5. El resveratrol aumenta la actividad mitocondrial de tejido adiposo y músculo. Microscopía electrónica (magnificada a 20,000), corresponde a la cuantificación del tamaño mitocondrial en tejido adiposo (A) y fibras de músculo (B) de ratones que consumieron resveratrol y una dieta alta en grasa *versus* los que consumieron solo una dieta alta en grasa. La M representa la posición de la mitocondria y L los lípidos; (C) tinción de SDH en el músculo; D) Número de copias de ADNmt de músculo, tejido adiposo e hígado [39].

Por otra parte, en nuestro laboratorio también se observó que el resveratrol tiene influencia sobre FNDC5 [39] (Figura 6).

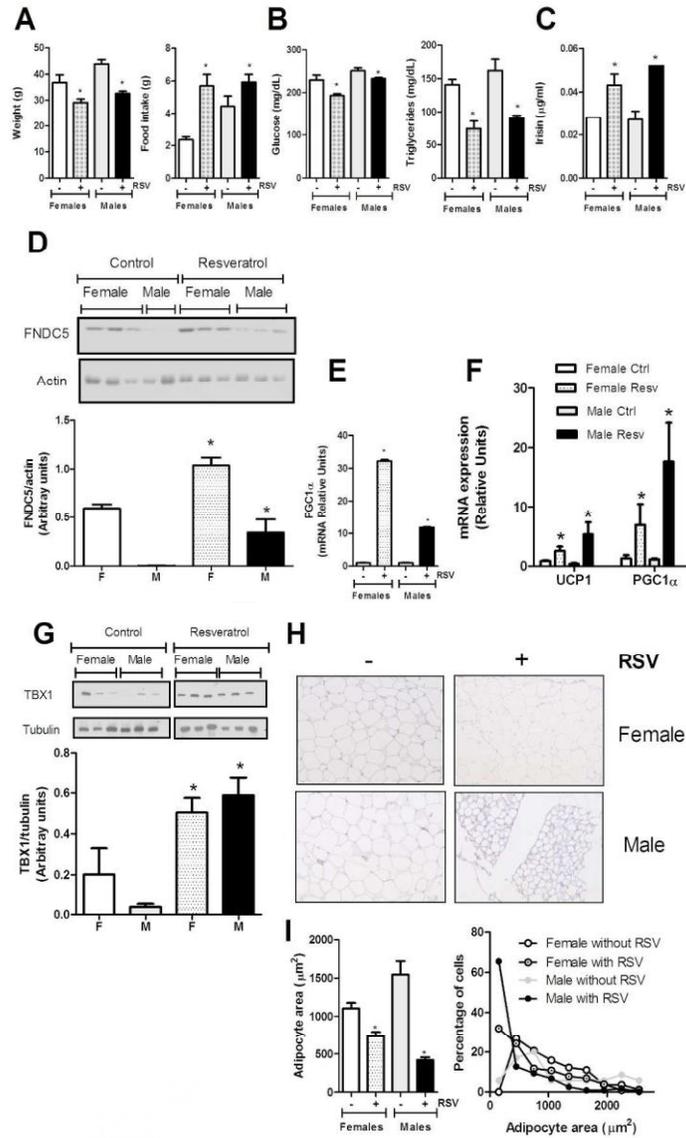


Figura 6: Efectos del resveratrol sobre el metabolismo energético en ratones. (A) peso corporal e ingesta de alimento, (B, C) concentración de glucosa, triglicéridos e irisina en suero. (D) Contenido de mRNA y proteína de FNDC5 y (E) PGC1 α en músculo esquelético. (F) Contenido de mRNA de UCP1 y PGC1 α en tejido adiposo, (G) contenido de mRNA y proteína de TBX1, (H) área de adipocitos. Los resultados se muestran como las medias \pm S.E (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$) [39].

Por lo anterior, se utilizaron en el presente estudio estos dos polifenoles, tanto la genisteína como el resveratrol, para poder estimular la diferenciación de células troncales mesenquimales derivadas de la fracción vascular estromal en adipocitos beige en el tejido adiposo de pacientes con obesidad y resistencia a la insulina.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La obesidad y el sobrepeso representan uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial, siendo México uno de los países con mayor prevalencia. Estos problemas están acompañados de un aumento en alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y síndrome metabólico, las cuales son consecuencia de una función inadecuada del tejido adiposo.

Estudios han demostrado que existen diferencias metabólicas importantes entre los diferentes compartimentos del tejido adiposo; sin embargo, estudios más recientes han propuesto un nuevo tipo de adipocito llamado beige, y se ha sugerido que el incremento en la diferenciación de este tipo de adipocitos en el tejido adiposo de sujetos con obesidad podría incrementar el gasto energético, reduciendo la acumulación de energía en forma de grasa. Por esta razón, se han iniciado una serie de investigaciones que tienen por objetivo encontrar moléculas que puedan estimular la proliferación de células precursoras y la diferenciación de adipocitos beige.

JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han evaluado el efecto los beneficios de la genisteína y el resveratrol en sujetos obesos; sin embargo, no existen a la fecha estudios en humanos que demuestren que la estimulación con genisteína (componente de la soya) y/o resveratrol (proveniente principalmente de la uva) tengan algún efecto en la diferenciación de adipocitos beige a partir de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo subcutáneo.

Al estimular la diferenciación a adipocitos beige se podrá tener en un futuro una mejor perspectiva sobre el mecanismo de acción de estos compuestos en el tejido adiposo y su posible impacto en el balance energético de personas normopeso (NW del inglés normal weight), con obesidad sin resistencia a la insulina (OIS del inglés obese insulin sensitive) y

con obesidad con resistencia a la insulina (OIR del inglés obese insulin resistance). Esto propondría un marco de referencia para el uso de compuestos bioactivos de los alimentos en el tratamiento y prevención de enfermedades metabólicas.

HIPÓTESIS

El resveratrol y la genisteína favorecen la diferenciación *in vitro* de células troncales mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo humano a fenotipo beige, presentando mayor capacidad de diferenciación los sujetos normo peso en comparación con sujetos con obesidad sin resistencia a la insulina, éstos últimos, a su vez teniendo mayor capacidad de diferenciación que los sujetos con obesidad con resistencia a la insulina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto del resveratrol y la genisteína en la diferenciación *in vitro* de células troncales mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo a fenotipo beige, de sujetos normopeso sin resistencia a la insulina y sujetos con sobrepeso u obesidad con y sin resistencia a la insulina.

Objetivos Específicos

- 1- Comparar el porcentaje relativo de diferenciación de células troncales mesenquimales *in vitro* a adipocitos beige de sujetos normopeso, respecto a sujetos con sobrepeso u obesidad sin resistencia a la insulina.
- 2- Comparar el porcentaje relativo de diferenciación de células troncales mesenquimales *in vitro* a adipocitos beige de sujetos con sobrepeso u obesidad sin resistencia a la insulina respecto a sujetos con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina
- 3- Determinar la abundancia relativa de ARNm de CIDEA, UCP1, PRDM16, PGC1a, Shox2 de células troncales mesenquimales diferenciadas *in vitro* en cada uno de los de 5 grupos de estudio: sin diferenciar (control), control positivo (adipocito termogénico), genisteína,

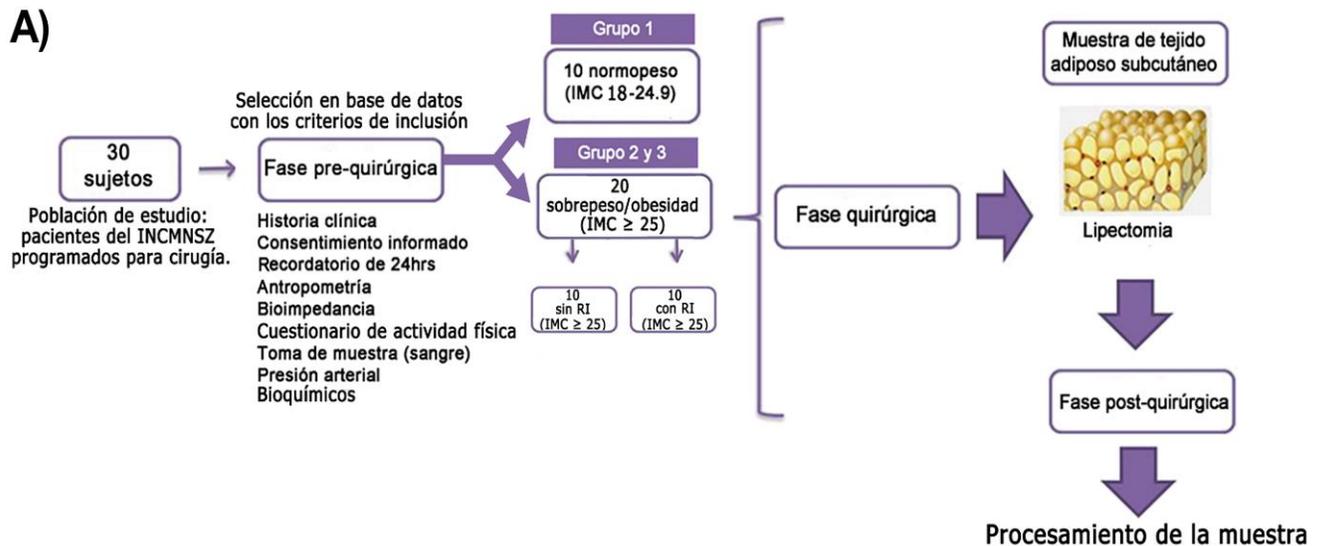
resveratrol y combinación resveratrol/genisteína para comprobar el perfil del adipocito beige de cada uno de los 3 grupos de donadores.

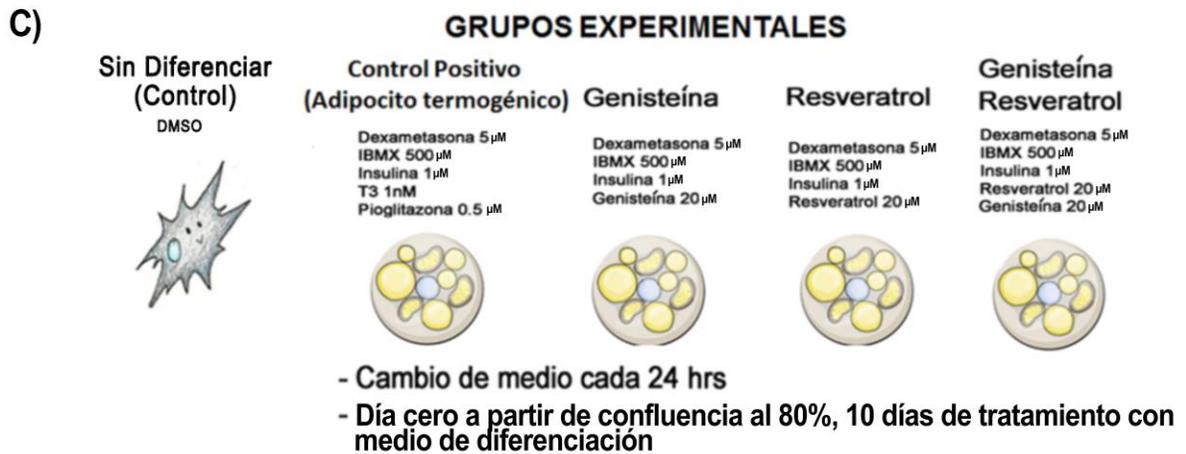
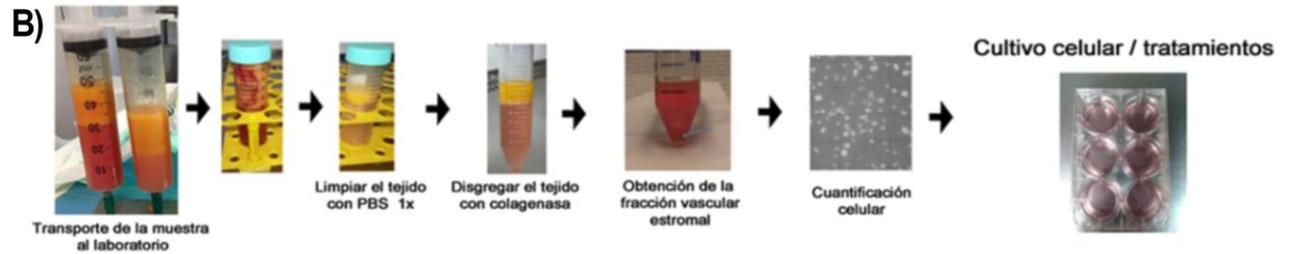
4- Determinar la concentración y presencia de las proteínas CIDEA, UCP1, PRDM16, PGC1a, Shox2 de células troncales mesenquimales diferenciadas in vitro en cada uno de los de 5 grupos de estudio: sin diferenciar (control), control positivo (adipocito termogénico), genisteína, resveratrol y combinación resveratrol/genisteína para comprobar el perfil del adipocito beige de cada uno de los 3 grupos de donadores.

5- Determinar la expresión relativa de ARNm de marcadores de estrés del retículo endoplásmico ATF6, BIP Y CHOP a partir de adipocitos derivados de sujetos normopeso sanos, con sobrepeso/obesidad sin resistencia a la insulina y con sobrepeso/obesidad con resistencia a la insulina.

METODOLOGÍA

Diseño general y tratamientos





Diseño general y tratamientos. (A) Diseño y seguimiento de la muestra. (B) Manejo y tratamiento de la muestra de tejido adiposo subcutáneo para disgregación y cuantificación celular. (C) Asignación, cultivo y tratamiento de diferenciación de las muestras celulares de tejido adiposo subcutáneo en los distintos grupos experimentales.

Tamaño de la muestra

Se calculó el tamaño de muestra basado en la fórmula comparación de dos medias [40] con un error alfa de 0.50 ($Z_a=1.96$) y una potencia del 90% con un valor beta de 0.10 ($Z_b=1.282$), considerando la diferencia de cambio de la expresión de TBX1 y PGC1 α en un estudio previamente realizado en nuestro laboratorio en modelo animal (ratones) (datos en proceso de publicación). Para el grupo con genisteína la diferencia en la media del cambio en la expresión de TBX1 fue de 0.4 ± 0.3 unidades relativas, y para PGC1 α la diferencia en la media del cambio en la expresión de 3 ± 0.7 unidades relativas. Con resveratrol se empleó la diferencia en la media del cambio en la expresión de 0.3 ± 0.25 unidades relativas (hembras) y 0.55 ± 0.43 unidades relativas (machos) en cuanto a la expresión de TBX1, y en cuanto a PGC1 α se empleó la diferencia en la media del cambio en la expresión de 5 ± 0.7 (hembras) y 16 ± 3.4 (machos) unidades relativas. Al momento

actual desconocemos la media, desviación estándar para los transcritos de los genes de los factores de transcripción en humanos.

$$\text{Fórmula: } n = 2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2 / \Delta^2$$

Sustitución de fórmulas:

$$\text{TBX1: } n = 2(1.96 + 1.282)^2 (0.3)^2 / (0.4)^2 = 3.64$$

$$\text{PGC1}\alpha: n = 2(1.96 + 1.282)^2 (0.7)^2 / (3)^2 = 0.35$$

$$\text{TBX1: } n(F) = 2(1.96 + 1.282)^2 (0.25)^2 / (0.3)^2 = 4.50$$

$$n(M) = 2(1.96 + 1.282)^2 (0.43)^2 / (0.55)^2 = 3.96$$

$$\text{PGC1}\alpha: n(F) = 2(1.96 + 1.282)^2 (0.7)^2 / (5)^2 = 0.12$$

$$n(M) = 2(1.96 + 1.282)^2 (3.4)^2 / (16)^2 = 0.29$$

Se consideró el tamaño de muestra más grande y se agregó un porcentaje del 20% de pérdidas ($n = 4.50 + 0.90 = 5.40 \sim 6.00$), obteniendo un tamaño de muestra redondeado de 6 personas por grupo.

Criterios de selección y características de los sujetos de estudio

SIN OBESIDAD	
Inclusión	Exclusión
IMC ≥ 18 y ≤ 24.9 kg/m ² . CON HOMA IR < 2.5	HOMA IR > 2.5

SOBREPESO / OBESIDAD SIN RI	
Inclusión	Exclusión
IMC ≥ 25 kg/m ² CON HOMA IR < 2.5	HOMA IR > 2.5

SOBREPESO / OBESIDAD CON RI	
Inclusión	Exclusión
IMC ≥ 25 kg/m ² HOMA IR > 2.5	CON HOMA IR < 2.5

Criterios de inclusión generales:

- 1-masculino/femenino
- 2-Adultos entre 20 y 50 años
- 3-Pacientes que sean candidatos a cirugía previamente programada (fundoplicatura de Nissen, Resección de colgajos en pacientes, herniodplastias, miotomía de heller para acalacia y colecistectomía)
- 4-La firma del consentimiento informado.

Criterios de exclusión generales:

- 1- Pacientes con cualquier tipo de enfermedad metabólica o proceso inflamatorio en curso.
- 2- Pacientes con enfermedades adquiridas que produzcan secundariamente obesidad.
- 3- Pacientes que hayan sufrido algún evento cardiovascular.
- 4- Enfermedades catabólicas como el cáncer y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- 5- Tratamiento con los siguientes medicamentos:
 - * Tratamiento o fármacos antihipertensivos.
 - Tratamiento con hipoglucemiantes o insulina y antidiabéticos.
 - * Tratamiento con estatinas, fibratos u otros fármacos para control de la dislipidemia.
 - *Uso de medicamentos esteroides, quimioterapia, inmunosupresores o radioterapia.
 - * Anorexigénicos o que aceleren la pérdida de peso como orlistat.

Resistencia a la insulina (RI) Basado en HOMA-IR

Este estudio se realizó en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ), Ciudad de México. Los criterios para el estudio transversal incluyeron sujetos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 60 años, sometidos a cirugía laparoscópica.

Los sujetos se dividieron según los criterios de inclusión para cada grupo: el grupo de peso normal (NW) incluía sujetos con índice de masa corporal (IMC) ≥ 18 y $\leq 24,9$ kg / m² con índice HOMA-IR <2.5; los sujetos con sobrepeso u obesidad pero sensibles a la insulina, referido como el grupo de sobrepeso / obesidad sensible a la insulina (OIS), incluyó sujetos con IMC ≥ 25 kg / m² con índice HOMA-IR <2.5; sujetos con sobrepeso u obesidad y resistentes a la insulina, referidos como sobrepeso / obesidad resistente a la insulina (OIR), el grupo incluyó sujetos con IMC ≥ 25 kg / m² con índice HOMA-IR > 2.5. El HOMA-IR se calculó de la siguiente manera: $HOMA = (\text{glucosa en ayunas; mmol / l}) \cdot (\text{insulina en ayunas; pg / ml}) / 22.5$.

Los criterios de exclusión consideraron a pacientes con enfermedad establecida que puedan ocasionar obesidad secundaria, pacientes que tuvieron un evento cardiovascular, enfermedades catabólicas como cáncer o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pacientes en tratamiento con alguno de los siguientes medicamentos: antihipertensivos, hipoglucemiantes o insulina, tratamiento con estatinas, fibratos u otros fármacos para el control de dislipidemias, uso de medicamentos esteroides, quimioterapia, inmunosupresores o radioterapia, uso de anorexígenos o aceleradores de la pérdida de peso.

Este estudio se realizó de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki, y todos los procedimientos que involucraron a seres humanos fueron aprobados por el Comité de Ética del INCMNSZ (número de aprobación 2053). Se informó a todos los participantes sobre el alcance y los procedimientos del estudio y se obtuvo formalmente el consentimiento informado por escrito.

Técnicas y equipos utilizados en las mediciones de variables

Medidas antropométricas

El peso corporal, la estatura y la circunferencia abdominal se tomaron de acuerdo a la técnica de Lohman previo a la cirugía, medición por triplicado el mismo día, efectuado por personas previamente estandarizadas [91].

Presión arterial

Para esta medición se les pide a los pacientes que coloquen el brazo izquierdo si es diestro y viceversa a la altura del corazón, apoyándolo en una mesa o el brazo del sillón. Se coloca el equipo alrededor del brazo desnudo, entre el hombro y el codo. Posteriormente se posiciona la campana del estetoscopio en la flexura del codo, justo por debajo del manguito del esfigmomanómetro y se bombea la pera con rapidez hasta que la presión alcance 30 mm Hg más de la máxima esperada, después se desinfla el manguito

lentamente haciendo que la presión disminuya 2 a 3 mm Hg por segundo, se escucha el sonido del pulso a medida que cae la presión, cuando el latido se hace audible se anota la presión, que es la presión máxima o sistólica. Se continúa el desinflando finalmente cuando el latido deja de oírse, se anota de nuevo la presión, que es la presión mínima o diastólica. Se repite el proceso al menos una vez más para comprobar las lecturas.

Determinación de parámetros bioquímicos

Las muestras de sangre (10 ml) de los pacientes se obtuvieron después de un ayuno de entre 8 a 12 horas previamente a la cirugía. Posteriormente, la muestra de sangre se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm por 10 minutos, se separó el suero manteniéndose a una temperatura de - 80° hasta su análisis.

- Perfil de lípidos: las concentraciones en suero de colesterol total y de los triglicéridos se determinaron por métodos enzimáticos (Cobas c111). El colesterol-HDL y el colesterol-LDL se determinaron por método enzimático y colorimétrico (Cobas c111).

- La concentración de glucosa en suero se determinó por espectrofotometría y método enzimático de referencia empleando hexocinasa (Cobas c111).

Para la insulina y proteína c reactiva (PCR) se utilizaron kits especializados de Elisa en Microplaca (ALPCO).

Técnicas quirúrgicas

Los pacientes fueron programados para cirugía en el INCMNSZ y se les invitó a participar en el proyecto, firmando la carta de consentimiento previo al procedimiento. El procedimiento se realizó por un cirujano especialista. Los pacientes fueron previamente anestesiados (bloqueo subaracnoideo), con colocación de campos estériles, previa asepsia y antisepsia de la región. Se realizó al paciente una incisión abdominal de 0.5 a 1 cm donde se llevó a cabo un corte de tejido celular subcutáneo a nivel del trocar supraumbilical para el procedimiento laparoscópico. Se realizó la toma de muestra de 3 a 5 cm³ con tijeras a nivel periumbilical, se realizó hemostasia con monocauterío, y posteriormente se realizaron las siguientes incisiones para continuar con la cirugía:

Colecistectomía y funduplicatura nissen laparoscópica, hernioplastia umbilical abierta, o recesión de colgajos.

Aislamiento de células precursoras del tejido adiposo

Durante la cirugía se obtuvieron de 3 a 5 cm³ de tejido adiposo subcutáneo de la región abdominal de cada paciente, se colocó en un tubo estéril con 30 ml con HBSS (Solución salina balanceada de Hank's) con albúmina (5%) y se transportó para su procesamiento en campanas de flujo laminar.

Las células precursoras se aislaron del tejido adiposo por el método de separación con colagenasa de la siguiente manera: el tejido se lavó con solución PBS 1x estéril a 37°C dos veces para eliminar la sangre residual, posteriormente se incubó por 20 min en una solución de colagenasa al 5% en HBSS. Una vez disgregadas, las células se filtraron en una malla de 100 micras y se centrifugó a 1000 rpm por 5 min para separar las células del estroma vascular de los adipocitos. Se eliminó el sobrenadante y las células compactadas se resuspendieron en 20 ml de medio DMEM-F12 estéril a 37°C y se repitió la centrifugación. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), se cuantificó la densidad y viabilidad de las células y se sembraron en 5 placas de 6 pozos a una densidad de 200,000 células/cm² en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (10%). Se cambió el medio cada 24hrs hasta que las células alcanzaron confluencia.

Cultivo celular e inmunofenotipo

Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se dividieron en 5 grupos:

Sin diferenciar (control): solo medio DMEM-F12 con vehículo (DMSO).

Control positivo (adipocito termogénico): medio DMEM-F12 suplementado con insulina (1 µM), dexametasona (5 µM), IBMX (500 µM), T3 (1nM), Pioglitazona (0.5 µM).

Genisteína: medio DMEM-F12 suplementado con insulina (1 µM), dexametasona (5 µM), IBMX (500 µM), genisteína (20 µM).

Resveratrol: medio DMEM-F12 suplementado con insulina (1 μ M), dexametasona (5 μ M), IBMX (500 μ M), resveratrol (20 μ M).

Genisteína / Resveratrol: medio DMEM-F12 suplementado con insulina (1 μ M), dexametasona (5 μ M), IBMX (500 μ M), resveratrol/genisteína (20 μ M).

Se cambió el medio de los tratamientos cada 24 hrs y después de 10 días de tratamiento de diferenciación una de las 5 cajas de 6 pozos se analizó con la técnica rojo oleoso, de 2 cajas se obtuvo el RNA, y de las ultimas 2 cajas las proteínas totales.

El inmunofenotipo de las células se determinó por citometría de flujo en células sin tratamientos. Brevemente, se incubaron 1.5×10^5 células con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo (BD Biosciences): FITC CD90 (cat. 555595), PE CD105 (cat. 560839), APC CD73 (cat. 560847), PE CD166 (cat. 559263), FITC CD44 (cat. 559263) y APC CD54 (cat. 559771) para células troncales mesenquimales (MSC). FITC CD45 (cat. 555482), PE CD34 (cat. 550761), PerCP CD14 (cat. 340585) y APC HLA-DR (cat. 559866) para el linaje hematopoyético y células troncales hematopoyéticas (HSC). Las células fueron analizadas usando un sistema de citometría de flujo FACS ARIA III (Becton Dickinson). Los datos se adquirieron con FACS Diva y se analizaron con el software Flow Jo (Becton Dickinson).

Tinción de lípidos

Las células estromales vasculares humanas diferenciadas se lavaron con solución PBS 1x y se fijaron durante 60 minutos utilizando un fijador de calcio al 10% de formol (1,0 g de CaCl_2 , 25.0 ml de paraformaldehído al 16% y 75.0 ml de agua destilada). Las células se lavaron dos veces con PBS 1X y 20 segundos con etanol al 70%. A continuación, los cultivos se incubaron durante 5 minutos con una solución filtrada de rojo oleoso O (2.0 g de rojo oleoso O en polvo en 50 ml de etanol al 70% y 50 ml de acetona) para su tinción, se lavaron con etanol al 70% y, finalmente, se llenaron las placas de seis pozos con PBS 1x antes de visualizar las células con un microscopio invertido con fluorescencia Eclipse Ti (Nikon). La segunda tinción mediante el reactivo BODIPY (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno) es una técnica en dos pasos, que se realiza utilizando un

colorante fluorescente de lípidos neutros (el rango de emisión es de 510 a 665 nm) (D3922, Molecular Probes, Carlsbad, California, EE. UU.). Inmediatamente después de secar las células de la solución fijadora, se añadieron 20 µg/ml de BODIPY en PBS 1x, y se tiñeron durante 20 minutos a 37 °C, en una incubadora con 5% de CO₂. La tinción se realizó en un entorno oscuro. Después de 20 minutos, se eliminó toda la solución de BODIPY e inmediatamente se lavó tres veces con PBS 1x. Las imágenes se capturaron con un objetivo de 10X y se analizaron por triplicado. Para el análisis de imágenes se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Extracción de RNA y cuantificación de mRNA

El RNA total de los adipocitos diferenciados se extrajo con 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. La síntesis de ADN complementario se realizó con 3 mg de RNA total usando oligo (dT) y transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se evaluó el contenido de RNA mensajero de PGC1 α , UCP1, PRDM16, CIDEA y SHOX2. Todos los genes se cuantificaron utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés en una mezcla de reacción para PCR en tiempo real con SybrGreen (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) en un equipo LightCycler 480. Se realizaron rangos dinámicos para determinar la concentración adecuada de RNA (60 ng, 12 ng, 2.4 ng, 0.48 ng y 0.96 ng) para cada uno de los genes. Las eficiencias de los rangos dinámicos se encontraron dentro del rango 90-100% para poder hacer correctamente el análisis de expresión relativa. Para la temperatura de alineamiento se utilizó la que el fabricante recomendó. Para todos los genes, las muestras se realizaron por triplicado en placas de reacción de 96 pozos. Los datos fueron analizados utilizando el software LightCycler 480 y la Cp se calculó por el método de la Segunda Derivada 2-ddct. El contenido de RNA mensajero de cada gen se normalizó con los genes constitutivos LRP1 o CLN3, como controles internos invariantes.

Extracción de proteínas y western blot

Las células se homogeneizaron en un amortiguador RIPA frío con un cóctel de inhibidores de la proteasa (Complete, Roche) y un cóctel de inhibidores de la fosfatasa (PhosSTOP, Roche) como se describe [32]. La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) en el fluorómetro Qubit™ 3.0 (Invitrogen) y se separó mediante SDS-PAGE. Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham) mediante electroblotting (Trans-Blot, Bio Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche seca no grasa al 5% o BSA, se lavaron tres veces durante 5 minutos cada una con solución salina amortiguada con Tris que contenía 0,1% de Tween (TBS-T) y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante la noche. Los anticuerpos primarios fueron los siguientes: Abcam CIDEA (1:2000) (ab62343), PRDM16 (1:1000) (ab106410), SHOX2 (1:1000) (ab55740), UCP1 (1:1000) (ab155117), y PGC1 α (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, sc-13067). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 minutos y, a continuación, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (1:3500) durante 1,5 h. La visualización se realizó con un reactivo de detección quimioluminiscente (Millipore, MA, USA). Las imágenes se analizaron con un software ChemiDoc™ XRS + System Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se utilizó β -actina (sc47778) como control de carga. Se asignó arbitrariamente un valor de 1 a las muestras de los controles, que se utilizaron como referencia para las demás condiciones.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm SEM cuando la distribución es normal o como mediana (rango) en caso contrario. Las variables dicotómicas se expresaron como frecuencias y porcentajes. Se utilizó el estadístico Z de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de las variables. Los datos que presentaban una distribución no paramétrica se transformaron logarítmicamente antes del análisis. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los tres grupos, y la prueba de

comparaciones múltiples de Dunn para las comparaciones múltiples. Se calculó la correlación de Pearson para determinar la correlación de todas las variables. El análisis se realizó con GraphPad 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.). Los datos obtenidos de los cultivos celulares se analizaron con el programa estadístico graphpad versión 8 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y la prueba de Bonferroni para determinar si la diferencia entre grupos es significativa ($p < 0.05$). Por otro lado, se utilizaron 17 variables para el análisis de componentes principales con el paquete RStudio v1.2.1335; para ello, se estandarizó la base de datos mediante el centrado y la escala, y a continuación se calcularon los vectores propios y los valores propios de la matriz de covarianza o la matriz de correlación; a continuación, se clasificaron los valores propios en orden descendente y se eligieron los K vectores propios más grandes (donde K es el número deseado de dimensiones del nuevo subespacio de características $k \leq$). Se construyó la matriz de proyección W a partir de los K vectores propios seleccionados y, por último, se transformó el conjunto de datos original X a través de W para obtener un subespacio de características de K dimensiones Y. El gráfico se diseñó con la biblioteca ggplot2 de RStudio.

RESULTADOS

Variables antropométricas y bioquímicas de los sujetos de estudio

Dado que el objetivo del presente estudio fue evaluar si las células de la fracción vascular estromal de WAT tenían diferente capacidad para diferenciarse a adipocitos en función de las características antropométricas y bioquímicas de los sujetos, era importante clasificar claramente a los sujetos en tres grupos en función de su IMC y sensibilidad a la insulina en los tres grupos NW, OIS y OIR. La edad promedio fue de 42 años (rango 38-45 años). Los sujetos del grupo NW tenían el peso corporal y el IMC más bajos en comparación con los otros dos grupos. Los sujetos del grupo OIR tenían el mayor peso corporal e IMC, y esto fue acompañado por un porcentaje significativamente más alto de grasa corporal que los grupos NW y OIS. En particular, los sujetos con resistencia a la insulina tenían casi el doble de grasa visceral que el grupo control. Como consecuencia,

los sujetos del grupo control tenían el porcentaje más alto de masa corporal magra entre los grupos (Tabla 1). Las diferencias en la composición corporal se asociaron claramente con cambios en las variables bioquímicas séricas (Tabla 1 y Fig. 8). En cuanto a la resistencia a la insulina, los sujetos del grupo sensible a la insulina tenían un promedio de HOMA-IR de 1.26, los del grupo OIS de 0.78, mientras que los del grupo OIR tenían un HOMA-IR promedio de 6.30. Consistentemente con la presencia de IR, los sujetos con OIR tenían una tendencia a mayor concentración de glucosa sérica, colesterol total y triglicéridos, y tenían una tendencia en la concentración a ser más baja de colesterol HDL entre los grupos, estos datos también nos dieron información importante para perfilar los grupos de manera correcta. A pesar de que el sobrepeso y la obesidad han sido considerados como un estado de baja inflamación, encontramos que el grupo de sujetos con resistencia a la insulina tenía niveles de PCR 9 veces más altos que los que no tenían resistencia a la insulina. No obstante, los niveles circulantes de leptina fueron más altos en el grupo OIR en comparación con los otros dos grupos, asociados a mayor masa grasa. Nuestros datos mostraron una correlación positiva y significativa entre el IMC, la masa grasa corporal total y la masa grasa visceral. En consecuencia, también hubo una correlación positiva entre los niveles circulantes de leptina y la masa grasa visceral, mientras que los niveles circulantes de adiponectina tendieron a disminuir a medida que aumentaba la cantidad de grasa visceral, sin embargo, no hubo diferencia estadística (Tabla 1 y Fig. 7). No hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol LDL, aminotransferasas y adiponectina entre los grupos (Tabla 1).

	NW n = 6	OIS n = 6	OIR n = 6	P value
Edad, años	38.8 ± 16.4	43.3 ± 12.4	45.67 ± 11.99	0.5344
Sexo. Fem. n (%)	2 (33.3)	2 (33.3)	5 (83.3)	0.1519
Peso, kg	60.8 ± 7.5	67.4 ± 20.8	75.8 ± 7.7	0.1935
Altura, cm	1.63 ± 0.07 ^{a, b}	1.67 ± 0.08 ^b	1.56 ± 0.07 ^a	0.049
IMC, kg/m ²	22.7 ± 1.7 ^b	27.7 ± 2.6 ^a	31.5 ± 4 ^a	0.0004
CC, cm	82 (75.2–89) ^b	94.5 (81–106) ^a	97.5 (99–106) ^a	0.0057
PAS, mmHg	106.8 ± 9.1	109.8 ± 19.5	107.8 ± 14.4	0.9401
PAD, mmHg	73 ± 8.4	72.3 ± 10.6	74 ± 11.8	0.9614
MG, %	23.2 ± 7.1 ^b	31.9 ± 4.7 ^b	41.3 ± 5.9 ^a	0.0004
MG, kg	14.1 ± 4.3 ^b	25 ± 6.4 ^a	32 ± 6.4 ^a	0.0003
MLG, %	76.8 ± 7.1 ^a	68.1 ± 4.7 ^a	58.7 ± 5.9 ^b	0.0004
MLG, kg	46.8 ± 7.8	52.9 ± 7.4 ^a	45.1 ± 5.4	0.1542
AGV, cm ²	52 (40.3–96.3) ^b	85.7 (78–150) ^a	120.4 (99.3–145.1) ^a	0.0017
GLU, mg/dL	82.3 ± 4.2 ^b	89.3 ± 6.1 ^a	93.3 ± 8.6 ^a	0.0312
CT, mg/dL	164.5 ± 25.3	153.6 ± 35.8	185.8 ± 39.9	0.2827
HDL, mg/dL	53.4 ± 20.4	46.1 ± 14.6	32.8 ± 10.7	0.1028
LDL, mg/dL	107.3 ± 15	107.2 ± 31.2	109.8 ± 42.8	0.9873
TG, mg/dL	105.5 ± 28.8	130.5 ± 62.3	237.8 ± 148.2	0.0520
PCR, mg/L	0.78 (0.22–14)	1.2 (0.68–2.3)	3.42 (0.1–47)	0.1817
ALT, UI/L	25.6 ± 16.1	19 ± 5.2	27.8 ± 8.8	0.3137
AST, UI/L	20.4 ± 8.7 ^{a, b}	21 ± 3.1	28 ± 6.1	0.1062
LEP, ng/ml	6.6 ± 3.6 ^b	11 ± 7.8 ^a	39.3 ± 32.5 ^a	0.014
ADPN, µg/ml	7.0 (3.9–11.6) ^a	3.4 (2.5–5.3) ^b	4.4 (2.6–10.6) ^{a, b}	0.0421
INS, µU/ml	6.3 ± 3.7 ^{a, b}	3.5 ± 2.3 ^b	27.3 ± 15.6 ^a	<0.0001
HOMA-IR	1.3 ± 0.7 ^b	0.8 ± 0.5 ^b	6.3 ± 3.7 ^a	0.0002

Tabla 1. Características bioquímicas y antropométricas de los grupos de estudio. Los valores de los parámetros bioquímicos y los datos antropométricos se presentan como frecuencias y porcentajes, media ± desviación estándar o por mediana (rango). número de muestra; peso, altura, IMC: índice de masa corporal, CC: circunferencia de la cintura, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, MG: masa grasa, MLG: masa libre de grasa, AGV: área de grasa visceral, GLU: glucosa, CT: colesterol total, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, TG: triglicéridos, PCR: proteína C reactiva, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato transaminasa, LEP: leptina, ADPN: adiponectina, INS: insulina, HOMA-IR: Evaluación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina. Las variables se analizaron mediante One Way-ANOVA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos a > b. En sujetos de peso normal (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR).

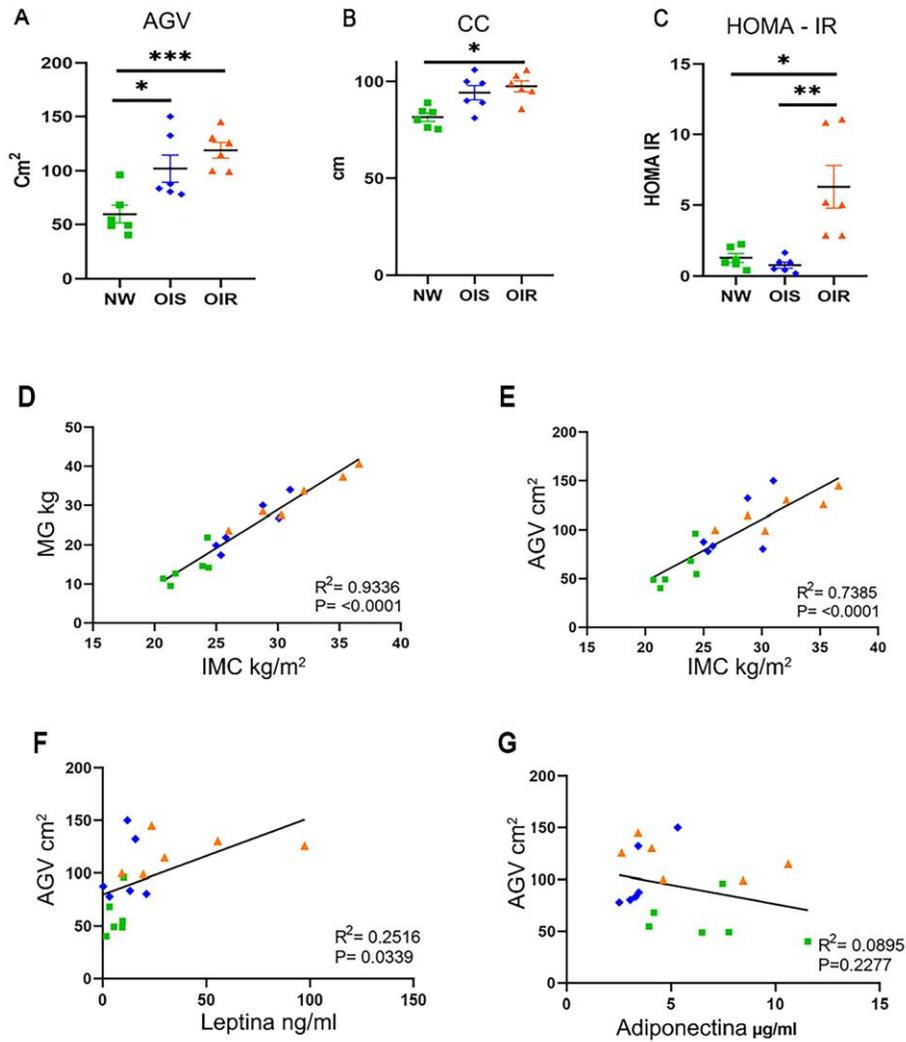


Figura 7. Parámetros antropométricos y del metabolismo lipídico de los sujetos de estudio. A. AGV: Área de grasa visceral (cm²), B. CC: Circunferencia de la cintura, C. HOMA-IR: Evaluación del modelo de homeostasis de la insulina resistencia, D. Correlación entre masa grasa (MG,kg) e IMC, E. Correlación entre área de grasa visceral (AGV cm²) e IMC, F. Correlación entre área de grasa visceral (AGV cm²) y leptina (ng / ml), G. Correlación área de grasa visceral (AGV cm²) y adiponectina (µg / ml). En sujetos de peso normal (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). n = 6, los datos se presentan como media más el error estándar de la media (SEM). Se indican diferencias estadísticamente significativas por encima de las barras: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

La obesidad y la resistencia a la insulina inhiben el proceso de pardeamiento en las células de la fracción vascular estromal humanas de tejido adiposo.

Se extrajeron y procesaron las muestras de grasa abdominal subcutánea de sujetos sometidos a cirugía electiva para obtener la fracción vascular estromal. Se evaluó la viabilidad celular y fue en promedio de 95%. Luego, estudiamos si la fracción del estroma vascular de sujetos en los grupos NW, OIS y OIR tenían la capacidad de diferenciarse en células beige / brite en respuesta a los inductores de pioglitazona / T3 como se reporta en los siguientes trabajos [26], [41] (figura 8 y figura 9). Los resultados mostraron que hubo una disminución en la capacidad de diferenciación de los sujetos OIS de un 32%, y de los sujetos OIR de un 60% en comparación con los sujetos NW. Para evaluar si se estimuló el proceso de pardeamiento, se evaluó la abundancia de expresión de ARNm de UCP1, así como otros marcadores del proceso de pardeamiento, incluidos PRDM16, PGC1 α , CIDEA y SHOX2. Los hallazgos demostraron la conversión de células troncales derivadas de tejido adiposo subcutáneo en células beige / brite de sujetos NW, ya que se observó un aumento significativo en la expresión de UCP1, PRDM16 y PGC1 α y una tendencia al aumento de CIDEA y SHOX2 en el ARNm (figura 8). Por otro lado, en las proteínas existe un aumento significativo en UCP1, PRD16 y PGC1 α en el grupo NW, mientras que existe una disminución en UCP1 Y PRDM16 en el grupo OIS, en el grupo OIR no existe presencia de ninguno de los marcadores en la proteína (figura 9).

De manera interesante, las células de la fracción estromal de sujetos obesos que permanecieron sensibles a la insulina también mostraron una expresión elevada de ARNm de algunos de los marcadores beige / brite tras la inducción de pioglitazona / T3 (figura 8), en particular, la abundancia de UCP1 y PGC1 α aumentó en células de sujetos con OIS (figura 9A y 9C), mientras que en células de sujetos OIR estas respuestas tenían un aumento limitado no significativo, excepto para la expresión de ARNm de SHOX2 (figura 8G).

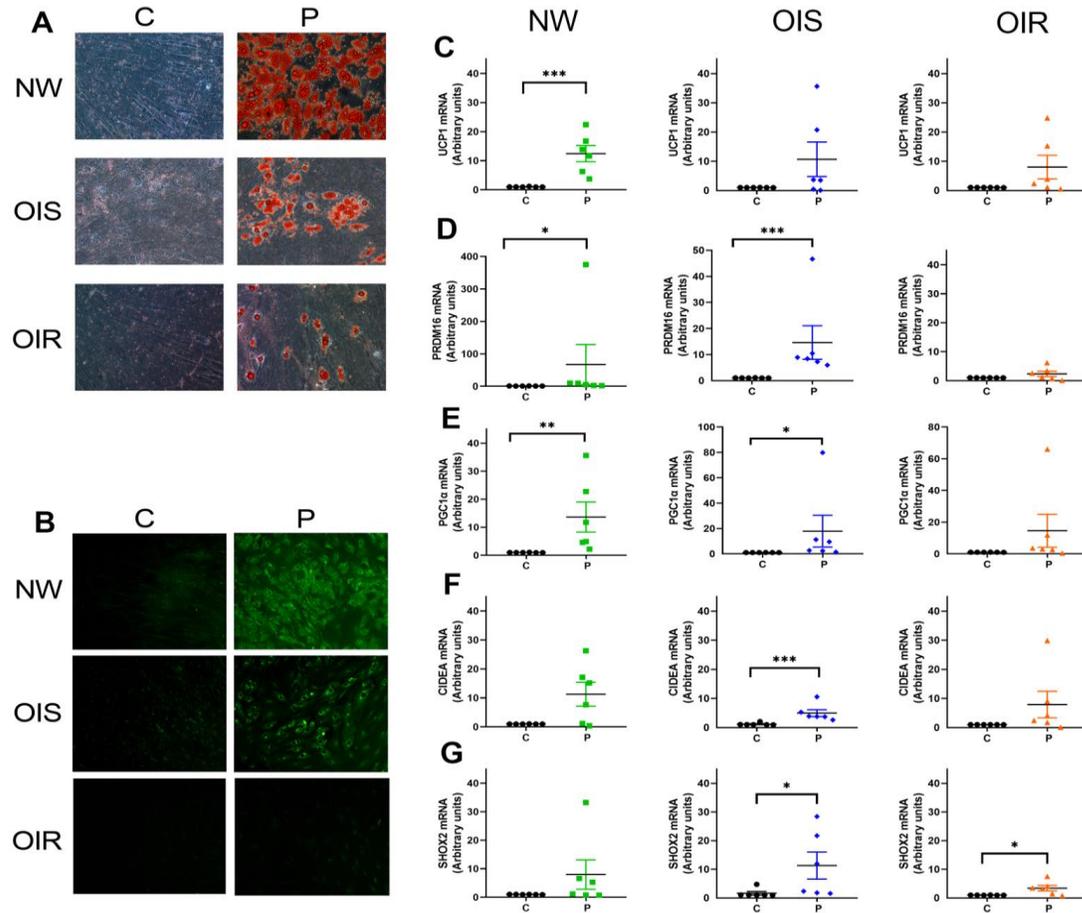


Figura 8. Tratamiento con pioglitazona / T3 y marcadores para adipocitos beige / brite diferenciación de células SVF. (A) Tratamiento de diferenciación con pioglitazona / T3 y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con rojo oleoso O, (B) Tratamiento de diferenciación con pioglitazona / T3 y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con BODYPI, análisis Q-PCR del expresión de marcadores beige / brite en el día 12 de UCP1 (C), PRDM16 (D), PGC1a (E), CIDEA (F), SHOX2 (G) en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR (unidades arbitrarias). En sujetos de normopeso (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). n = 6, para el análisis Q-PCR, los datos se presentan como la media más el error estándar de la media (SEM). Diferencias estadísticamente significativas entre las células de control y tratadas se indican encima de las barras: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0001.

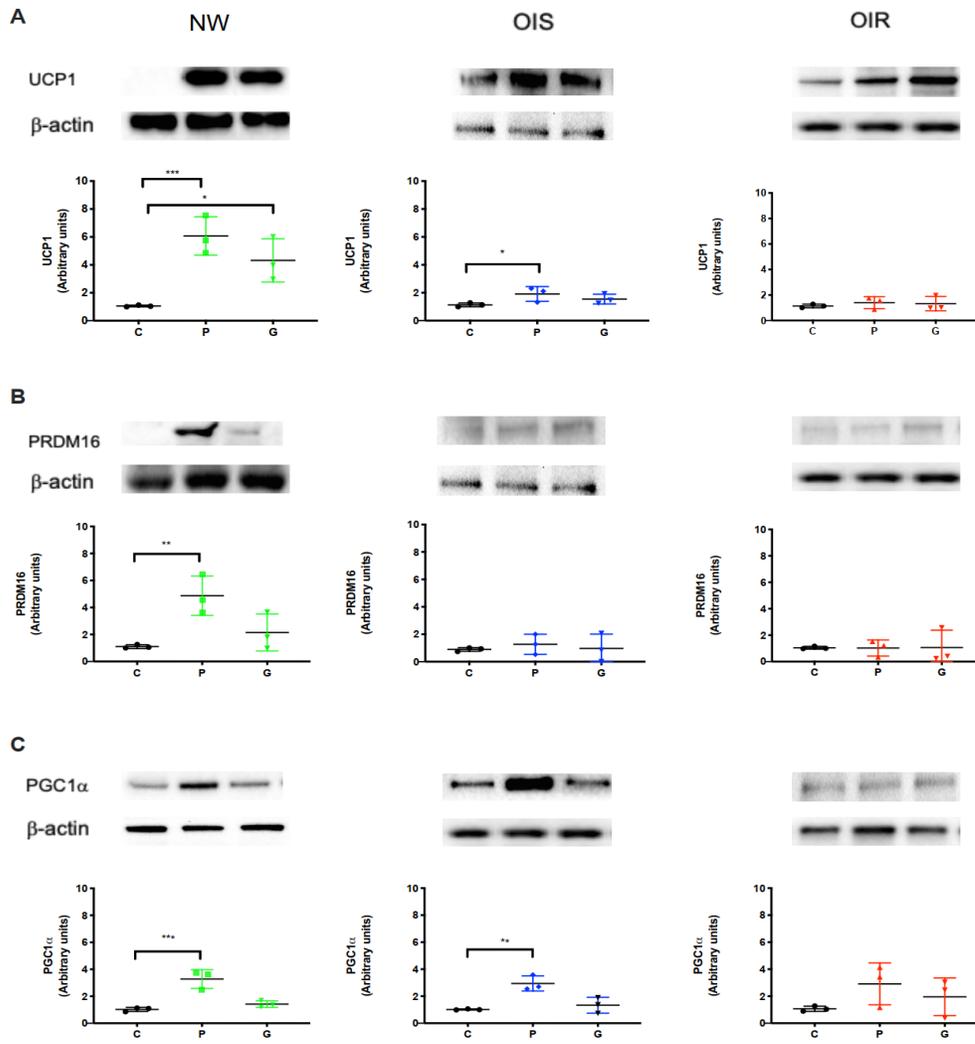


Figura 9. Expresión de las proteínas marcadores de beige. A. Expresión de la proteína UCP1 en los grupos NW, OIS, OIR con tratamiento control (C), tratamiento con pioglitazona / T3 (P) y con tratamiento con Genisteina (G). B. Expresión de la proteína PRDM16 en los grupos NW, OIS, OIR con tratamiento control (C), tratamiento con pioglitazona / T3 (P) y con tratamiento con Genisteina (G). C. Expresión de la proteína PGC1α en los grupos NW, OIS, OIR con tratamiento control (C), tratamiento con pioglitazona / T3 (P) y con tratamiento con Genisteina (G).

La genisteína promueve el pardeamiento de la fracción vascular estromal humana, pero la obesidad y la resistencia a la insulina previenen este efecto.

Dado que teníamos evidencia de que la genisteína y el resveratrol tenían la capacidad de estimular el pardeamiento del WAT en modelos animales [32], usamos estos compuestos bioactivos de forma independiente o en combinación, como inductores potenciales para estimular el pardeamiento del WAT en la fracción estromal humana (figuras 9, 10, 11, y 12). La genisteína estimuló el proceso de pardeamiento, particularmente en sujetos NW, promovió la diferenciación de la fracción estromal según lo observado por la tinción con rojo oleoso O y BODIPY (figura 10A, 10B), y el efecto de la genisteína sola fue similar al logrado por la pioglitazona / T3 (figura 8A, 8B). El aumento de la acumulación de lípidos estuvo acompañado por una elevación significativa de la expresión de ARNm de UCP1 y PGC1 α (figura 10C, 10E), y por una mayor abundancia de proteína UCP1 (figura 9). El efecto de la genisteína fue menos evidente, pero todavía estaba presente en las células de los sujetos con OIS; sin embargo, en las células de los sujetos con OIR se abolió la capacidad de la genisteína para diferenciar la fracción vascular estromal en células beige / brite (figura 10).

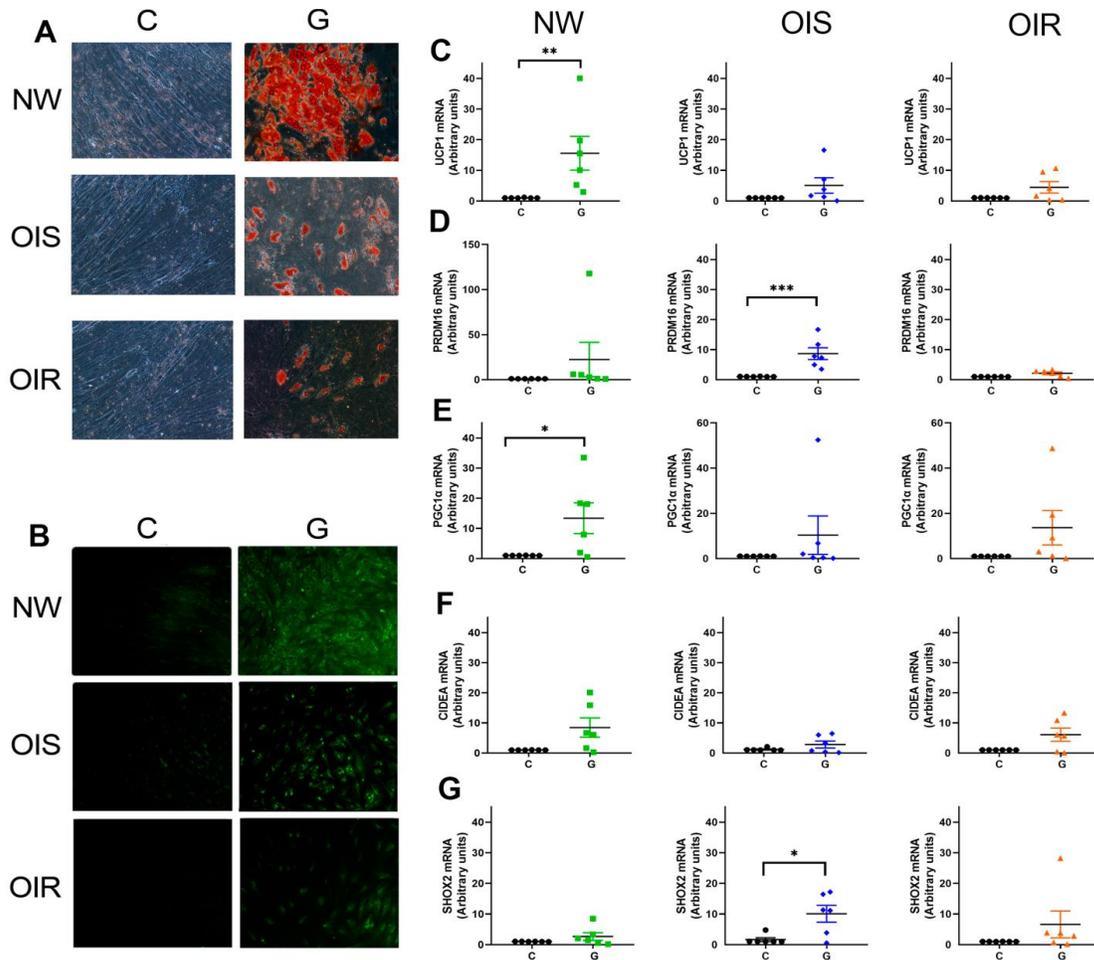


Figura 10. Tratamiento con genisteína y marcadores para adipocitos beige / brite en la diferenciación de células SVF. (A) Tratamiento de diferenciación con genisteína y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con rojo oleoso O, (B) Tratamiento de diferenciación con genisteína y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con BODYPI, análisis Q-PCR del expresión de marcadores beige / brite en el día 12 de UCP1 (C), PRDM16 (D), PGC1α (E), CIDEA (F), SHOX2 (G) en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR (unidades arbitrarias). En sujetos de normopeso (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). n = 6, para el análisis Q-PCR, los datos se presentan como la media más el error estándar de la media (SEM). Diferencias estadísticamente significativas entre las células de control y tratadas se indican encima de las barras: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

El resveratrol tiene un efecto insignificante sobre el pardeamiento de la fracción vascular estromal humana y reduce el efecto estimulante de la genisteína.

El resveratrol estimuló mínimamente el proceso de diferenciación en las células, como se observa por un leve aumento en la acumulación de lípidos, pero ningún cambio en la expresión del ARNm y la abundancia de proteínas de los marcadores de pardeamiento en ninguno de los tres grupos estudiados, excepto por un pequeño aumento en la expresión de UCP-1 en células de sujetos OIS (figura 11). Sorprendentemente, la combinación de genisteína y resveratrol no mostró un efecto aditivo o sinérgico en la diferenciación y pardeamiento de las células de la fracción vascular estromal, por el contrario, dio como resultado un aumento leve en la diferenciación de las células de la fracción vascular estromal de los sujetos NW; similar al obtenido con el resveratrol solo. Además, la combinación de genisteína y resveratrol no tuvo efecto sobre la expresión de UCP1 o cualquiera de los otros marcadores de pardeamiento probados en células de sujetos NW, sin embargo, aumentó la expresión de PRDM16 en células OIS y de PGC1 α en células OIR (figura 12). Estos resultados sugieren que el resveratrol posiblemente antagoniza el efecto de pardeamiento de la genisteína.

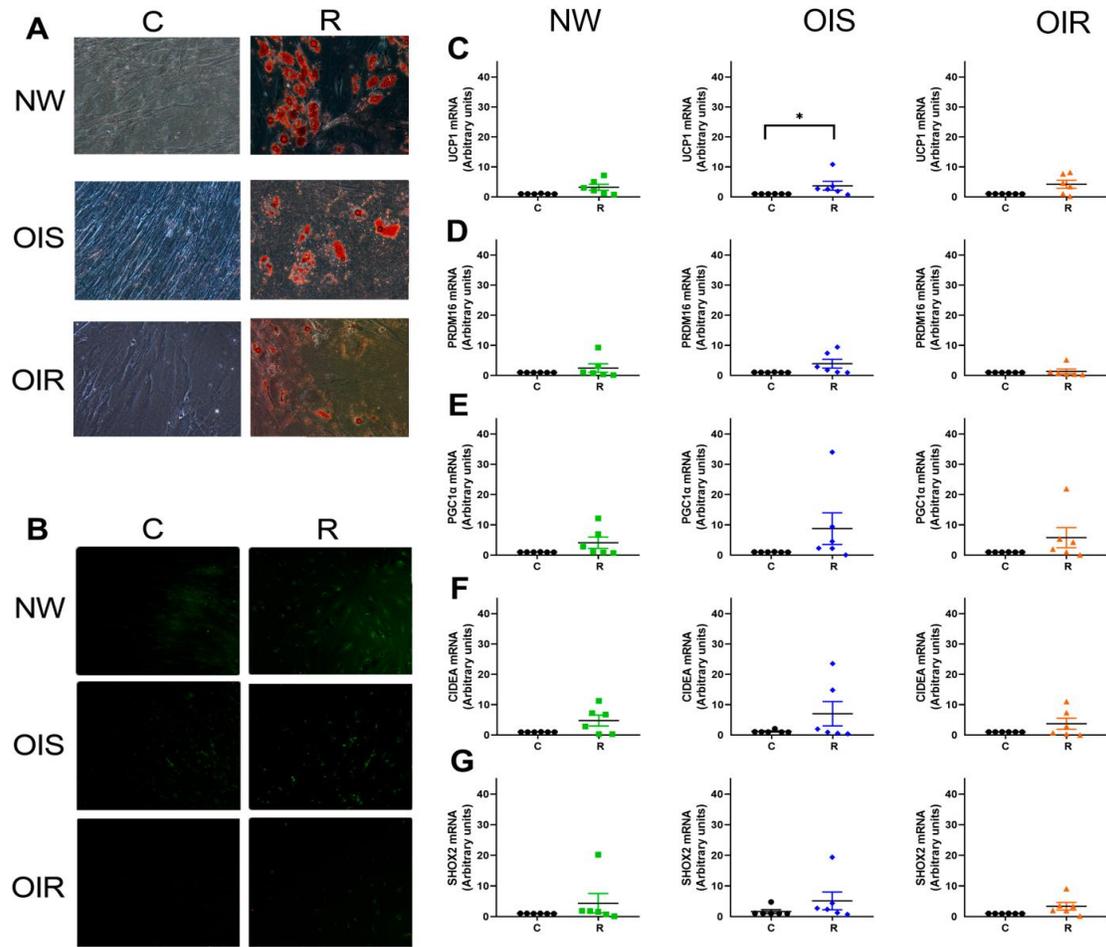


Figura 11. Tratamiento con resveratrol y marcadores para adipocitos beige / brite en la diferenciación de células SVF. (A) Tratamiento de diferenciación con resveratrol y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con rojo oleoso O, (B) Tratamiento de diferenciación con resveratrol y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron con BODIPY, análisis Q-PCR del expresión de marcadores beige / brite en el día 12 de UCP1 (C), PRDM16 (D), PGC1α (E), CIDEA (F), SHOX2 (G) en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR (unidades arbitrarias). En sujetos de normopeso (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). n = 6, para el análisis Q-PCR, los datos se presentan como la media más el error estándar de la media (SEM). Diferencias estadísticamente significativas entre las células de control y tratadas se indican encima de las barras: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

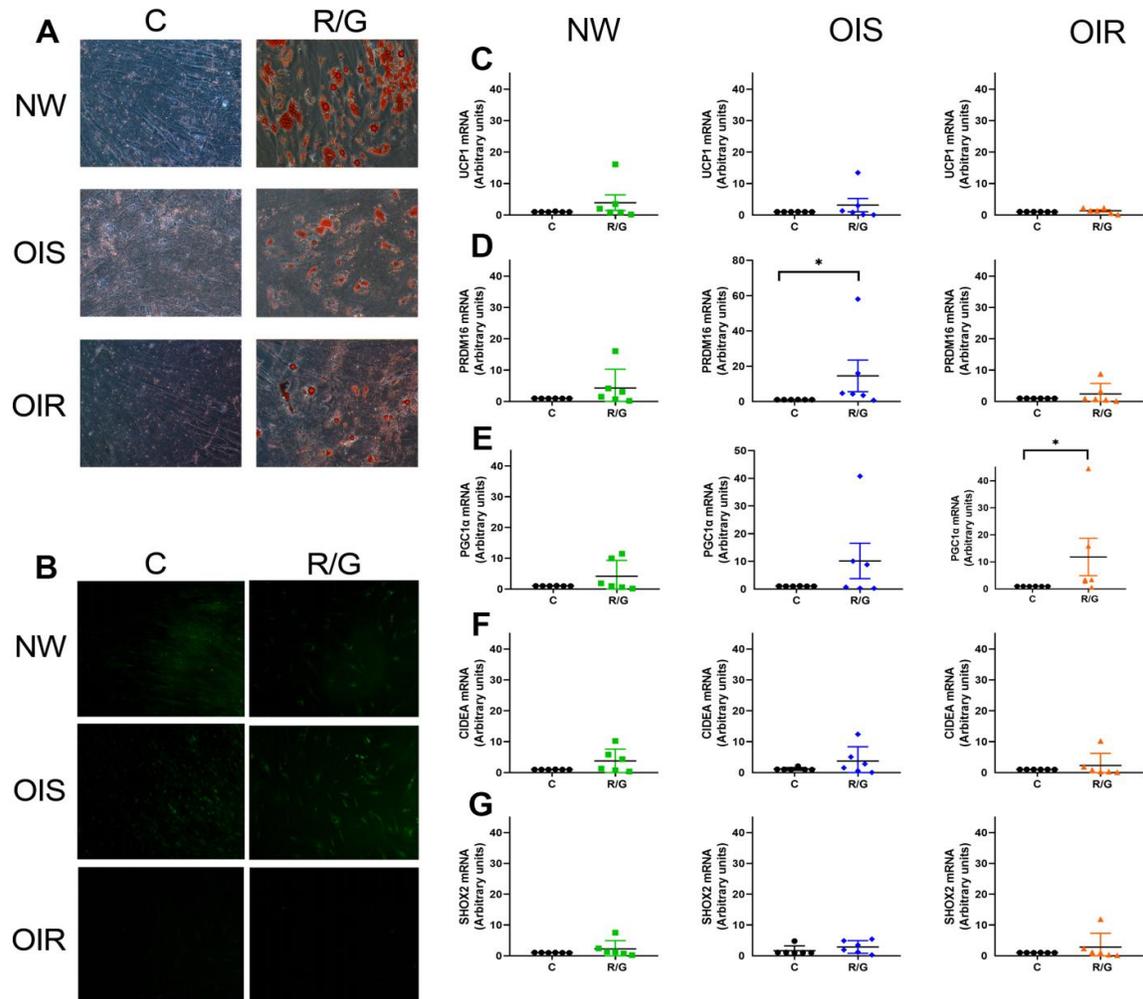


Figura 12. Tratamiento con genisteína / resveratrol y marcadores para adipocitos beige / brite en la diferenciación de células SVF. (A) Tratamiento de diferenciación con genisteína / resveratrol y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con rojo oleoso O, (B) Tratamiento de diferenciación con genisteína / resveratrol y grupo control (C), en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR el día 12 de tratamiento, las células se fijaron y se teñieron con BODYPI, análisis Q-PCR del expresión de marcadores beige / brite en el día 12 de UCP1 (C), PRDM16 (D), PGC1α (E), CIDEA (F), SHOX2 (G) en los tres grupos de estudio NW, OIS y OIR (unidades arbitrarias). En sujetos de normopeso (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). n = 6, para el análisis Q-PCR, los datos se presentan como la media más el error estándar de la media (SEM). Diferencias estadísticamente significativas entre las células de control y tratadas se indican encima de las barras: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

La abundancia de marcadores de estrés del retículo se asocia con una menor capacidad de pardeamiento en las células de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo subcutáneo.

Varios estudios han sugerido que la capacidad de diferenciación de las células de la fracción vascular estromal puede verse afectada por el estrés del retículo. Por lo tanto, se estudió si había una expresión diferencial de los marcadores de estrés del retículo en los adipocitos de sujetos con NW, OIS y OIR que podría explicar las diferencias en la capacidad de inducir el programa de pardeamiento en estos sujetos (Figura 13). Fue notablemente claro que los adipocitos de los sujetos OIR expresaron una mayor cantidad de ARNm de BIP y ATF6, en comparación con las células de sujetos NW (Figura 13 3A-B). En consonancia con su capacidad de diferenciación, los sujetos con OIS tenían cantidades intermedias de ARNm de genes de estrés retículo. Estos datos indican que los adipocitos de sujetos obesos con IR desarrollan estrés retículo, y esto puede ser un efecto causal para prevenir la diferenciación de células de la fracción vascular estromal en células beige / brite. Es importante señalar que la expresión del gen CHOP no difirió entre los grupos (Figura 13 3C), lo que indica que el estrés del retículo no condujo a la apoptosis / muerte celular. De manera interesante, encontramos una correlación significativa entre la cantidad de ARNm de BIP con el porcentaje de masa grasa, así como con el área de grasa visceral (Figura 13 3D-E).

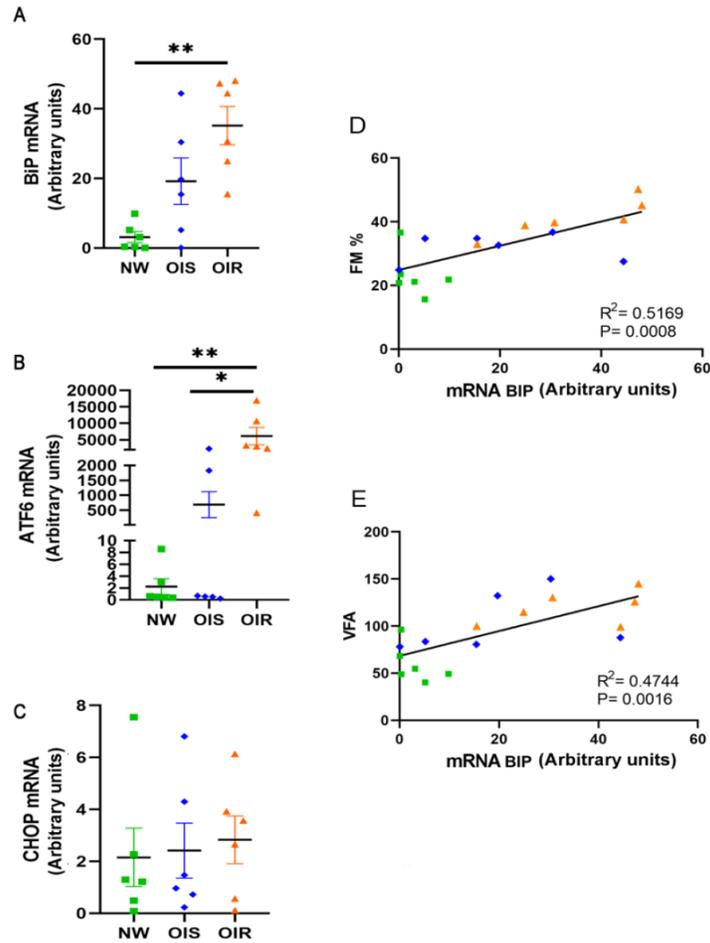


Figura 13. La expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico es mayor en las células de la fracción vascular estromal de sujetos con obesidad y resistencia a la insulina. Expresión de ARNm por Q-PCR de marcadores de ERE BIP (A), ATF6 (B), CHOP (C) en adipocitos (unidades arbitrarias) derivados de sujetos de peso normal (NW), pacientes con sobrepeso / obesidad sin resistencia a la insulina (OIS) y pacientes con sobrepeso / obesidad con resistencia a la insulina (OIR). (D) Correlación entre FM% y ARNm de BIP expresión (unidades arbitrarias), (E) Correlación entre VFA (cm²) y expresión de ARNm de BIP (unidades arbitrarias). n = 6 sujetos por grupo. Para el análisis de Q-PCR, los datos se presentan como la media más el estándar error de la media (SE). Se utilizó la prueba ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los tres grupos, y se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para las comparaciones múltiples. El Pearson Se calculó la correlación para determinar la correlación de las variables (D y E). * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

Factores implicados en la respuesta de las células de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo al pardeamiento: análisis de componentes principales.

Para determinar los factores asociados al pardeamiento del WAT en sujetos de los tres grupos experimentales y tratados con pioglitazona, genisteína, resveratrol, la combinación genisteína / resveratrol o sin tratamiento (control), se realizó un análisis de componentes principales que incluyó las siguientes variables: a) antropometría, en particular el IMC, masa magra y grasa, b) bioquímicos, que incluyen glucosa, PCR, leptina, adiponectina, insulina e índice HOMA, y c) expresión génica de los marcadores de pardeamiento UCP1, CIDEA, PGC1 α , PRDM16 y SHOX2, y de marcadores de estrés ER BIP, CHOP y ATF6 (Figura 15). El análisis reveló que el componente principal 1 (PC1) representó 49,3%, 57,3%, 66,3%, 58,1% y 71,4% de la varianza total en los grupos tratados con pioglitazona (figura 14 B), genisteína (figura 14 C), resveratrol (figura 14 D), la combinación genisteína / resveratrol (figura 14 E) o sin tratamiento (figura 14 A), respectivamente. Algo interesante, es que los principales factores incluidos en PC1 que identificaron las células fracción estromal de los grupos NW o OIS, tratadas con pioglitazona o genisteína fueron la masa corporal magra, la adiponectina y los genes del pardeamiento del WAT UCP1 y PRDM16. Sin embargo, los factores que identificaron al grupo OIR tratados con los mismos compuestos fueron grasa corporal, glucosa, insulina, índice HOMA y expresión génica ATF6 y BIP. El tratamiento de la fracción estromal con resveratrol modificó la distribución de los factores presentes en el PC1, ya que la masa corporal magra y la adiponectina representaron los factores que identificaron a los sujetos del grupo NW, mientras que la grasa corporal, la PCR, el IMC y la expresión de los genes ATF6 representaron los principales factores que explicaron la varianza de PC en los grupos OIS y OIR (Figura 14 D).

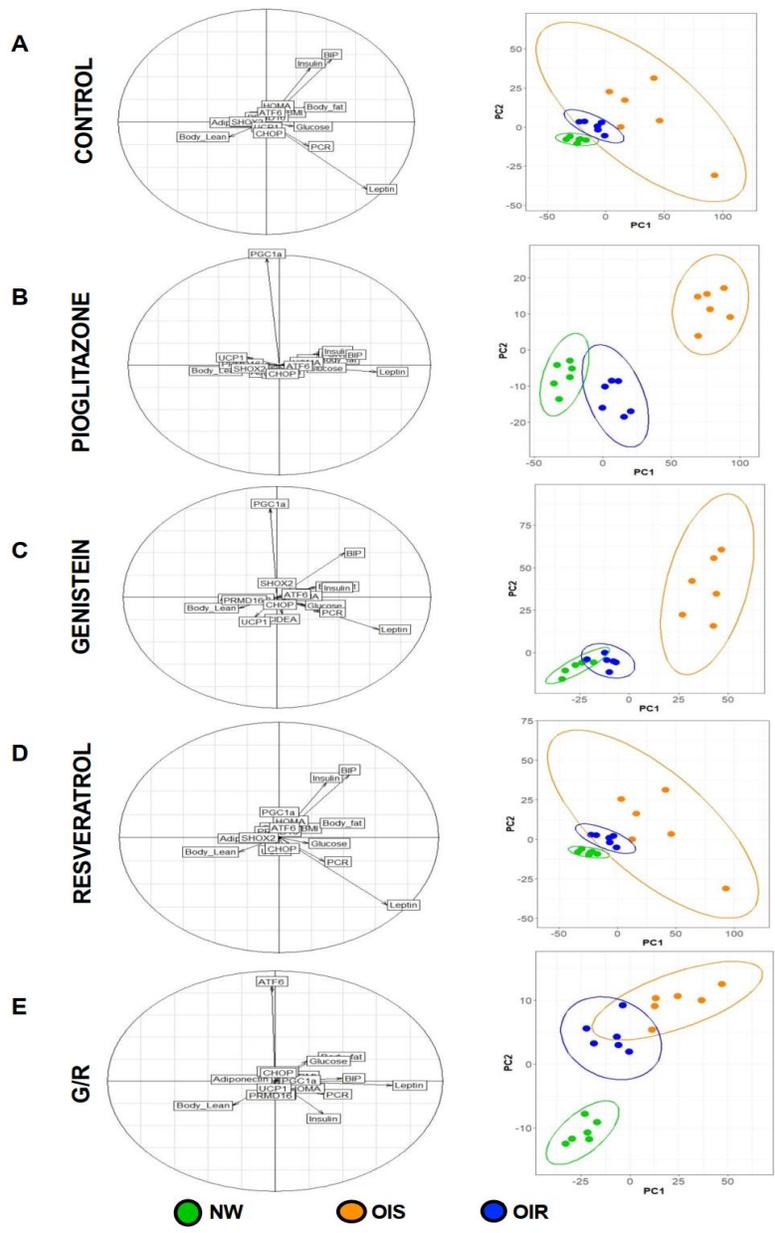


Figura 14. Análisis de componentes principales para obtener los factores asociados al pardeamiento del WAT en los 3 grupos de estudio NW, OIS y OIR. A) análisis de componentes principales a los grupos NW, OIS y OIR sin tratamiento (control) (C). B) análisis de componentes principales a los grupos NW, OIS y OIR con el tratamiento de pioglitazona (P). C) análisis de componentes principales a los grupos NW, OIS y OIR con el tratamiento genisteína (G). D) análisis de componentes principales a los grupos NW, OIS y OIR con el tratamiento resveratrol (R). E) análisis de componentes principales a los grupos NW, OIS y OIR con el tratamiento genisteína/resveratrol (G/R).

DISCUSIÓN

En la actualidad existe una creciente evidencia de que la obesidad conduce a varias alteraciones metabólicas [42], [43], en particular resistencia a la insulina [44]–[46]. Un tejido adiposo funcional es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa y lípidos [7], por lo que la disfunción del tejido adiposo juega un papel clave en el desarrollo de alteraciones en la sensibilidad sistémica a la insulina. La funcionalidad del WAT depende en parte de su capacidad para diferenciar preadipocitos en adipocitos [47], [48]. Hasta ahora, la abundancia de adipocitos de pequeño tamaño a pesar del consumo de dietas altas en energía, se considera evidencia de la plasticidad del tejido adiposo y su capacidad de diferenciación. El conocimiento reciente de que los preadipocitos en WAT se pueden diferenciar en células beige ha estimulado el desarrollo de la investigación en este campo, ya que su potencial termogénico puede ser útil para mantener el equilibrio energético [49], [50]. En nuestro estudio, encontramos que esta capacidad de formación de tejido adiposo beige se ve reducida por el sobrepeso / obesidad y por la resistencia a la insulina. Estudios previos han demostrado que la capacidad termogénica se puede estimular en condiciones *in vitro* con el uso de polifenoles como el resveratrol y la genisteína, ya que tienen la capacidad de promover el pardeamiento del WAT y, por lo tanto, el proceso de diferenciación en adipocitos beige / brite [51]. La evidencia sugiere que la administración de resveratrol en humanos da como resultado una disminución del peso corporal, el IMC, la masa grasa y el HOMA-IR, lo que lleva a una reducción de las concentraciones circulantes de triglicéridos y leptina [52]–[56]. Además, el consumo de resveratrol reduce el tamaño de los adipocitos y aumenta su proliferación. Sin embargo, algunos otros estudios no han podido demostrar estos cambios [57], [58]. Incluso en algunos casos se ha reportado que inhibe la diferenciación de adipocitos derivados de células troncales humanas de medula [59], llegando a causar apoptosis e inhibición de la adipogénesis en células 3T3-L1 [60]. Por otro lado los estudios en roedores han demostrado que la administración de resveratrol aumenta la expresión de UCP1 y PGC1 α en el tejido adiposo y el músculo esquelético, además de algunos marcadores beige / brite como PRDM16 y CIDEA [61]–[63], sugiriendo que el resveratrol tiene la capacidad de

inducir adipocitos termogénicos, pero esto no ha sido confirmado. En cuanto a la genisteína, existe evidencia preliminar que muestra que las isoflavonas que contienen genisteína pueden aumentar la expresión de marcadores termogénicos como UCP1, PGC1 α y algunos otros [64], [65]. Recientemente, demostramos que la genisteína puede estimular la expresión de marcadores termogénicos incluyendo UCP1, TMEM26, PGC1 α y CD137 en SVF de roedor y en células 3T3-L1 [32].

Algo que llama la atención es la presencia de la proteína UCP1 en pacientes de los grupos OIS y OIR del grupo experimental control, siendo que no fueron estimulados con genisteína ni pioglitazona, y esto tiene una posible razón. UCP1 en personas con obesidad llega a estar presente como mecanismo natural ante la obesidad tratando de mantener un equilibrio energético [96]. Por otro lado, también se menciona la presencia de áreas específicas en mamíferos que tienen tejido beige naturalmente activo incluso a temperatura ambiente [97], probablemente en algunos humanos tenemos esas áreas activas, pero sería interesante confirmarlo.

Sorprendentemente, los resultados del presente estudio demostraron que la capacidad de estos dos polifenoles para inducir el pardeamiento en células de la fracción vascular estromal de WAT humano es diferente e incluso antagonista entre ellos.

Aún existe el debate para determinar si la interconversión del tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige es causada por la diferenciación de novo de células precursoras o por trans-diferenciación de adipocitos blancos existentes, o ambos [28], [29]; actualmente siguen en discusión. Sin embargo, la inducibilidad de los adipocitos beige por factores nutricionales los convierten en un objetivo atractivo para aumentar la termogénesis en pacientes con obesidad y/o con diabetes [30].

En este estudio, probamos la capacidad de diferenciación de la fracción estromal obtenida de sujetos sensibles a la insulina de peso normal, sensibles a la insulina con obesidad, u con obesidad resistentes a la insulina y encontramos que el proceso de diferenciación en linaje beige / brite fue muy diferente entre los grupos, al igual que el efecto de resveratrol y / o genisteína. La capacidad de diferenciarse en células beige se promovió en gran medida cuando se obtuvieron células de la fracción estromal tratadas

con T3 / pioglitazona de sujetos con un IMC por debajo de 25. Sorprendentemente, esta capacidad de diferenciación también fue promovida por la genisteína, pero no por el resveratrol, y cuando se usan juntos el resveratrol disminuyó el efecto estimulante de la genisteína. Cabe señalar que las células no respondieron de la misma manera cuando se obtuvieron de sujetos con IMC superior a 30. Llama la atención, que las células de sujetos con sobrepeso / obesidad que permanecieron sensibles a la insulina (OIS) tenían una mayor capacidad de diferenciarse en beige / brite que las de los sujetos obesos con resistencia a la insulina, pero más bajas que las de los sujetos del grupo NW. En particular, los sujetos del grupo OIS mantuvieron una importante capacidad de diferenciación con pioglitazona / T3 o con genisteína, sin embargo, la respuesta de diferenciación tras el tratamiento con resveratrol fue muy limitada. Mientras que los sujetos del grupo OIR, casi perdieron la capacidad de diferenciación con alguno de los inductores del programa de pardeamiento. De hecho, todas estas diferencias se asociaron con cambios específicos en los marcadores de pardeamiento del WAT.

Además, la falta de respuesta de las células de los sujetos del grupo OIR se asoció con un aumento en la expresión de genes implicados en el estrés del retículo. Existe evidencia de que el ERE puede regular a la baja el proceso de pardeamiento en modelos animales o celulares *in vitro* e *in vivo* [66], [67]. Nuestros resultados indican que el entorno de obesidad compromete la capacidad de pardeamiento de las células de la fracción vascular estromal, y esto además se ve alterado por la resistencia a la insulina la cual algunos artículos lo relacionan con el estrés del retículo y la diabetes tipo2 [68]–[70] incluso cuando las células están fuera de este entorno, el programa de pardeamiento sigue siendo disfuncional, lo que sugiere que probablemente los mecanismos epigenéticos están en juego.

Por otra parte, es importante mencionar que la presencia de UCP1 es decisiva para llamar a una célula beige y que tenga una actividad desacoplante. En el artículo [91] menciona parte de esto y cito textualmente “Revelamos que las células troncales derivadas del tejido adiposo se pueden convertir de manera eficiente en adipocitos termogénicos y que tienen una firma molecular de células beige. Es importante destacar que UCP1 es

absolutamente necesario para la actividad termogénica de estas células en respuesta a los agonistas β -adrenérgicos. Por lo tanto, otros mecanismos de desacoplamiento, si existen, no sustituyen la pérdida de UCP1 en estas condiciones.” De igual manera varias investigaciones de tejido termogénico [93-95] mencionan que UCP1 es el gen representativo para decir que existe una diferenciación a tejido termogénico.

La fracción vascular estromal contiene varios tipos de células, incluidas células inmunes, células endoteliales, pericitos, células musculares y células troncales mesenquimales [71], [72]. El estrés en cada uno de este conjunto de células conduce a diferentes anomalías metabólicas [73], [74]. Se ha demostrado que el estrés del retículo de diferentes líneas celulares, especialmente la fracción vascular estromal, altera su capacidad de diferenciación y fisiología [75], [76]. En otros estudios se ha reportado que los macrófagos que son parte importante de la fracción estromal vascular se han visto afectados por el ERE [77], al igual que también se ven afectadas en su diferenciación algunas de las células que derivan del mesénquima como osteocitos y condrocitos [78], [79], incluso a tal grado de provocar apoptosis [80]. Actualmente, se han medido varios marcadores para determinar la presencia de este tipo de estrés incluyendo BIP, ATF6 y CHOP entre otros. El estrés ER se asocia con una respuesta disminuida a la insulina, inflamación crónica, estrés oxidativo y finalmente síndrome metabólico [68], [81]–[84]. Por otro lado, un artículo del 2016 [88] menciona que la genisteína podría también ayudar a activar la vía UPR por medio de la proteína CHOP en células HeLa por lo que también tendría un impacto interesante en la regulación del estrés del retículo endoplásmico, esto pudiendo impactar de forma positiva a futuros estudio in vivo para el tratamiento de enfermedades asociadas al estrés del retículo endoplásmico, de igual manera el resveratrol se ha comprobado en modelos animales como ratas y ratones que previene el síndrome metabólico, la acumulación de grasa abdominal, la supresión de leptina circulante e incluso disminución de la inflamación provocada por la obesidad esto medidado por la acción de UPR mediante las vías BIP y CHOP [89], indicando que el resveratrol probablemente tiene un potencial para la prevención de la resistencia a la insulina en

humanos impactando positivamente de igual manera en futuros estudios en modelo humanos.

De manera interesante, nuestro análisis de componentes principales reveló que entre los factores que contribuyeron en gran medida a la disminución de la capacidad de las células estromales de los sujetos con OIR para diferenciarse con cualquiera de los activadores de pardeamiento del WAT, se encontraba una mayor expresión de los genes ATF6 y BIP, lo que indicó que el estrés del retículo previno la diferenciación de estas células en adipocitos termogénicos, lo que sugiere que la combinación de obesidad y resistencia a la insulina reduce la termogénesis, contribuyendo así a una mayor acumulación de grasa corporal. De acuerdo con este concepto, el PCA también mostró que en sujetos con NW o OIS, la expresión de genes termogénicos, en particular UCP1, aumentó en respuesta solo a pioglitazona o genisteína, lo que sugiere que algunos compuestos bioactivos en la dieta pueden incrementar la termogénesis adaptativa y así modular peso corporal y contenido de grasa corporal.

Actualmente los esfuerzos para evitar el sobrepeso/obesidad se han centrado los esfuerzos particularmente en reducir ingesta de alimentos, e inhibir la absorción de lípidos [85]. El desarrollo de fármacos para atender estos problemas ha tenido muchas consecuencias en la salud de los pacientes, por lo que es importante la búsqueda de otros mecanismos particularmente asociados con el incremento en la termogénesis. El tejido adiposo es en la actualidad uno de los blancos donde más investigación se está llevando a cabo para incrementar el gasto energético en pacientes con sobrepeso u obesidad.

Sin embargo, no existe actualmente un medicamento aprobado que actúe directamente sobre el tejido adiposo que presente inflamación y sea disfuncional. Como se sabe el tejido adiposo actúa como órgano endocrino librando una serie de moléculas que tienen efecto en distintos tejidos y órganos las cuales podrían contribuir a alteraciones metabólicas. Es por ello que se debe prestar atención a nuevas moléculas que activen el programa termogénico del tejido blanco para poder mejorar la fisiología del tejido adiposo, tanto en la absorción de glucosa como en el gasto de energía [86]. Aunado a esto la activación del programa termogénico puede ayudar al aumento de oxidación de

sustratos locales lo que mejoraría la hiperlipidemia provocada por la obesidad [87]. El efecto que se busca es el aumento de gasto energético que mejore el balance energético durante la obesidad, y en la actualidad existen compuestos bioactivos dietarios que podrían utilizarse como activadores del programa termogénico como la genisteína, la cual demostramos tiene un atractivo perfil para diferenciar a tejido beige en humanos, sin embargo, con reservas del estado metabólico del sujeto al cual se le pueda emplear. Todavía hay la necesidad de más estudios en humanos para determinar si estas moléculas son capaces de mantener una respuesta de pardeamiento, así como para evaluar los posibles efectos secundarios a largo plazo.

Nuestros resultados indican que la capacidad de diferenciación de los adipocitos se puede modificar según las características individuales, lo que apoya la idea de una nutrición personalizada al incluir compuestos bioactivos y otras estrategias dietéticas. Cabe destacar que el efecto de la introducción de estos elementos en la dieta deberá revisarse y ajustarse cuidadosamente para cada sujeto.

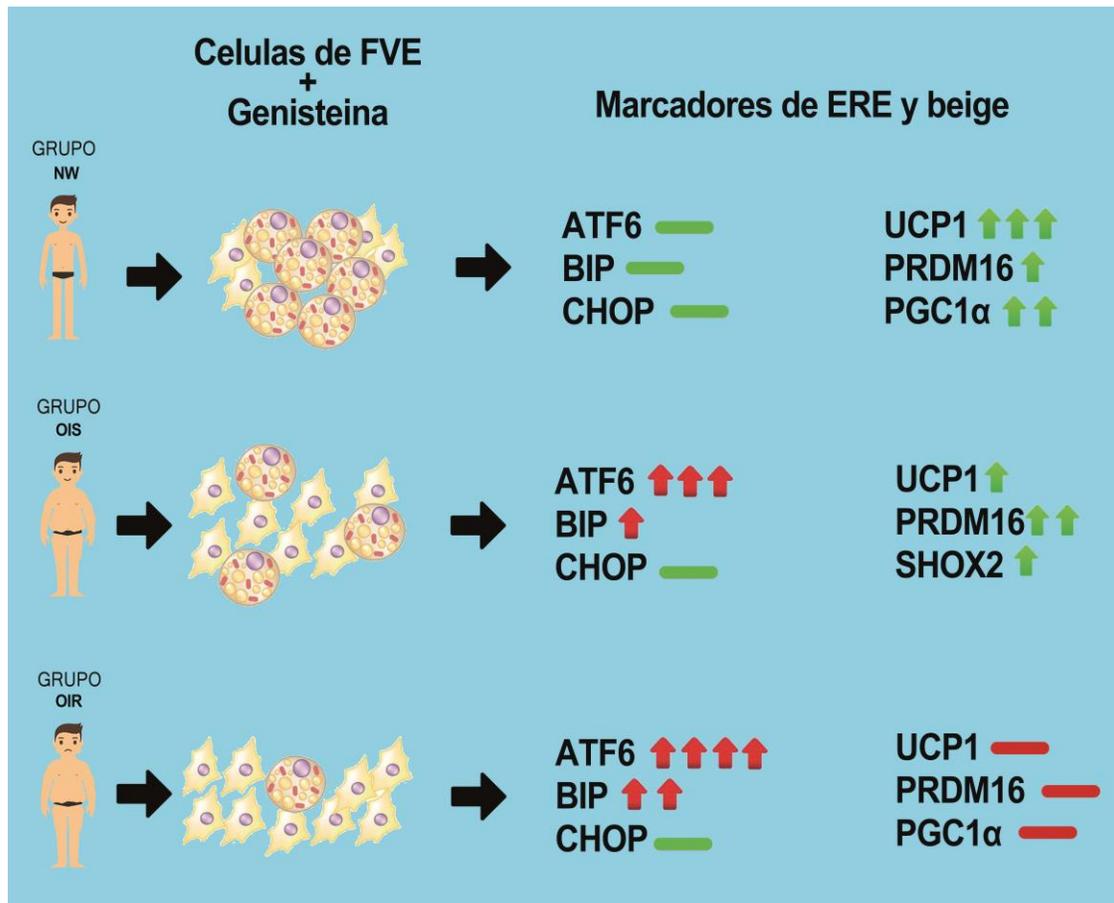
CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró que la genisteína favorece la diferenciación *in vitro* de células troncales mesenquimales de tejido adiposo subcutáneo humano a fenotipo beige, presentando una mayor capacidad de diferenciación en sujetos normo peso comparados con sujetos con obesidad. A su vez existió todavía una menor capacidad de diferenciación celular en sujetos con obesidad con resistencia a la insulina que sin resistencia a la insulina. El resveratrol por otro lado tuvo un efecto en la diferenciación de células de tejido adiposo subcutáneo a tejido beige ocasionando una reducción en el efecto de la genisteína si se usa en conjunto. Se encontró a su vez una asociación entre la presencia de marcadores del estrés del retículo endoplásmico con la disminución de la capacidad de diferenciación celular a beige en personas con obesidad con y sin resistencia a la insulina, mientras que en personas normo peso no existió tal asociación.

PERSPECTIVAS

- 1- Realizar estudios de marcas epigenéticas en las células troncales derivadas del tejido adiposo subcutáneo de genes involucrados en el proceso de diferenciación a tejido beige.
- 2- Realizar un estudio de temporalidad de expresión de los genes asociados a la diferenciación a través de tecnologías de RNAseq.
- 3- Determinar la capacidad oxidativa de las mitocondrias por medio de análisis de Seahorse de adipocitos beige derivados de las células troncales del tejido adiposo subcutáneo de sujetos NW, OIS, OIR.
- 4- Determinar la capacidad de diferenciación de estas células es dependiente de la edad de las personas.
- 5- Demostrar en sujetos NW, OIS, OIR si el consumo de genisteína por un periodo establecido estimula el gasto energético.

CONCLUSIÓN GRÁFICA



REFERENCIAS

- [1] P. G. Kopelman, "Obesity as a medical problem," *Nature*, vol. 404, no. 6778, pp. 635–643, 2000.
- [2] K. Rtveladze *et al.*, "Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden," *Public Health Nutr.*, vol. 17, no. 1, pp. 233–239, 2014.
- [3] R. S. Padwal, "Obesity, diabetes, and the metabolic syndrome: the global scourge," *Can. J. Cardiol.*, vol. 30, no. 5, pp. 467–472, 2014.
- [4] R. H. Unger and P. E. Scherer, "Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 6, pp. 345–352, 2010.
- [5] M. Lafontan, "Adipose tissue and adipocyte dysregulation," *Diabetes Metab.*, vol. 40, no. 1, pp. 16–28, 2014.

- [6] A. Vidal-Puig, "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome," in *Society for Endocrinology BES 2017*, 2017, vol. 50.
- [7] M. E. F. Vázquez-Vela, N. Torres, and A. R. Tovar, "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity," *Arch. Med. Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 715–728, 2008.
- [8] R. J. Kaufman *et al.*, "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 411–421, 2002.
- [9] M. Koc *et al.*, "Stress of endoplasmic reticulum modulates differentiation and lipogenesis of human adipocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 460, no. 3, pp. 684–690, 2015.
- [10] H. P. Harding, M. Calton, F. Urano, I. Novoa, and D. Ron, "Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 575–599, 2002.
- [11] H. Zinszner *et al.*, "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 7, pp. 982–995, 1998.
- [12] C. W. Woo, L. Kutzler, S. R. Kimball, and I. Tabas, "Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B," *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 192–200, 2012.
- [13] H. J. Cho, J. Park, H. W. Lee, Y. S. Lee, and J. B. Kim, "Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 321, no. 4, pp. 942–948, 2004.
- [14] A. T. Ali, W. E. Hochfeld, R. Myburgh, and M. S. Pepper, "Adipocyte and adipogenesis," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 92, no. 6–7, pp. 229–236, 2013.
- [15] M. A. Scott, V. T. Nguyen, B. Levi, and A. W. James, "Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Stem Cells Dev.*, vol. 20, no. 10, pp. 1793–1804, 2011.
- [16] C. M. Smas and H. S. Sul, "Control of adipocyte differentiation," *Biochem. J.*, vol. 309, no. 3, pp. 697–710, 1995.

- [17] P. Valet, G. Tavernier, I. Castan-Laurell, J. S. Saulnier-Blache, and D. Langin, "Understanding adipose tissue development from transgenic animal models," *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 6, pp. 835–860, 2002.
- [18] J. M. Rasmussen *et al.*, "Brown adipose tissue quantification in human neonates using water-fat separated MRI," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e77907, 2013.
- [19] M. E. Symonds, "Brown adipose tissue growth and development," *Scientifica (Cairo)*, vol. 2013, 2013.
- [20] J. Wu, P. Cohen, and B. M. Spiegelman, "Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 3, pp. 234–250, 2013.
- [21] J. Wu *et al.*, "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human," *Cell*, vol. 150, no. 2, pp. 366–376, 2012.
- [22] K. Ikeda, P. Maretich, and S. Kajimura, "The common and distinct features of brown and beige adipocytes," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 3, pp. 191–200, 2018.
- [23] M. Giralt and F. Villarroya, "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?," *Endocrinology*, vol. 154, no. 9, pp. 2992–3000, 2013.
- [24] P. Boström *et al.*, "A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis," *Nature*, vol. 481, no. 7382, pp. 463–468, 2012.
- [25] P. Lee, C. D. Werner, E. Kebebew, and F. S. Celi, "Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat," *Int. J. Obes.*, vol. 38, no. 2, pp. 170–176, 2014.
- [26] R. K. C. Loh *et al.*, "Pioglitazone reduces cold-induced brown fat glucose uptake despite induction of browning in cultured human adipocytes: a randomised, controlled trial in humans," *Diabetologia*, vol. 61, no. 1, pp. 220–230, 2018.
- [27] K. Johann *et al.*, "Thyroid-hormone-induced browning of white adipose tissue does not contribute to thermogenesis and glucose consumption," *Cell Rep.*, vol. 27, no. 11, pp. 3385–3400, 2019.
- [28] Q. A. Wang, C. Tao, R. K. Gupta, and P. E. Scherer, "Tracking adipogenesis during

- white adipose tissue development, expansion and regeneration," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 10, pp. 1338–1344, 2013.
- [29] M. Rosenwald, A. Perdikari, T. Rüllicke, and C. Wolfrum, "Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 659–667, 2013.
- [30] F. Villarroya and A. Vidal-Puig, "Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators," *Cell Metab.*, vol. 17, no. 5, pp. 638–643, 2013.
- [31] V. Peirce and A. Vidal-Puig, "Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue," *lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 1, no. 4, pp. 353–360, 2013.
- [32] B. Palacios-González *et al.*, "Genistein increases the thermogenic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 68, pp. 59–68, 2019.
- [33] E. D. Walter, "Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 63, no. 12, pp. 3273–3276, 1941.
- [34] S. Kim, I. Sohn, Y. S. Lee, and Y. S. Lee, "Hepatic gene expression profiles are altered by genistein supplementation in mice with diet-induced obesity," *J. Nutr.*, vol. 135, no. 1, pp. 33–41, 2005.
- [35] B. Palacios-González *et al.*, "Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids*, vol. 1841, no. 1, pp. 132–140, 2014.
- [36] S.-H. Baek *et al.*, "Treatment of obesity with the resveratrol-enriched rice DJ-526," *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [37] S. Timmers, M. K. C. Hesselink, and P. Schrauwen, "Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits?," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1290, no. 1, pp. 83–89, 2013.
- [38] A. Rosenow *et al.*, "Resveratrol-induced changes of the human adipocyte secretion profile," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 4733–4743, 2012.
- [39] B. Palacios-González, "Mecanismo de activación de ampk por genisteína

- independiente del receptor de leptina en la línea celular c2c12,” 2014.
- [40] P. Fernández, “Determinación del tamaño muestral,” *Cad Aten Primaria*, vol. 3, no. 138–14, pp. 1–6, 1996.
- [41] M. Wosnitza, K. Hemmrich, A. Groger, S. Gräber, and N. Pallua, “Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation,” *Differentiation*, vol. 75, no. 1, pp. 12–23, 2007.
- [42] D. J. Cuthbertson *et al.*, “What have human experimental overfeeding studies taught us about adipose tissue expansion and susceptibility to obesity and metabolic complications?,” *Int. J. Obes.*, vol. 41, no. 6, pp. 853–865, 2017.
- [43] I. Kyrou, G. P. Chrousos, and C. Tsigos, “Stress, visceral obesity, and metabolic complications,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1083, no. 1, pp. 77–110, 2006.
- [44] S. E. Kahn, R. L. Hull, and K. M. Utzschneider, “Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes,” *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 840–846, 2006.
- [45] F. Karpe, J. R. Dickmann, and K. N. Frayn, “Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation,” *Diabetes*, vol. 60, no. 10, pp. 2441–2449, 2011.
- [46] M. Qatanani and M. A. Lazar, “Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu,” *Genes Dev.*, vol. 21, no. 12, pp. 1443–1455, 2007.
- [47] L. J. Hutley *et al.*, “Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation,” *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 281, no. 5, pp. E1037–E1044, 2001.
- [48] A.-M. Rodriguez *et al.*, “Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 315, no. 2, pp. 255–263, 2004.
- [49] S. Kajimura, B. M. Spiegelman, and P. Seale, “Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 4, pp. 546–559, 2015.
- [50] I. G. Shabalina, N. Petrovic, J. M. A. de Jong, A. V. Kalinovich, B. Cannon, and J. Nedergaard, “UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic,” *Cell Rep.*, vol. 5, no. 5, pp. 1196–1203, 2013.
- [51] Y. Azhar, A. Parmar, C. N. Miller, J. S. Samuels, and S. Rayalam, “Phytochemicals as novel agents for the induction of browning in white adipose tissue,” *Nutr. Metab.*

- (Lond)., vol. 13, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [52] M. Méndez-del Villar, M. González-Ortiz, E. Martínez-Abundis, K. G. Pérez-Rubio, and R. Lizárraga-Valdez, “Effect of resveratrol administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion,” *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, vol. 12, no. 10, pp. 497–501, 2014.
- [53] S. Timmers *et al.*, “Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 5, pp. 612–622, 2011.
- [54] M. A. Arzola-Paniagua, E. R. García-Salgado López, C. G. Calvo-Vargas, and M. Guevara-Cruz, “Efficacy of an orlistat-resveratrol combination for weight loss in subjects with obesity: A randomized controlled trial,” *Obesity*, vol. 24, no. 7, pp. 1454–1463, 2016.
- [55] F. Faghihzadeh, P. Adibi, R. Rafiei, and A. Hekmatdoost, “Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease,” *Nutr. Res.*, vol. 34, no. 10, pp. 837–843, 2014.
- [56] M. M. Poulsen *et al.*, “High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition,” *Diabetes*, vol. 62, no. 4, pp. 1186–1195, 2013.
- [57] V. S. Chachay *et al.*, “Resveratrol does not benefit patients with nonalcoholic fatty liver disease,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 12, pp. 2092–2103, 2014.
- [58] J. Yoshino *et al.*, “Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 5, pp. 658–664, 2012.
- [59] D. Ali *et al.*, “Resveratrol inhibits adipocyte differentiation and cellular senescence of human bone marrow stromal stem cells,” *Bone*, vol. 133, p. 115252, 2020.
- [60] S. Rayalam, J. Yang, S. Ambati, M. A. Della-Fera, and C. A. Baile, “Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, vol. 22, no. 10, pp.

1367–1371, 2008.

- [61] S. Wang *et al.*, “Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1,” *Int. J. Obes.*, vol. 39, no. 6, pp. 967–976, 2015.
- [62] G. Alberdi, V. M. Rodríguez, J. Miranda, M. T. Macarulla, I. Churrua, and M. P. Portillo, “Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 2, pp. 1530–1535, 2013.
- [63] M. Asnani-Kishnani, A. M. Rodríguez, A. Serrano, A. Palou, M. L. Bonet, and J. Ribot, “Neonatal resveratrol and nicotinamide riboside supplementations sex-dependently affect beige transcriptional programming of preadipocytes in mouse adipose tissue,” *Front. Physiol.*, vol. 10, p. 83, 2019.
- [64] S. A. Aziz, L. A. Wakeling, S. Miwa, G. Alberdi, J. E. Hesketh, and D. Ford, “Metabolic programming of a beige adipocyte phenotype by genistein,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 61, no. 2, p. 1600574, 2017.
- [65] M. Zhang, K. Ikeda, J. Xu, Y. Yamori, X. Gao, and B. Zhang, “Genistein suppresses adipogenesis of 3T3-L1 cells via multiple signal pathways,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, vol. 23, no. 5, pp. 713–718, 2009.
- [66] A. Yuliana *et al.*, “Endoplasmic reticulum stress impaired uncoupling protein 1 expression via the suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ binding activity in mice beige adipocytes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 2, p. 274, 2019.
- [67] C. Contreras *et al.*, “Reduction of hypothalamic endoplasmic reticulum stress activates browning of white fat and ameliorates obesity,” *Diabetes*, vol. 66, no. 1, pp. 87–99, 2017.
- [68] U. Özcan *et al.*, “Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes,” *Science (80-.)*, vol. 306, no. 5695, pp. 457–461, 2004.
- [69] Y. Nakatani *et al.*, “Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 1, pp. 847–851, 2005.

- [70] G. Boden, "Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation?," *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 518–519, 2009.
- [71] B. Oñate *et al.*, "The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients," *FASEB J.*, vol. 26, no. 10, pp. 4327–4336, 2012.
- [72] L. Zimmerlin *et al.*, "Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue," *Cytom. Part A J. Int. Soc. Adv. Cytom.*, vol. 77, no. 1, pp. 22–30, 2010.
- [73] D. A. Banyard *et al.*, "Phenotypic analysis of stromal vascular fraction after mechanical shear reveals stress-induced progenitor populations," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 138, no. 2, p. 237e, 2016.
- [74] W.-S. Kim *et al.*, "Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 49, no. 2, pp. 133–142, 2008.
- [75] M. Longo *et al.*, "Pathologic endoplasmic reticulum stress induced by glucotoxic insults inhibits adipocyte differentiation and induces an inflammatory phenotype," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.*, vol. 1863, no. 6, pp. 1146–1156, 2016.
- [76] I. Torre-Villalvazo *et al.*, "Adiponectin synthesis and secretion by subcutaneous adipose tissue is impaired during obesity by endoplasmic reticulum stress," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 7, pp. 5970–5984, 2018.
- [77] J. Oh *et al.*, "Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 15, pp. 11629–11641, 2012.
- [78] K. Y. Tsang *et al.*, "Surviving endoplasmic reticulum stress is coupled to altered chondrocyte differentiation and function," *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 3, p. e44, 2007.
- [79] A. Saito *et al.*, "Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4809–4818, 2011.
- [80] L. Yang, S. G. Carlson, D. McBurney, and W. E. Horton Jr, "Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes

resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 35, pp. 31156–31165, 2005.

- [81] M. Cnop, F. Foufelle, and L. A. Velloso, "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes," *Trends Mol. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 59–68, 2012.
- [82] G. Boden *et al.*, "Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals," *Diabetes*, vol. 57, no. 9, pp. 2438–2444, 2008.
- [83] G. S. Hotamisligil, "Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes," *Int. J. Obes.*, vol. 32, no. 7, pp. S52–S54, 2008.
- [84] A. T. Sage, S. Holtby-Ottenhof, Y. Shi, S. Damjanovic, A. M. Sharma, and G. H. Werstuck, "Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells," *Obesity*, vol. 20, no. 4, pp. 748–755, 2012.
- [85] Y.-H. Tseng, A. M. Cypess, and C. R. Kahn, "Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 6, pp. 465–482, 2010.
- [86] K. Mössenböck, A. Vegiopoulos, A. J. Rose, T. P. Sijmonsma, S. Herzig, and T. Schafmeier, "Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e110428, 2014.
- [87] A. Bartelt *et al.*, "Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 2, p. 200, 2011.
- [88] Yang YM, Yang Y, Dai WW, Li XM, Ma JQ, Tang LP. Genistein-induced apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress in cervical cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Jul;20(15):3292-6. PMID: 27467006.
- [89] Ahmadi, A., Hayes, A. W., & Karimi, G. (2021). Resveratrol and endoplasmic reticulum stress: A review of the potential protective mechanisms of the polyphenol. *Phytotherapy Research*, 35(10), 5564-5583.
- [90] Vargas-Castillo, A., Fuentes-Romero, R., Rodriguez-Lopez, L. A., Torres, N., & Tovar, A. R. (2017). Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity?. *Archives of medical research*, 48(5), 401-

413.

- [91] Lohman T, Roche A, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Illinois: Humana Kinetics Books, 1988.
- [92] Bartesaghi, S., Hallen, S., Huang, L., Svensson, P. A., Momo, R. A., Wallin, S., ... & Peng, X. R. (2015). Thermogenic activity of UCP1 in human white fat-derived beige adipocytes. *Molecular Endocrinology*, 29(1), 130-139.
- [93] Madsen, L., Pedersen, L. M., Lillefosse, H. H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., ... & Kristiansen, K. (2010). UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PloS one*, 5(6), e11391.
- [94] Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PloS One* (2012) 7:e49452. doi: 10.1371/journal.pone.0049452
- [95] Garcia RA, Roemmich JN, Claycombe KJ. Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutr Metab* (2016) 13:24. doi: 10.1186/s12986-016-0081-2
- [96] Wang, L., Liu, Y., Hu, F., Zhou, Z., Wang, L., Liu, Y., ... & Zhou, Z. (2022). The potential mechanisms of white adipose tissue browning: a novel target for the treatment of obesity. *Nutricion Hospitalaria*, 39(2).
- [97] Chan, M., Lim, Y. C., Yang, J., Namwanje, M., Liu, L., & Qiang, L. (2019). Identification of a natural beige adipose depot in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 294(17), 6751-6761.