



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Activación de la ruta de señalización de AMPK mediada por AMPc por genisteína

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L.N. Vásquez Reyes Sarafí

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.  
INCMNSZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Adolfo García-Sainz.  
IFC, UNAM

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre.  
RAI, INCMNSZ-UNAM

Ciudad de México. Enero, 2017



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

**VOCAL:** Dr. Samuel Canizalez Quinteros

**VOCAL:** Dra. Claudia González Espinosa

**VOCAL:** Dr. Alejandro Zentella Dehesa

**SECRETARIO:** Dr. José Pedraza Chaverri

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Instituto Nacional de Ciencias médicas y nutrición "Salvador Zubirán". Departamento de fisiología de la nutrición.

**TUTOR:**

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, INCMNSZ

**COMITÉ TUTOR:**

Dr. Jesús Adolfo García Sainz, IFC, UNAM

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, RAI, INCMNSZ-UNAM

**SUSTENTANTE:**

L.N. Saraí Vásquez Reyes

# Agradecimientos

A Pablo Yanes Thomas

Por todo su apoyo y paciencia desde el inicio y durante todo este proceso, por los consejos que me dió y por la forma en la que siempre me alentó. Le agradezco eternamente.

A mi mamá y familia

A mi madre Elvia Isabel Reyes y Carballo le agradezco por el apoyo que me dió, por escuchar cada problema y dificultad por la que atravesé, aunque no entendiera del todo, siempre estuvo dandome uno de los consejos más importantes: "Ten paciencia". Le agradezco a mi familia el apoyo que me han dado para realizar esta tarea y el cariño y esfuerzo que me han dado por comprender lo importante que representa este camino para mí.

A mi mejor amiga

A Mariana García Ortega, le agradezco infinitamente por el cariño y comprensión que me ha dado, le agradezco todos los momentos que he tenido en este camino tan largo que hemos recorrido juntas.

A mis maestros

Por todas las enseñanzas, comentarios y observaciones, además de su comprensión y tiempo en mi formación académica. Principalmente agradezco al Dr. Armando Tovar Palacio y a la Dra Nimbe Torres y Torres por la gran paciencia y comprensión, por los conocimientos que me compartieron, por darme la oportunidad de desarrollarme en el laboratorio y por le apoyo que me brindaron durante este tiempo.

A mis compañeros y amigas

Por darme su apoyo, su tiempo, por todas las cosas que me enseñaron, por los momentos de comprensión y el oído que me brindaron, por su cariño y amistad. Todo lo que me han dado es invaluable para mí.

Le agradezco enormemente por el apoyo, paciencia y dedicación al Q.F.B. Guillermo Ordaz por que sin su ayuda muchas cosas no se hubieran llevado a cabo.

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

# Abreviaturas

**ABC**

Área bajo la curva.

**ACC**

Acetil CoA carboxilasa.

**AMP**

Monofosfato de adenosina .

**AMPC**

Adenosina 3',5' monofosfato cíclico.

**AMPK**

Cinasa dependiente de AMP.

**ATP**

Trifosfato de adenosina.

**cDNA**

Àcido desoxiribonucleico complementario.

**CPT-1**

Carnitina palmitoil transferasa 1.

**ER** Receptor de estrógenos.

**E2** Estradiol.

**FAS**

Ácido graso sintasa.

**FBS**

Suero bovino fetal.

**GAPDH**

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

**GPR30**

Receptor acoplado a proiteína G 30.

**HS** Suero de caballo.

**IBMX**

3-isobutil 1-metilxantina.

**JAK 2**

Cinasa de Janus 2.

**mRNA**

Ácido ribonucleico mensajero.

**pAMPK**

Cinasa dependiente de AMP fosforilada.

**PBS**

Solución amortiguadora de fosfatos.

**PPAR**

$\delta$  Receptor activado por proliferadores de peroxixomas  $\delta$ .

**PDE**

Fosfodiesterasa.

**PGC1 $\alpha$** 

Coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxixomas alfa 1.

**qPCR**

Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real.

**RT-PCR**

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

**SREPB-1**

Proteína de unión al elemento regulatorio a esteroides 1.

**UCP 3**

Proteína desacoplante 3.

# Índice general

<b>1. Resumen</b>	<b>9</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>13</b>
3.1. La enzima AMPK. Regulador de metabolismo . . . . .	13
3.2. Metabolismo de las isoflavonas . . . . .	17
3.3. Genisteína y su relación con los Receptores de Estrógenos (ER) . . .	19
3.4. Efecto antilipotóxico de la proteína de soya e isoflavonas en hígado .	21
3.5. Efectos de la genisteína en el músculo . . . . .	23
3.6. La genisteína como inhibidor de fosfodiesterasas . . . . .	25
3.7. EL GPR30, posible mediador de las acciones de la Genisteína . . . .	29
<b>4. Hipótesis y objetivos</b>	<b>31</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	31
4.2. Objetivos específicos . . . . .	31
<b>5. Metodología</b>	<b>32</b>
5.1. Cultivo celular . . . . .	32
5.2. Estímulos en cultivo celular . . . . .	33
5.3. Extracción de RNA . . . . .	33
5.4. Cuantificación relativa mediante qPCR . . . . .	34
5.5. Western blot . . . . .	35
5.6. Reactivos . . . . .	38
5.7. Análisis estadístico . . . . .	38

<b>6. Resultados</b>	<b>40</b>
6.1. Estandarización del cultivo C2C12 . . . . .	40
6.2. Relación entre distintas concentraciones de genisteína, la fosforilación de AMPK y el AMPc . . . . .	46
6.3. Determinación de fosfodiesterasas en la Línea celular C2C12. Posible blanco de la genisteína . . . . .	53
6.4. Determinación del contenido de proteína del receptor GPR30 en respuesta a la genisteína en miotúbulos C2C12. Posible mediador de los efectos de la genisteína . . . . .	59
<b>7. Discusión</b>	<b>61</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>66</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>68</b>

# 1

## Resumen

En la actualidad se ha incrementado el interés por compuestos que se encuentran en los alimentos y tienen un efecto benéfico para la salud. Uno de los compuestos ampliamente estudiados por sus efectos benéficos para la salud es la genisteína, la cual es un compuesto bioactivo presente en la soya. Estudios previos en el laboratorio han demostrado que tanto en modelos in vivo como en ensayos in vitro la administración de genisteína estimula la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos en el músculo a través de la activación de la enzima adenosina monofosfato cinasa (AMPK); sin embargo, no se conoce el mecanismo específico a través del cual esta isoflavona estimula la activación de la AMPK. Por lo que el objetivo del presente trabajo se enfocó en conocer parte del mecanismo por medio del cual la genisteína promueve la fosforilación de la AMPK y la consecuente oxidación de ácidos grasos del músculo esquelético. Por otro lado existe evidencia que otro polifenol como es el resveratrol puede activar a la enzima AMPK a través de un incremento de AMPc (adenosina 3',5' monofosfato cíclico). Por lo que se estudió la posible relación que existe entre la activación de AMPK, la concentración de AMPc y las vías por las cuales se eleva este segundo mensajero en miotúbulos C2C12 tratadas con genisteína. Se observó que la genisteína fue capaz de estimular la fosforilación de la AMPK en concentraciones menores a 30  $\mu\text{M}$ . El inhibidor de fosfodiesterasas, 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX), el cual incrementa la concentración de AMPc, promovió la fosforilación de AMPK cuando se agregó en un rango de 0.1 a 300  $\mu\text{M}$ . Los estudios realizados en este trabajo sugieren que la combinación de genisteína e IBMX promueve la fosforilación de AMPK. Este incremento puede estar mediado a través de la inhibición de las fosfodiesterasas por

parte de la genisteína. Para determinarlo se estudió cuáles miembros de la familia de las fosfodiesterasas están presentes en los miotúbulos C2C12. Aunque existe evidencia preliminar de que las fosfodiesterasas que se expresan en la línea celular de miotúbulos C2C12 son la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) y la fosfodiesterasa 7A en sus dos isoformas 1 y 2 (PDE7A1, PDE7A2), solamente la proteína de PDE3A fue la única que se detectó en los ensayos realizados en el presente estudio; esto indica que PDE3A pudiera ser la isoforma de fosfodiesterasa inhibida por la genisteína. Sin embargo, otro mecanismo que podría incrementar la concentración de AMPc pudiera estar mediado por el receptor acoplado a proteína G denominado GPR30. De manera interesante, el tratamiento de la genisteína fue capaz de incrementar el contenido protéico del receptor (GPR30) en concentraciones de 0.1 y 0.3  $\mu\text{M}$ . Estudios futuros permitirán conocer en detalle cuál de estas proteínas está involucrada en incrementar el AMPc y en la subsecuente activación de AMPK.

## 2

# Introducción

A pesar de los esfuerzos globales para disminuir una de las problemáticas actuales en el mundo occidental, la incidencia de obesidad y sobrepeso, ha incrementado en la mayoría de los países. En el 2014 se estimó a nivel global que aproximadamente 39% de los adultos mayores a 18 años presentan sobrepeso y 13% presentan obesidad, siendo predominante en las mujeres [1]. Durante muchos años se han tratado de generar diversas estrategias que contribuyan a aminorar el número de personas que presentan sobrepeso y obesidad; así como de proporcionar un tratamiento oportuno y adecuado para los individuos que ya las padecen. En los últimos años los patrones de estilo de vida han cambiado drásticamente. Se sabe que la actividad física de los individuos ha disminuido lo que ha contribuido junto con los cambios en el tipo y cantidad de los alimentos al desarrollo del sobrepeso, obesidad y sus comorbilidades [2].

Uno de los objetivos de la investigación actual dirigida al control de enfermedades crónicas como las ya mencionadas antes, es el encontrar y explicar la relación que existe entre las sustancias bioactivas en los alimentos y el beneficio agregado que brindan a la salud [3]. En la actualidad se han estudiado muchos alimentos y sus compuestos, así como a las poblaciones que consumen estos alimentos de forma habitual [4]. De igual manera, se ha estudiado cuales son las respuestas metabólicas benéficas que promueven estos alimentos, además de determinar cuál es la molécula responsable de estos beneficios [5].

La soya es un alimento que se consume de manera regular en países de oriente. Este alimento, se consume en gran medida por sus conocidos beneficios a la salud. Se ha encontrado que los componentes de la soya que proporcionan beneficios a la

salud son las isoflavonas [6] . Las isoflavonas más estudiadas son la genisteína y la daidzeína; entre estas dos, la genisteína es la que posee más propiedades y estas propiedades se han encontrado en el camino por la búsqueda de nuevas alternativas en el tratamiento de distintas enfermedades [6, 7, 8].

Uno de los efectos más interesantes de la genisteína es que en modelos in vivo es capaz de disminuir el reservorio de grasa en músculo esquelético y en hígado [9, 10, 11]. En músculo se ha comprobado que la genisteína es capaz de incrementar la oxidación de ácidos grasos mediante la activación de la AMPK. La activación de la AMPK promueve la oxidación de ácidos grasos, la glucólisis y el incremento del consumo de oxígeno, mientras que inhibe a las vías anabólicas [9].

Ya que actualmente no se conoce con certeza cómo es que se inicia esta cascada que lleva a la activación de esta cinasa por medio de la genisteína, y tampoco se sabe qué receptor media esta ruta de señalización, el objetivo de este trabajo fue encontrar los posibles elementos por medio de los cuales se inicia este efecto que lleva a la activación de la AMPK en el músculo esquelético.

# 3

## Marco teórico

### 3.1. La enzima AMPK. Regulador de metabolismo

La AMPK es un monitor energético de la célula que se encarga de sensar la cantidad de trifosfato de adenosina (ATP) a través de las concentraciones de AMP (monofosfato de adenosina); la AMPK se encarga de activar las vías catabólicas que producen ATP e inhibir las sintéticas con el fin de mantener una concentración fisiológica de ATP [12].

Los genes que codifican para las subunidades de la proteína AMPK se encuentran en todos los eucariontes. La AMPK y sus ortólogos se encuentran como proteínas heterotriméricas con una subunidad  $\alpha$  con actividad catalítica, una subunidad  $\beta$  reguladora y una  $\gamma$ . Las subunidades catalíticas de AMPK contienen un dominio de cinasa de residuos de Serina y Treonina (Ser/Thr) en el extremo amino (N-terminal) (figura 3.1). Cuando el residuo de Treonina 172 (Thr 172) que se encuentra en el asa de activación es fosforilado por cinasas río arriba, ocasiona que la actividad del complejo se incrementa hasta más de 100 veces [13].

Durante situaciones de estrés energético el AMP se une directamente a las repeticiones en tandem del dominio de cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) en la subunidad  $\gamma$  de AMPK, lo que provoca un cambio conformacional que expone la Thr 172. La fosforilación en la Thr 172 es necesaria para la activación de AMPK [15, 12]. Se considera que la unión de AMP a la subunidad  $\gamma$  evita la defosforilación en la subunidad  $\alpha$  [16]. Existen 2 isoformas de la subunidad  $\alpha$ , 2 de la subunidad

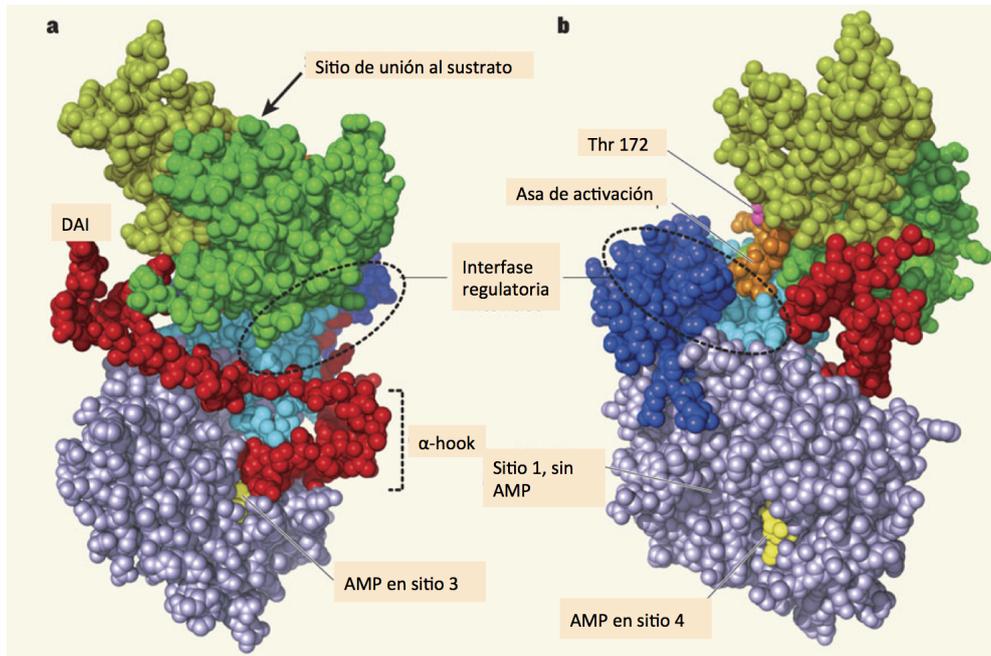


Figura 3.1: Estructura de la AMPK en dos lados. (a): en verde claro y oscuro se muestra la subunidad catalítica, el extremo carboxilo terminal de esta subunidad se muestra en color azul marino y el azul claro corresponde a la subunidad  $\beta$ . En rojo se marca un péptido de unión que interactúa con el sitio 3 de unión a AMP de la subunidad  $\gamma$ . (b): vista del lado izquierdo de a. La asa de activación se marca en color naranja dentro de la subunidad  $\alpha$ . La treonina 172 se marca en color rosa. Tomado y modificado de [14].

$\beta$ , y 3 de la subunidad  $\gamma$ , con una posibilidad de 12 combinaciones de proteínas heterotriméricas diferentes con variantes de empalme. La cinasa que principalmente fosforila a AMPK es la cinasa 11 de Serinas-Treoninas (LKB1) [17, 12, 18].

Se conoce que la AMPK promueve la captura de glucosa en las células musculares cuando el destino de la glucosa es el de generar ATP como en el caso del proceso de contracción. Esta captación de glucosa está mediada por la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4). La AMPK también promueve la captación de glucosa en células que solo expresan el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el cual se encuentra expresado de manera ubicua [19]. La activación de AMPK también promueve la traslocación de vesículas que contienen transportadores de ácidos grasos en órganos como el corazón. Una vez dentro de la célula, tanto la glucosa como los ácidos grasos, pueden ser catabolizados; la glucosa ingresa a la glucólisis mientras que en los ácidos grasos, la AMPK promueve su transporte dentro de la mitocondria en donde sucede la  $\beta$  oxidación [13].

En el caso de la oxidación de ácidos grasos, la activación de la AMPK promueve la fosforilación de la acetil CoA carboxilasa (ACC), la cual al estar fosforilada, se inactiva por lo que se disminuye el producto de su reacción, el malonil CoA. Esto favorece el transporte de ácidos grasos a la mitocondria a través de carnitina pailmitoil transferasa 1 (CPT1) [12].

La biogénesis mitocondrial es un proceso importante que también se activa por la AMPK fosforilada. Una proteína clave en este mecanismo es el coactivador del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa 1 (PGC1 $\alpha$ ). El factor PGC1 $\alpha$  es un coactivador importante de receptores nucleares y de otros factores de transcripción que no necesariamente están relacionados con los receptores nucleares. El factor PGC1 $\alpha$  se encarga de promover la biogénesis mitocondrial aumentando la expresión de enzimas del transporte de electrones y proteínas desacoplantes [20]. Se sabe actualmente que AMPK incrementa la expresión de PGC1 $\alpha$  cuando se encuentra activada.

La activación de AMPK apaga las vías anabólicas con el objetivo de conservar el ATP, la AMPK inhibe las vías de síntesis de lípidos, carbohidratos, proteínas y RNA ribosomal. Este mecanismo de inhibición se da mediante la fosforilación y regulación de enzimas y proteínas regulatorias involucradas en cada una de las vías, como es el caso ya mencionado anteriormente de la ACC1, la cuál es fundamental en la síntesis de lípidos [13]. A continuación se enlistan las enzimas que son objeto de regulación negativa directa o indirecta por AMPK y el proceso anabólico en el que intervienen:

- Acetil CoA carboxilasa interviene en la síntesis de ácidos grasos.
- Glicerol fosfato acil transferasa interviene en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos.
- 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa interviene en la síntesis de colesterol.
- Glucógeno sintasa interviene en la síntesis de glucógeno.
- Proteínas regulatorias asociadas a mTOR y reguladores del blanco de la cinasa rapamicina(TOR) intervienen en la síntesis de aminoácidos.
- Factor de inicio de la transcripción IA interviene en la síntesis de RNA ribosomal. [13]

En el esquema siguiente se resumen los efectos metabólicos más importantes de la activación de la AMPK.



Figura 3.2: Efectos metabólicos en respuesta a la fosforilación de la AMPK, la cual se puede dar en situaciones de ayuno cuando las concentraciones de ATP disminuyen y se elevan las de AMP. La fosforilación de la AMPK activa vías catabólicas como glucólisis y  $\beta$  oxidación e inhibe las vías anabólicas como síntesis de proteína, colesterol, ácidos grasos y glucógeno. Tomado y modificado de [13].

## 3.2. Metabolismo de las isoflavonas

El frijol de la soya está compuesto por macronutrientes como lípidos, carbohidratos y proteínas. Los lípidos de la soya que no contienen colesterol, contienen alrededor de 15 % de grasa saturada, 61 % de grasa poliinsaturada y 24 % de grasa monosaturada.

Los carbohidratos de la soya representan el 30 % de la semilla, con 15 % de carbohidratos solubles (sacarosa, rafinosa, estaquirosa) y 15 % de carbohidratos insolubles (fibra dietaria). El contenido de proteína del frijol de la soya varía desde el 36 % al 46 % dependiendo de la variedad. Las proteínas de almacén como 7S globulina,  $\beta$ -conglucitina, y 11S globulina (glicitina), están presentes en el 80 % del contenido total de proteína. Las proteínas 2S, 9S y 15S globulina son menos abundantes [6].

La soya contiene micronutrientes que incluyen a isoflavonas, fitatos, saponinas, fitoesteroles, vitaminas y minerales. Se ha demostrado que hay una gran variedad en el contenido y composición de isoflavonas en el frijol de la soya. Esta variedad está en función de las condiciones de crecimiento de la soya así como de las condiciones ambientales.

Existen 2 isoflavonas principales en la soya, genisteína y daidzeína [6]. Las proteínas de soya disponibles en los alimentos contienen isoflavonas en diferentes tipos de glucósidos, como 6-O-malonil glucósido, 6-O-acetil glucósido y  $\beta$  glucósidos [3]. Estos conjugados son biológicamente inactivos; una vez ingeridos, los glucósidos son hidrolizados por glucosidasas a agliconas como genisteína (GTN) y daidzeína (DZ), las cuales son absorbidas vía intestinal (figura 3.3).

A través de la microflora intestinal la genisteína es metabolizada en un producto llamado para-etilfenol, mientras que la daidzeína es convertida ya sea en equol o en O-desmethylangolensina (ODMA) por dos vías diferentes [21].

En la soya, las isoflavonas están fuertemente asociados con las proteínas. La abundancia en las isoflavonas varía dependiendo de la forma en que fue procesada la soya. Las isoflavonas pueden desasociarse de las proteínas usando métodos de extracción con alcohol, lo cual disminuye significativamente la cantidad obtenida. Esto explica la variedad que existe en el contenido de fitoestrógenos en los productos de soya. Esta variedad puede ser de 0.1-5 mg de isoflavona/g de proteína en frijoles maduros y tostados, 0.3 mg/g de proteína de soya en frijoles verdes y

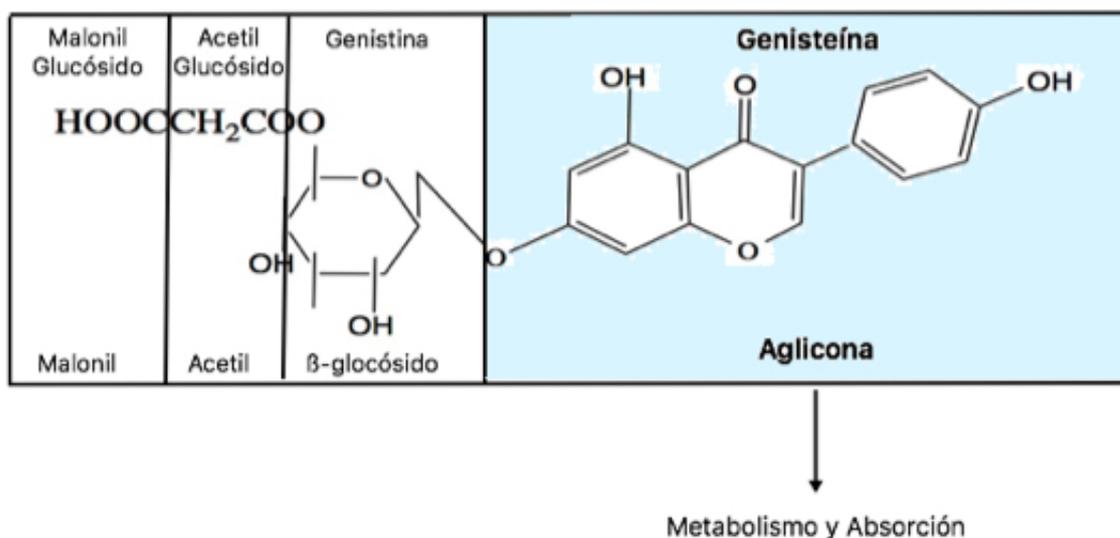


Figura 3.3: Estructura de diferentes glucósidos de genisteína y de su forma bioactiva (aglicona). Tomado y modificado de [3].

0.1-2 mg/g de proteína en tofu y leche de soya [5].

Existen numerosos estudios que incluyen investigaciones sobre las concentraciones en plasma de fitoestrógenos. En humanos, la constante ingestión de soya en la dieta lleva a un incremento rápido en la concentración plasmática de isoflavonas que llega hasta el rango de concentraciones micromolares, no así en sujetos que no consumen soya cuya concentración plasmática es comúnmente  $\leq 40nM$  [4, 8]. Estudios refieren que las concentraciones plasmáticas de genisteína no son mayores a  $10 \mu M$  en una persona que consume gran cantidad de soya [7].

Estudios farmacocinéticos confirman que los adultos pueden absorber rápido y eficientemente a las isoflavonas, el tiempo promedio que toma llegar a un pico de concentración de isoflavonas en sangre después de ingerir la aglicona es de 4 a 7 horas, mientras que este tiempo se retrasa de 8 a 11 horas cuando se consumen los  $\beta$ -glucósidos [22]. El paso que limita la velocidad de absorción es la hidrólisis inicial de los  $\beta$ -glucósidos. La vida media reportada para daizeína y genisteína es de 9.3 y 7.1 horas respectivamente, lo que sugiere que las isoflavonas o sus metabolitos se excretan rápidamente [6].

### 3.3. Genisteína y su relación con los Receptores de Estrógenos (ER)

Las hormonas esteroideas regulan el crecimiento y la diferenciación, así mismo, participan en las funciones fisiológicas normales, en las de reproducción y en las de comportamiento. Los estrógenos median sus efectos a través de 2 receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ). Estos receptores están codificados por los genes ESR1 para el caso del  $ER\alpha$  y ESR2 que codifica para el  $ER\beta$  [23]; ambos receptores tienen diferente distribución en los tejidos y diferente especificidad por su ligando endógeno [24]. Debido a la homología entre estos receptores, ambos, se unen en forma de homodímero o heterodímero a la misma región de DNA correspondiente al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) [24].

Los receptores de estrógenos (ERs) por pertenecer a la familia de receptores nucleares poseen una estructura de 6 regiones con dominios que tienen una homología importante. El mecanismo de acción de los ERs requiere que el ligando se una al dominio de unión del receptor, lo cual promueve cambios en la conformación del mismo, el cual se une a otro complejo receptor-ligando. Este complejo posteriormente se une al DNA. Esta acción, recluta a otras proteínas ya sea coactivadoras o corepresoras que influyen en la actividad de los receptores y que por lo tanto, activan o reprimen la transcripción de ciertos genes [8].

El homodímero de  $ER\alpha$  es más eficiente que el de  $ER\beta$  o que el heterodímero de  $ER\alpha/\beta$  en promover la transcripción de genes que controlan el crecimiento y la diferenciación en útero y mama [25].

En un contexto de cáncer el  $ER\alpha$  está asociado a proliferación aberrante, inflamación y malignidad, mientras que los receptores  $\beta$  promueven la expresión de genes anti-migratorios y anti-invasivos [23].

Los blancos moleculares comunes en mamíferos de la genisteína son los receptores de estrógenos, las proteínas tirosina cinasas (PTK) y las topoisomerasas tipo II. Cuando se emplean tratamientos con genisteína concentraciones mayores de 100  $\mu\text{M}$ , la genisteína es un inhibidor de PTK y topoisomerasas tipo II [26]. Una de las propiedades más importantes de la genisteína, es su actividad estrogénica; esta actividad se debe a que esta isoflavona tiene la capacidad de unirse a ambos receptores de estrógenos (ERs), teniendo una preferencia por el  $ER\beta$ ; sin embargo

su actividad es 1000 veces más débil que la del  $\beta$ -estradiol. Existen varios estudios que describen esta interacción. En uno de estos estudios [8] realizado con células MCF-7 (células de cáncer de mama), se llevó a cabo un ensayo en el cual se comprobó la unión de la genisteína al receptor de estrógeno  $\beta$ ; usando un experimento de competencia con  $I_{125}$  estradiol se determinó que la genisteína y otros compuestos como el equol se unen a este receptor (figura 3.4). En este mismo estudio se determinó que debido a que todos los compuestos evaluados son equipotentes como agonistas de ER y a que las moléculas son similares, se concluyó que el grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo B y el hidroxilo en la posición 7 del el anillo A son fundamentales en la actividad estrogénica de los mismos. Estas características químicas son comunes en estas moléculas evaluadas.

En otro estudio [27] se comparó la afinidad de algunas isoflavonas por el ER $\alpha$  y/o por ER $\beta$  y sus coreguladores, tomando de referencia el ligando fisiológico E2. Los autores concluyeron que en comparación con otros fitoestrógenos, la genisteína tiene una afinidad hacia ER $\beta$  con una Kd de 7.4 nM, siendo mucho mayor la afinidad de la genisteína que de la daidzeína, otra isoflavona de soya como arriba se indicó.

Esta capacidad de unión probablemente se debe a la presencia de un grupo hidroxilo en uno de los anillos fenólicos, el cual es esencial para la formación de un puente de hidrógeno intramolecular que estabiliza la unión dentro del bolsillo del ER.

La afinidad que tienen las isoflavonas por los ERs les permite tener ambos efectos, ya sea anti-estrogénicos o estrogénicos, dependiendo del tejido, así como de la isoflavona y de los niveles de estradiol endógenos. Se han realizado estudios in vitro que demuestran que la genisteína puede mediar ambos efectos en presencia de diferentes concentraciones de estradiol [6].

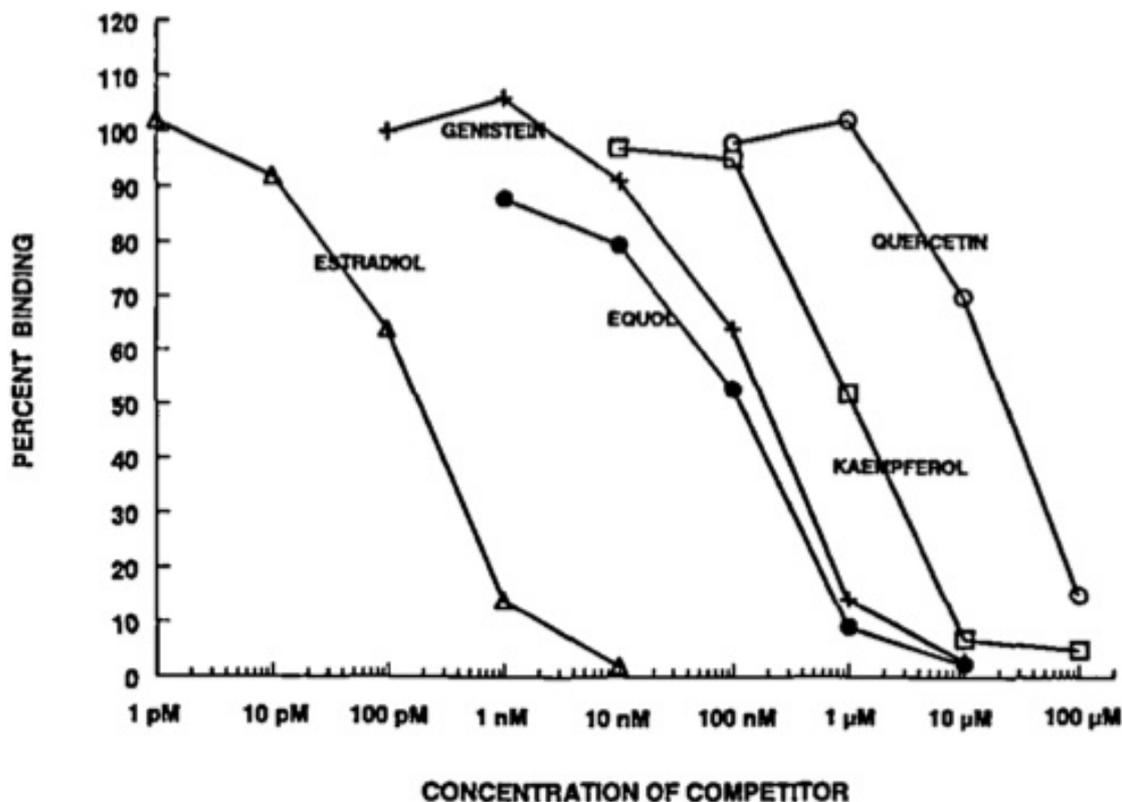


Figura 3.4: Ensayo de competencia realizado con  $I_{125}$  estradiol en células MCF-7. La gráfica representa la afinidad de diferentes compuestos por el  $ER\beta$  con referencia a su ligando endógeno. Tomado de [8].

### 3.4. Efecto antilipotóxico de la proteína de soya e isoflavonas en hígado

Además de los efectos estrogénicos débiles de la proteína de soya debido a sus isoflavonas, se ha demostrado que tiene otras actividades biológicas importantes. Esto se demostró a través de un estudio realizado en el departamento [10] en donde se alimentó a 2 grupos de ratas con una dieta control o con una dieta alta en grasa. Tanto en el caso de la dieta control como en el caso de la dieta alta en grasa se alimentó, por un período de 180 días, a un grupo con una dieta cuya fuente de proteína era la caseína y al otro con proteína de soya. Los resultados sugieren que las ratas de los grupos alimentadas con dietas altas con grasa tuvieron

un incremento de peso mayor cuando fueron alimentadas con proteína de caseína que las ratas alimentadas con proteína de soya. Al analizar el tejido hepático, se observó que a pesar de haber sido alimentadas con una dieta alta en grasa las ratas alimentadas con proteína de soya que contenía isoflavonas, presentaron una disminución significativa en el contenido de lípidos y colesterol en comparación con aquellas alimentadas con caseína. Este aspecto también se reflejó en los niveles de triglicéridos y colesterol a nivel plasmático los cuales disminuyeron en las ratas alimentadas con proteína de soya, sin importar si fueron alimentadas con dieta control o dieta alta en grasa. En este estudio se concluyó que la proteína de soya disminuye la lipotoxicidad a nivel hepático en ratas obesas.

De igual manera, previo a este estudio, se realizó un estudio [11] en donde se alimentaron ratas genéticamente obesas (Zucker fa/fa) con dos tipos de dietas; un grupo se alimentó con proteína de soya conteniendo isoflavonas y el otro con caseína por 160 días. Estas se sacrificaron a los 30, 60, 90 120 y 160 días. En el momento del sacrificio se determinó el contenido de colesterol y lípidos en hígado y se concluyó que las ratas alimentadas con proteína de soya e isoflavonas tuvieron menos depósitos de grasa que las ratas alimentadas con caseína. Este hallazgo se corroboró en los cortes histológicos en donde se realizó la técnica de rojo oleoso para determinación de lípidos en el hígado.

En relación a las variables bioquímicas, se demostró que las concentraciones séricas de colesterol al día 160 en las ratas Zucker fa/fa alimentadas con dieta y con proteína de soya presentaron 69 % menos concentración de colesterol circulante que las alimentadas con caseína. Las concentraciones de triglicéridos séricos en ratas alimentadas con proteína de soya también disminuyeron en un 43 % en relación a los niveles de las ratas alimentadas con caseína.

Se realizaron análisis de Northern blot para cuantificar las concentraciones de RNA mensajero de SREBP-1, que es el factor de transcripción central en la regulación de la expresión de genes de la síntesis de ácidos grasos, con el fin de correlacionar el efecto de la proteína de soya en el hígado sobre la abundancia de lípidos hepáticos. La abundancia en el mRNA de SREBP-1 en hígado fue significativamente menor en ratas alimentadas con soya en comparación con las ratas alimentadas con proteína de caseína, a pesar de la hiperinsulinemia descrita en ambos grupos. Esto explica parcialmente porqué disminuyeron las concentraciones de lípidos hepáticos.

A la par de la disminución en la expresión del mRNA de SREBP-1 en ratas que consumieron soya, también disminuyó la expresión de la graso acil sintasa (FAS), la esterol CoA desaturasa 1 (SCD-1) y de las desaturasas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  que son enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos controladas por SREBP-1. Esta disminución se observó desde el día 30. Al final de la intervención las ratas alimentadas con proteína de soya presentaron menor expresión de las enzimas mencionadas anteriormente que las ratas que consumieron caseína. Esto sugiere que la proteína de soya reduce la síntesis de ácidos grasos en hígado de ratas obesas genéticamente.

### 3.5. Efectos de la genisteína en el músculo

En estudios recientes se comprobó que la proteína de soya también disminuye la lipotoxicidad en el músculo de ratas Zucker fa/fa alimentadas con proteína de soya que incluyen isoflavonas. Se demostró que la disminución en la lipotoxicidad en el músculo esquelético está asociada al incremento en la fosforilación de la proteína AMPK, así como a un incremento en la fosforilación de una de sus proteínas blanco, la ACC (figura 3.5). Estos hallazgos los llevó a concluir que la proteína e isoflavonas de soya contribuyen al aumento de la oxidación de ácidos grasos y a la disminución de la síntesis de ácidos grasos, disminuyendo la acumulación de lípidos en el músculo esquelético, lo que podría mejorar la sensibilidad a la insulina [9].

Los cambios en el estado de fosforilación de AMPK y de sus proteínas blanco en el músculo esquelético se asociaron con un aumento en la abundancia de los mRNA de genes involucrados con la oxidación de lípidos; se observó que en las ratas que fueron alimentadas con proteína de soya conteniendo isoflavonas la expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos como la proteína desacoplante 3 (UCP3), la carnitina pantoil transferasa 1 (CPT1), el coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa 1 (*PGC1 $\alpha$* ), y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\delta$  (*PPAR $\delta$* ) se incrementó en comparación con las ratas que fueron alimentadas con caseína.

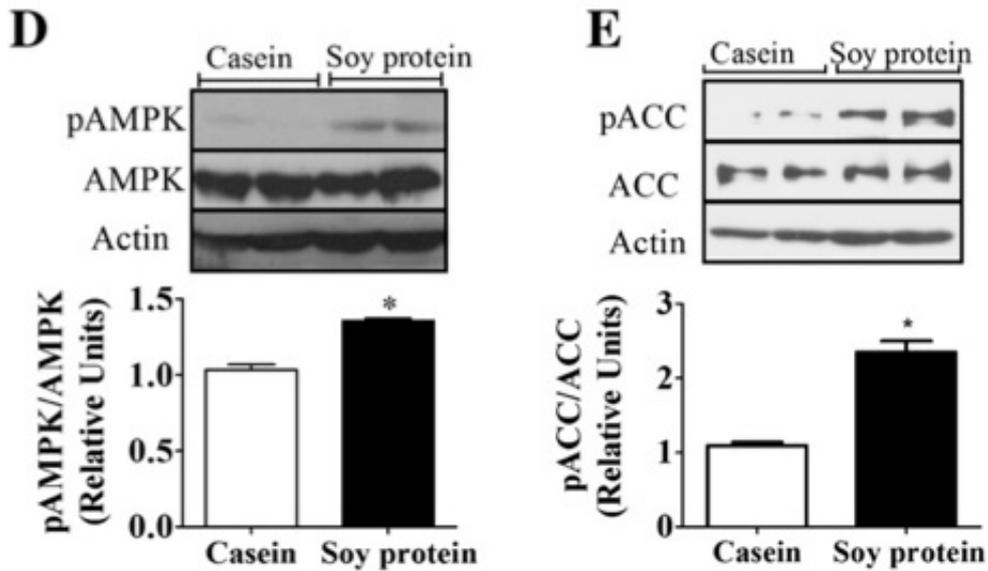


Figura 3.5: Western blot de la fosforilación de la AMPK y de la ACC en músculo esquelético de ratas Zucker fa/fa alimentadas con proteína de soya y caseína en un periodo de 160 días. Asteriscos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Tomado de [9].

En estudios posteriores se determinó cual de las isoflavonas de la soya tenía esta acción antilipotóxica. De manera notoria, al inyectar genisteína a ratas Zucker fa/fa en una dosis de 40 mg/kg por 5 días los resultados indicaron que la genisteína es capaz de aumentar por sí sola la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético de estas ratas [28].

Posteriormente se observó en la línea celular de miotúbulos C2C12 (modelo in vitro de músculo esquelético), que AMPK se fosforila cuando se estimulan estas células con genisteína en una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 60 minutos. De la misma manera la expresión de genes de oxidación de lípidos incrementó en respuesta a la genisteína como se observó en los ensayos in vivo.

Se ha encontrado que el consumo de isoflavonas aumenta la fosforilación de JAK 2 [9], lo que sugiere que la fosforilación de AMPK puede darse vía JAK2; en este mismo estudio se realizó un ensayo en el que se incubaron miotúbulos C2C12 con genisteína 10  $\mu$ M durante 60 min y se observó que la fosforilación de JAK 2 se incrementó. Cuando esta línea celular se incubó con el inhibidor de JAK 2 el AG490, la capacidad que tiene la genisteína de incrementar la fosforilación de JAK 2 disminuyó. Esto sugiere que la activación de AMPK está relacionada con la activación de esta proteína.

Debido a que la fosforilación de JAK2 puede darse directamente con la activación del receptor de leptina [29, 30] y a que AMPK es un enzima importante en mediar los efectos de la leptina[31], en este estudio, se investigó la posibilidad de que la genisteína incrementara la fosforilación de AMPK mediante el receptor de leptina (ObR). En este estudio se corroboró que el receptor de leptina no está relacionado con este efecto, ya que al silenciar los miotúbulos C2C12 mediante un shRNA se observó que la fosforilación de AMPK no disminuye a pesar de la abolición de este receptor [9].

Otro de los hallazgos en relación a la activación de AMPK en músculo esquelético [9] demostraron que la genisteína es capaz de incrementar los niveles de monofosfato cíclico de 3'5' adenosina (AMPc). Este hallazgo se observó cuando se realizaron ensayos in vitro con la línea celular C2C12 estimulando con genisteína en una concentración de 10  $\mu$ M en diferentes tiempos. Se observó que a los 45 min de haber colocado el estímulo, incrementan las concentraciones de AMPc. Este efecto de la genisteína también se ha observado en cervix [32]. Esto podría ser una de las vías por la cual la genisteína incrementa la fosforilación de la AMPK, sin embargo, aún faltan estudios para establecer este posible mecanismo.

### **3.6. La genisteína como inhibidor de fosfodiesterasas**

Las fosfodiesterasas (PDEs) son una familia de fosfohidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces 3' del fosfato cíclico de la adenosina y/o de la guanosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc, GMPc) [33]. Las fosfodiesterasas fueron descritas después del descubrimiento del AMPc. El descubrimiento de una enzima que fuera capaz de hidrolizar al AMPc sugirió que el AMPc es una molécula importante en

términos fisiológicos.

Estas enzimas están clasificadas como PDEs de nucleótido cíclicos de clase I, diferentes a las enzimas de clase II las cuales carecen de alta selectividad por su sustrato en comparación con las de clase I [34]. Una de las razones por las cuales las fosfodiesterasas se han convertido en objetivos farmacológicos se debe a que la regulación de la degradación de cualquier ligando o segundo mensajero (AMPc o GMPc en este caso) a menudo contribuye a un cambio más rápido y en mayor porcentaje en concentraciones de estos nucleótidos si se compara con la regulación en la síntesis de estos compuestos [33].

Actualmente, gracias a que se han obtenido las estructuras primarias de los aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de las fosfodiesterasas, éstas, se han clasificado de acuerdo a sus relaciones basadas en las homologías de las secuencias primarias. Se sabe que existen, al menos, 11 familias diferentes de PDEs compuestas por productos de 21 genes diferentes, sin embargo existen más de 21 mRNA y proteínas transcritas por estos genes, ya que usan sitios de inicio de la transcripción alternativos y formas de empalme alternativo de los precursores del mRNA [33]. En la naturaleza existen diferentes tipos de PDEs, las cuales se clasifican por el gen que las codifica y el tipo de sustrato en el cual tienen su acción; muchas de éstas son tejidos específicas y se expresan en gran cantidad en estos tejidos (tabla 1.5) [34]. Su nomenclatura está acompañada de las iniciales PDE junto a un número arábigo que corresponde a la familia genética a la que pertenece la fosfodiesterasa, además de una letra en mayúscula que significa que es el gen “ A ” . Por ejemplo, comúnmente el primer gen descrito se le asigna la letra A y a menudo se usa un segundo número que indica si es la primera o la segunda variante descrita [33].

Tabla: Clasificación de las fosfodiesterasas de acuerdo a cada familia. Abreviaturas: fosfodiesterasa (PDE), adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc), guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc). Tomado y modificado de [33, 34].

## Clasificación de Fosfodiesterasas

Familia	Sustrato	Tejido donde se expresa	Isoformas
PDE 1	AMPc	Hipocampo, Nervios periféricos.	PDE1A,PDE1C
PDE 2	AMPc/GMPc	Cortex adrenal, Cerebro, Neuronasolfatorias.	PDE2A
PDE 3	AMPc/GMP	Músculo liso, Plaquetas, Tejido cardiaco, Adiposo, Hígado, Páncreas	PDE3A, PDE3B
PDE 4	AMPc	Nervios olfatorios, Cerebro, Linfocitos	PDE4A,PDE4B,PDE4C, PDE4D
PDE 5	GMPc	Tejido vascular, Placenta, Páncreas, Hígado, Pulmón, Tejido gastrointestinal	PDE5A, PDE5B
PDE 6	GMPc	Neuronas de la retina	PDE6A,PDE6B, PDE6C
PDE 7	AMPc	Músculo Esquelético, Linfocitos, Bazo, Cerebro	PDE7A, PDE7B
PDE 8	AMPc	Testículos, Ovarios, Intestino delgado, Cólon, Riñón	PDE8A,PDE8B
PDE 9	GMPc	Riñon, Cerebro, Hígado, Tejido gastrointestinal, Próstata	PDE9A
PDE 10	AMPc/GMPc	Cerebelo, Tálamo,hipocampo, y Médula espinal	PDE10A
PDE 11	AMPc/GMPc	Próstata, Glándula pituitaria, Corazón e Hígado	PDE11A

En los últimos años se han realizado experimentos con resveratrol, un polifenol con una estructura química similar a la estructura de la genistéina. Estos experimentos han determinado que éste es un inhibidor de algunas PDEs como la 1, 3 y 4. Durante este experimento [35] se utilizó una PDE3 recombinante para determinar que tipo de inhibidor es el resveratrol con respecto a esta enzima. Esta determinación se realizó midiendo la actividad de la enzima recombinante en presencia del resveratrol, registrando como se comportaba la actividad de la enzima conforme se agrega sustrato en mayor concentración. Los resultados indican que a mayor concentración de AMPc, la inhibición disminuyó por parte del resveratrol, lo que nos

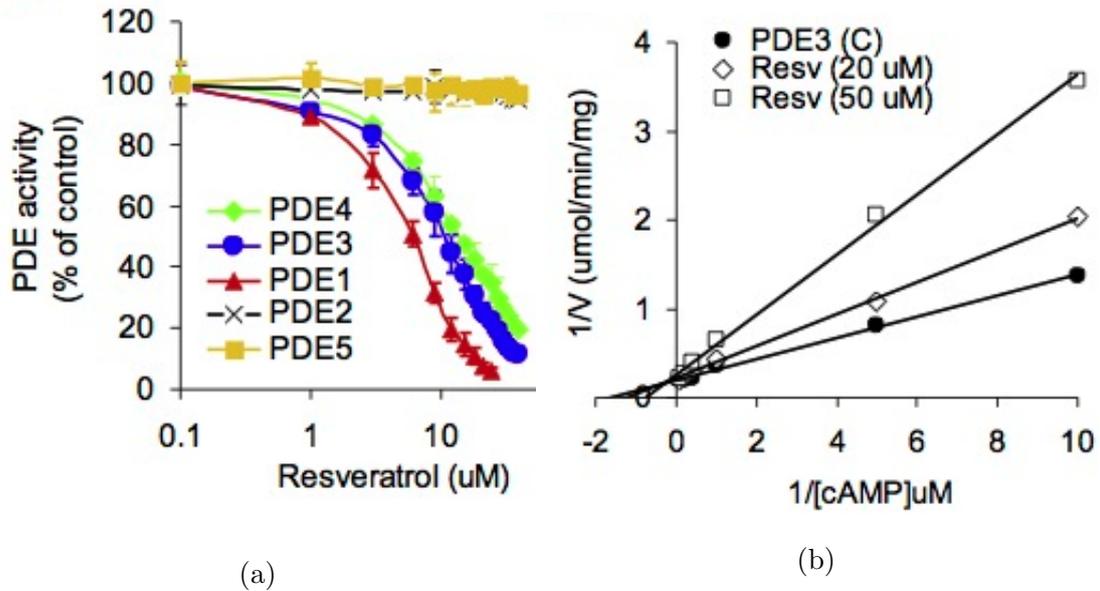


Figura 3.6: (a): Determinación del efecto inhibitorio del resveratrol sobre fosfodiesterasas mediante la medición de la actividad de las enzimas recombinantes en presencia de resveratrol, (b): Gráfico de Lineweaver-Burke del resveratrol para la fosfodiesterasa 3, gráfico obtenido mediante un ensayo de cinética de la fosfodiesterasa 3 en presencia de AMPc y resveratrol. Abreviaturas: Fosfodiesterasa (PDE), Resveratrol (Resv), Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc). Tomado de [35].

lleva a deducir que tanto el resveratrol como el AMPc compiten por el sitio activo de la enzima. Esto se confirmó con la elaboración del gráfico de Lineweaver-Burke, el cual coincide con el gráfico de un inhibidor competitivo (figura 3.6). Con estos resultados se podría suponer que la genisteína podría inhibir las fosfodiesterasas ya que poseen estructuras químicas similares.

En otra investigación realizada con tejido pulmonar de lechones pigmeos, se purificaron diferentes PDEs y se midió la cinética de estas enzimas en presencia de diferentes concentraciones de genisteína; este comportamiento se reportó mediante gráficos de Lineweaver-Burke, y se comparó con el gráfico de un inhibidor específico para cada tipo de PDE. Se concluyó que la genisteína se comporta como inhibidor competitivo para las fosfodiesterasas 1,2,3,4 y 5 en este tejido [36].

### 3.7. EL GPR30, posible mediador de las acciones de la Genisteína

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores de estrógenos pertenecen a la familia de receptores nucleares y se encargan de las acciones genómicas de estas hormonas. Existe otro receptor que no pertenece a esta familia: el receptor acoplado a proteína G 30 (GPR30) el cual se encarga de mediar señales no genómicas de manera rápida y cuya acción está determinada por el estímulo del estrógeno. Recientemente este receptor se ha nombrado también como Receptor de estrógenos acoplado a proteína G 1 [37].

El GPR30 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) con 7 dominios transmembranales que une al E2 con una gran afinidad, mediando las rutas de señalización estrogénica [38].

En un principio no se identificó ningún ligando para este receptor, y se clasificó como un GPCR huérfano. Fue hasta el 2000 que se identificó su función con experimentos que demostraron la activación de la enzima MAP cinasa (ERK1/2) en respuesta a un estímulo de estrógeno. Posteriormente se demostró que el estrógeno era el ligando natural de GPR30 usando antagonistas de E2 como el ICI 182,780 y el tamoxifen. Las respuestas al E2 sólo se observaron en líneas celulares de cáncer que expresan GPR30.

La localización celular del receptor principalmente se ha descrito a nivel subcelular. Hay reportes de que se encuentra en retículo endoplásmico, membrana nuclear, citoplasma, mitocondria y en algunos casos en membrana plasmática [39][37][40].

Debido a la capacidad que tiene la genisteína de unirse a receptores de estrógenos, se han realizado diferentes estudios para determinar si las acciones de la genisteína y otras isoflavonas están mediadas por este receptor.

Se ha demostrado en estudios con células de cáncer de mama y cáncer de tiroides que la elevación de la proteína c-fos, una proteína que está relacionada con procesos de proliferación y diferenciación en células cancerígenas, es dependiente de GPR30. Se realizaron experimentos in vitro con células SKBRE (células de cáncer de mama) transfectadas con un oligonucleótido anti-sentido para GPR30, las cuales fueron estimuladas con 1  $\mu$ M de E2 (estradiol), genisteína y quercetina. Los resultados revelaron que la expresión de c-fos disminuyó en las células con el

nucleótido anti-sentido para el GPR30 a diferencia de las células control en las cuales la expresión de c-fos aumentó en respuesta a los estímulos de E2, genisteína y quercetina (figura 3.7). Esto sugiere que los efectos de compuestos como la genisteína pueden estar mediados por GPR30 [41, 42] . Sin embargo, no se conoce si la estimulación de GPR30 se asocia con un incremento en la fosforilación de AMPK.

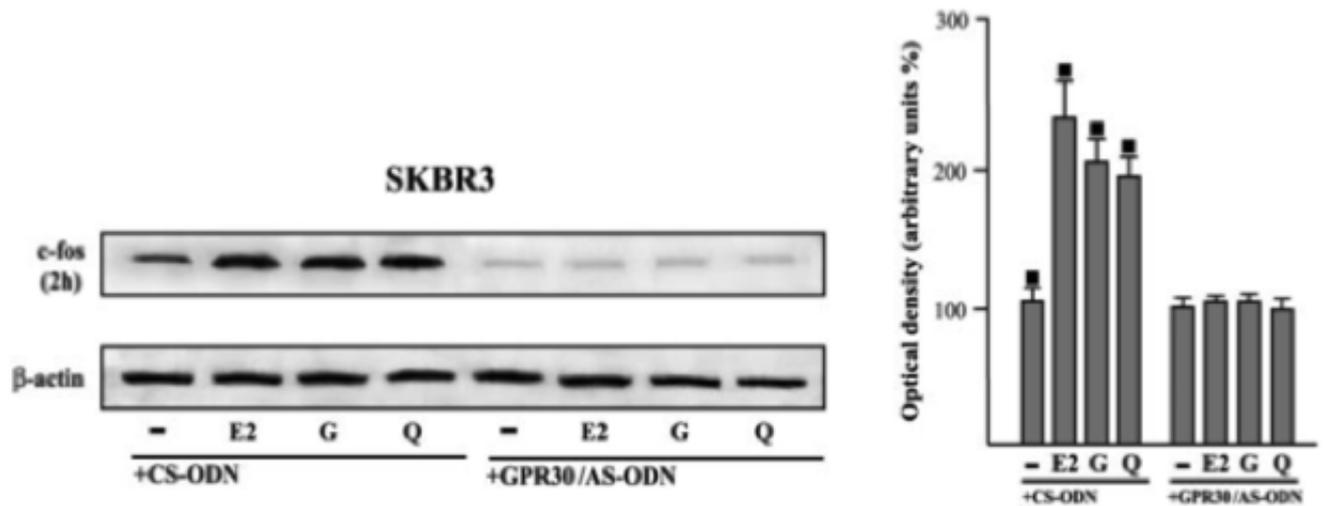


Figura 3.7: Western blot de la proteína c-fos en células SKBR3 transfectadas tanto con un oligonucleótido control como con uno antisentido para GPR30 (200 nM). Estas células posterior a la transfección fueron estimuladas con 1  $\mu$ M de estradiol (E2), genisteína (G) y quercetina (Q). El panel derecho es un cuantificación de tres experimentos independientes. Los cuadros en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Tomado de [42].

# 4

## Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

La genisteína promueve la fosforilación de la AMPK incrementando la concentración de AMPc a través de GPR30 y/o a través de la inhibición de la actividad de fosfodiesterasas en el músculo esquelético.

### 4.1. Objetivo general

Determinar si la activación de AMPK por genisteína está relacionada positivamente con la producción de AMPc así como establecer el medio por el cual se estimula su producción.

### 4.2. Objetivos específicos

- Establecer el cultivo celular de miotúbulos C2C12.
- Demostrar si la fosforilación de AMPK es dependiente de la dosis y si está relacionada con el AMPc.
- Determinar las fosfodiesterasas presentes en el cultivo celular de miotúbulos C2C12.
- Determinar si los miotúbulos C2C12 contienen el receptor GPR30 y si el efecto de la genisteína está mediado por GP30.

# 5

## Metodología

### 5.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular mioblastos C2C12 (ATCC). Para su crecimiento y su mantenimiento se emplearon frascos de 75cm<sup>2</sup> de poliestireno (Corning® Incorporated-Life Sciences) con 15 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa (hg) (Gibco® de Life Technologies) previamente filtrado por una membrana de poliétersulfona de 0.22  $\mu$ M (Merk Millipore®) y suplementado con suero bovino fetal (Gibco® by Life Technologies) al 10 % y 1 % antibiótico/antimicótico 100x (Gibco® by Life Technologies) con una combinación de Anfotericina B, Penicilina y Estreptomicina. Se permitió el crecimiento de las células hasta que alcanzaron una confluencia del 60 al 70 %. Posteriormente las células se pasaron a otro frasco para su amplificación.

Para obtener los miotúbulos C2C12 se utilizaron placas de 6 pozos (Corning® Incorporated-Life Sciences) en los cuales se sembró una cantidad de 170,000 células por pozo. Una vez obtenida una confluencia del 85 % al 90 % se inició la inducción de la diferenciación usando DMEM alto en glucosa, filtrado y suplementado con 2 % de suero de caballo (ATCC) o suero bovino fetal y antibiótico/antimicótico al 1 % . Se usaron 2 cantidades de medio, unos pozos con dos ml y otros con cuatro ml durante un lapso de 6 días. Se cambió el medio cada 48 h para evitar que las células se estresaran.

Se tomaron fotografías desde el día 0 de la diferenciación en dos aumentos diferentes, tanto 4x como 10x realizando un seguimiento cada 2 días hasta llegar al día 6 de diferenciación. Se utilizó un microscopio invertido Eclipse Ti-E (Nikon

Instruments Inc.) para la documentación a través de fotografías.

## 5.2. Estímulos en cultivo celular

Para la realización de los ensayos con genisteína e IBMX se emplearon miotúbulos C2C12. Se utilizó genisteína (Sigma-Aldrich®) sintética 98 % HPLC, disuelta en etanol absoluto. El inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas, el 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich®) 99 % HPLC, se disolvió en etanol absoluto y posteriormente se agregó DMEM hg para realizar las alícuotas de almacenaje. El activador de la adenilato ciclasa, forskolina 97 % HPLC (Enzo® Life Sciences), se disolvió en DMSO. Se utilizaron diferentes concentraciones como estímulo de ambos compuestos como se muestra a en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Estímulos en cultivo celular

Ensayo	Ensayo A	Ensayo B	Ensayo C	Ensayo D
<b>Fase 1</b>	Genisteína	IBMX	IBMX	Forskolina
<b>Concentración (µM)</b>	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300	300	10 y 30
<b>Tiempo de estímulo</b>	60 min	60 min	60 min	30, 45 y 60 min
			<b>Se agrega</b>	
<b>Fase 2</b>	-----	-----	Genisteína	-----
<b>Concentración (µM)</b>	-----	-----	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300	-----
<b>Tiempo de estímulo</b>	-----	-----	60 min	-----

## 5.3. Extracción de RNA

Se evaluó la expresión de las posibles fosfodiesterasas que se expresan en la línea celular de miotúbulos C2C12 para determinar las posibles enzimas que pudieran estar involucradas en la vía de interés. Se recolectaron muestras de los pozos de las placas de cultivo de la línea celular sin tratamiento para determinar la expresión basal de estas fosfodiesterasas.

Se obtuvo RNA total de los miotúbulos C2C12 mediante el reactivo de TRIzol (Roche Life Science®). Se colocó 1 ml de Trizol en cada uno de los 6 pozos de la placa de cultivo con las células diferenciadas, se resuspendieron hasta obtener un homogenado celular y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo en cada uno de los tubos, se sometió a vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente 5 min hasta que se comienza a percibir la separación de fases. Se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C y se transfirieron 500  $\mu$ l del sobrenadante a otro tubo nuevo. Se le agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol absoluto, se homogenizó y se dejó incubar a temperatura ambiente 10 min. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C.

Después de centrifugar se corroboró la presencia de la pastilla de RNA en el fondo del tubo y se retiró el isopropanol con una pipeta. Para lavar la pastilla se agregó etanol al 80 %, se homogenizó la pastilla y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante con una pipeta y se dejó el tubo abierto durante 15 min aproximadamente para evaporar el etanol. Se agregaron 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se calentó a 60°C para que la pastilla de RNA para homogenizar en el agua.

Se cuantificó el RNA total mediante espectofotometría con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), usando 2  $\mu$ l de cada una de las muestras. Se realizó una prueba de integridad mediante electroforesis capilar con el equipo QIacxel (Quia-gen) utilizando 5  $\mu$ l de RNA de cada una de las muestras. Se descartaron las muestras no íntegras.

## 5.4. Cuantificación relativa mediante qPCR

Se cuantificó la expresión relativa de los genes de fosfodiesterasa 3A1 (PDE3A1) y de la fosfodiesterasa 7A en sus dos isoformas la 1 y 2 (PDE7A1 y PDE7A2), los cuales se han descrito que se expresan en músculo esquelético y músculo liso y por lo tanto podrían expresarse en los miotúbulos C2C12. A partir del RNA íntegro se obtuvo cDNA mediante el uso de retrotranscripción; se utilizaron 3000 ng (3  $\mu$ gr) de RNA. Se usó la enzima transcriptasa inversa M-MLV y el oligo (dt) 12-18 como primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU). Para realizar la cuantificación de la abundancia relativa de los mRNA se utilizó LightCycler 480 Syber Green I Master (Roche Applied Science Mannheim, Germany). El equipo que se utilizó para

la detección de la fluorescencia fue el Light Cycler 480 Instrument (Roche Applied Science, Manheim Germany).

Para la realización de los rangos dinámicos se utilizaron las concentraciones de 600 ng, 150 ng, 37.5 ng, 9.37 ng, 2.34 ng, y 0.58 ng de cDNA así como muestras sin cDNA como controles negativos. La expresión se determinó por triplicado y se utilizaron 150 ng/ $\mu$ l del cDNA de cada una de las muestras y un un par de oligonucleótidos previamente diseñados para cada gen (Sigma-Aldrich Co. LLC Life Science) (Tabla 3.2).

Las muestras se pipetearon en un placa de 96 pozos ópticos Light Cycler 480 Multiwell Plates 96/384 clear (Roche Applied Science, Manheim Germany). La especificaciones para realizar la amplificación de PCR fue de: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 45 ciclos a 94°C por 15s, temperatura de amplificación fue de 62°C para el primer de PDE3A, 64°C para PDE7A1, 57°C para PDE7A2 en un lapso de 1 min. Se utilizó el gen Rer1 para la normalización.

Tabla 3.2: Secuencias de Primers

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
Fosfodiesterasa 3A1 (PDE 3A1)	5'-GGAGACCTTACCTGGCATACTTG	5'-CCTCTCTTGTGGTCCCATTCTG
Fosfodiesterasa 7A1 (PDE 7A1)	5'-GCCAGGAACATCAGAAGGTT	5'-GCAAGATATCCAAGGAGTGA
Fosfodiesterasa 7A2 (PDE 7A2)	5'-CAGGAACATCAGAAGTTACT	5'-GTGGTAAGGATTTGACTGTG
Rer1	5'-ACCGGAGCTGCGAGTTACA	5'-GGCTGTGTAGGGGTAGACT

## 5.5. Western blot

Se realizó el análisis por Western blot para la determinación del contenido de proteína de AMPK total, AMPK fosforilada, GPR30, PDE7A, y PDE3A. Para la obtención de la proteína después de realizar el ensayo, las células se lavaron con PBS después de retirar el estímulo para posteriormente agregar 120  $\mu$ l de amortiguador de lisis a cada uno de los pozos. Se raspó el fondo de los pozos para

retirar todo el contenido celular, se recolectó con un pipeta y se depositó en tubos eppendorf nuevos. Cada lisado se pasó por una jeringa de insulina para asegurar la ausencia de conglomerados celulares y para homogenizar el lisado, se centrifugó el homogenado a 10000 g durante 20 min. Se recolectó el sobrenadante que contenía la proteína total para realizar diluciones de 1 a 5 de cada una de las muestras.

Se determinó el contenido de proteína usando los reactivos del Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories) que utiliza el método de Bradford. Se utilizaron 5  $\mu$ l de cada muestra, la curva de referencia de proteína que se utilizó para la determinación fue: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/ml de albúmina. Para realizar el Western Blot se utilizaron 20  $\mu$ g de proteína para la mayoría de los ensayos, y en algunos se utilizó desde 30  $\mu$ g hasta 50  $\mu$ g de proteína.

Se prepararon las muestras con amortiguador de carga el cual se elabora con beta-mercaptoetanol y amortiguador para muestras 2x de Laemmli Sample Buffer (BioRad Laboratories) en una proporción 1 a 20. Las muestras se calentaron a 80°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. Las muestras se cargaron junto con el marcador de peso molecular PageRuler™ Plus, el cual es una escalera de proteínas preteñidas de peso molecular conocido (Thermo Scientific), con pesos moleculares desde 10 kD hasta 250 kD.

Las muestras se corrieron mediante electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS al 10 %. Se utilizó un amortiguador de corrida con base de glicina, SDS, y Tris Base, y se corrió en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories); la electroforesis se dejó correr 2 horas aproximadamente hasta obtener la separación adecuada de las proteínas de interés.

El gel se transfirió a la membrana Immun-Blot® de PVDF (BioRad Laboratories) previamente activada con metanol. La transferencia que se usó fue transferencia húmeda utilizando un amortiguador de transferencia conteniendo metanol, glicina, SDS y Tris base. Se utilizó la cámara de transferencia húmeda Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories). La transferencia se realizó en un período de una hora.

Posteriormente se comprobó la transferencia de la proteína tiñendo la membrana con rojo Ponceau. Se dieron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween y posteriormente se bloqueó durante 1 h con Blotting-Grade Blocker (Biorad Laboratories) disuelto en TBS Tween al 5 % para AMPK fosforilado, PDE3A, PDE7A y GPR30. Se usó una solución de albúmina disuelta en TBS Tween al 5 % para bloquear las

membranas para AMPK.

Después del tiempo de bloqueo se les dio 3 lavados de 10 min y posteriormente se les agregó el anticuerpo primario disuelto en la solución de bloqueo al 1 % en las concentraciones indicadas en la tabla 3.3. Se puso a incubar toda la noche a 4°C en un agitador.

Después de haber cumplido con el tiempo de incubación con el anticuerpo primario se colocaron las membranas a temperatura ambiente en agitación durante una hora, se retiró el anticuerpo primario, se lavaron las membranas 3 veces con TBS Tween y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora con la solución del anticuerpo secundario (tabla 3.3). Posteriormente a la incubación con el anticuerpo secundario se lavó la membrana con agitación 3 veces por un periodo de 10 min cada una. Se lavó una vez con agua desionizada durante 5 min. La membrana se colocó en una superficie de acetato y se aplicó la solución Sustrato Immobilon™ quimioluminiscente de HRP para transferencias (Merk Millipore) como lo indica la guía del uso para el Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate. Para la documentación de las imágenes se utilizó el fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (Biorad Laboratories). La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

Tabla 3.3 : Diluciones de anticuerpos primarios y secundarios

Proteína	Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
AMPK	AntiAMPK $\alpha$ 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:500	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:5000
pAMPK	AntipAMPK $\alpha$ 1/2 Thr 172 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:500	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:5000
PDE7A	AntiPDE7A (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:250	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:1000
PDE3A	AntiPDE3A (Abcam Inc)	1:1000	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:1000
GPR30	AntiGPR30 (Abcam Inc)	1:500	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:1000
GAPDH	AntiGAPDH Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:1000	Goat-antirabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)	1:1000

## 5.6. Reactivos

En la tabla 3.4 se enlistan los reactivos usados en la metodología así como su marca y abreviatura según sea el caso.

Tabla 3.4: Lista de reactivos utilizados.

Reactivo	Marca	Abreviatura
Antibiótico/Antimicótico	Gibco® by Life Technologies	-----
Blotting-Grade Blocker	BioRad Laboratories	-----
Dulbenco's Modified Eagle Medium (alto en glucosa)	Gibco® de Life Technologies	DMEM
Forskolina	Enzo® Life Sciences	FSK
Genistéina	Sigma-Aldrich®	IBMX
Laemmli Sample Buffer	BioRad Laboratories	-----
LightCycler 480 Syber Green I Master	Roche Applied Science Mannheim, Germany	SYBER Green
Marcador de peso Molecular PageRuler™ Plus	Thermo Scientific	-----
Membrana Immun-Blot® de PVDF	BioRad Laboratories	-----
Protein Assay	BioRad Laboratories	-----
Solución Sustrato Immobilon™ quimioluminiscente de HRP para transferencias	Merk Millipore	-----
Suero Bovino Fetal	Gibco® by Life Technologies	BFS
Suero de Caballo	ATCC	HS
Transcriptasa inversa M-MLV	Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.	IBMX
TRIZOL	Roche Life Science®	-----
3-isobutil 1-metilxantina	Sigma-Aldrich®	IBMX

## 5.7. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico para más de dos grupos se realizó una normalización respecto al vehículo como control y se hizo un análisis de la varianza de una vía. Para determinar la significancia estadística entre los grupos se utilizó la prueba protegida de los mínimos cuadrados de Fisher.

Para comparar más de dos grupos en un curso temporal con diferentes concentraciones se realizó un análisis de la varianza de 2 vías y se utilizó la prueba protegida de los mínimos cuadrados de Fisher para determinar significancia estadística.

Se consideró un resultado estadísticamente significativo cuando fue menor a  $p < 0.05$ . Se utilizó el programa Graph Pad Prisma, GraphPad Software, Incorporation.

# 6

## Resultados

### 6.1. Estandarización del cultivo C2C12

Con el objetivo de estudiar la vía por medio de la cual la genisteína activa la AMPK, se estandarizó los cultivos de la línea celular para obtener miotúbulos, ya que esta línea celular de miotúbulos C2C12 es un modelo in vitro de músculo esquelético y se ha usado para estudiar los efectos de diversos compuestos. Inicialmente se evaluó 2 tipos de sueros que han sido descritos que estimulan la diferenciación de mioblastos a miotúbulos [9]. Con este propósito, cuando las células sembradas llegaron a una confluencia mínima de 85 % se retiró el medio en que proliferaron, se lavaron las células con 1 ml de PBS y se les colocó en los medios de diferenciación reportados, cuya diferencia fue el uso de dos sueros: suero de caballo al 2 % (HS2 %) o suero bovino fetal al 2 % (FBS2 %), en otros. De igual manera se probó dos volúmenes de suero, colocándose dos o cuatro ml. Se documentó la diferenciación mediante fotografías tomadas cada 2 días a a partir del día 0. Las fotografías se tomaron con dos aumentos diferentes 4x y 10x.

Como se puede observar en la figura 6.1, las células se encontraron en una confluencia de más del 90 %. En el día 0 de diferenciación las membranas individuales de cada uno de los mioblastos se pueden distinguir, lo que indica que el proceso de fusión y diferenciación aún no ha comenzado. Esta característica se puede observar tanto en los pozos con HS como los que tienen FBS como suero de diferenciación.

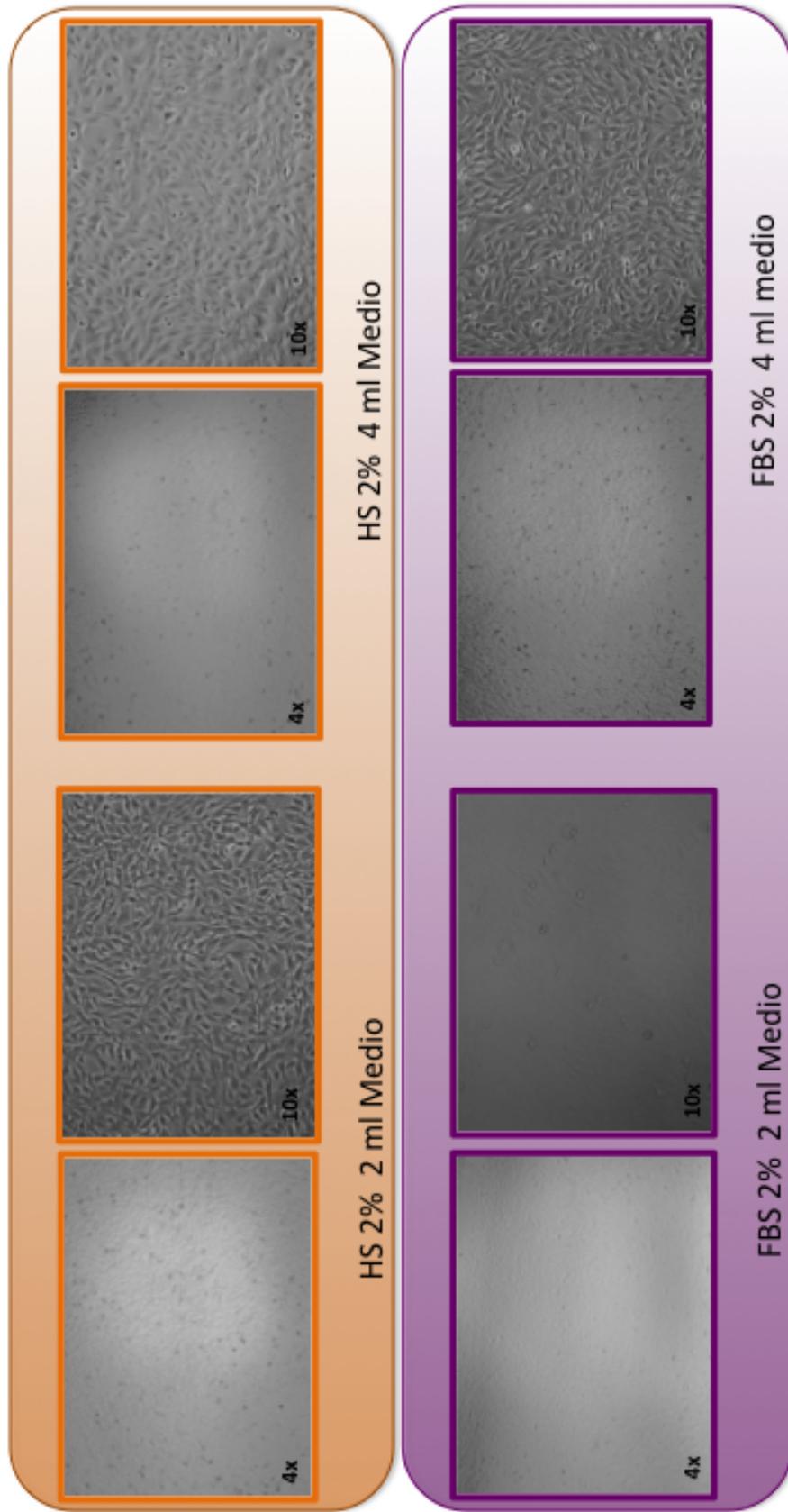


Figura 6.1: Mioblastos C2C12 con medio de diferenciación con suero de caballo 2%(HS2%) con dos y cuatro ml de medio (arriba) . Medio de diferenciación con suero bovino fetal 2% (FBS 2%) con dos y cuatro ml de medio (abajo). Día 0 de diferenciación.

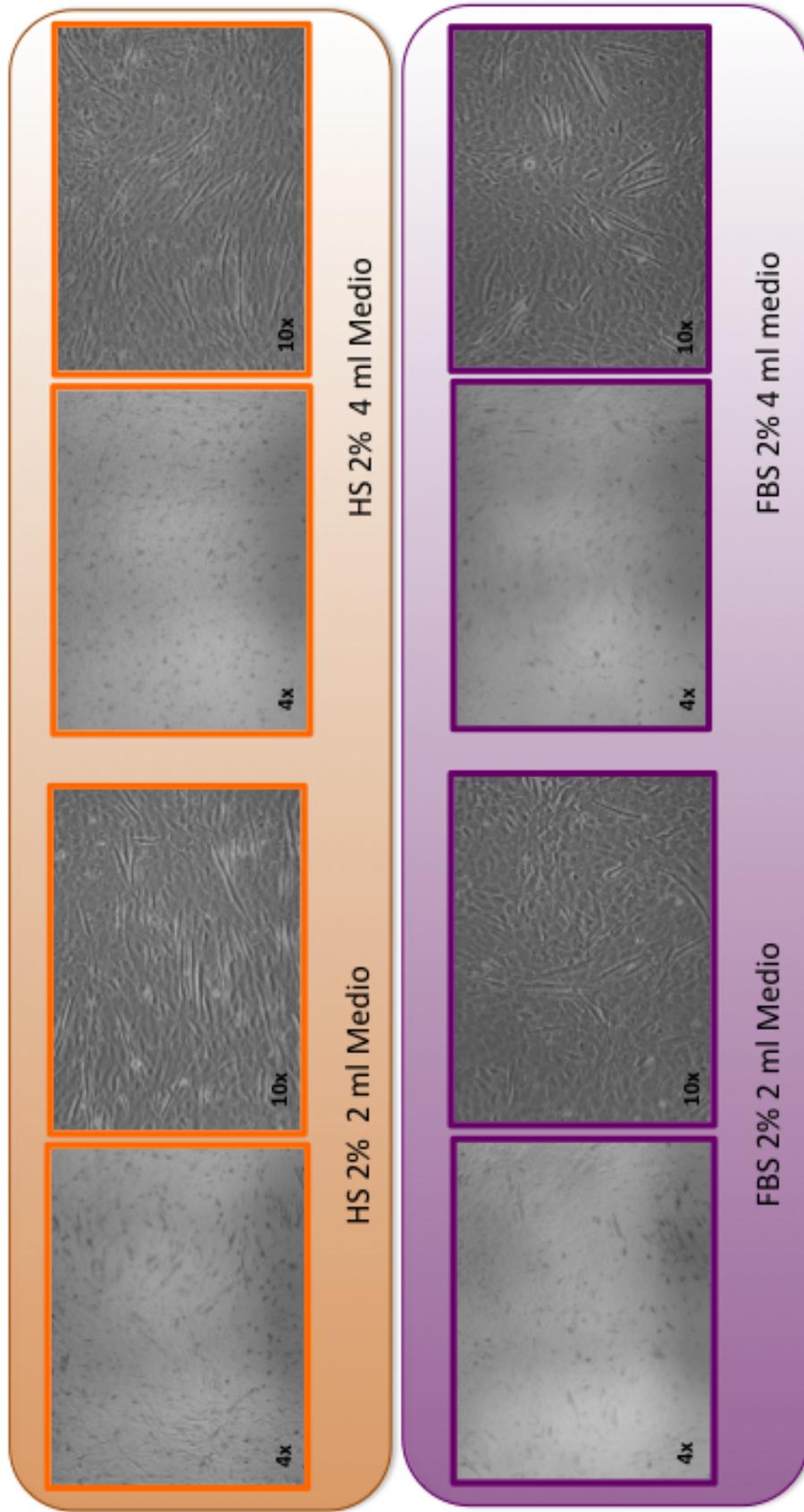


Figura 6.2: Mioblastos C2C12 con medio de diferenciación con suero de caballo 2%(HS2 %) con dos y cuatro ml de medio (arriba) . Medio de diferenciación con suero bovino fetal 2 % (FBS 2 %) con dos y cuatro ml de medio (abajo). Día 2 de diferenciación.

En el día 2 de diferenciación, se observó claramente el proceso de diferenciación tanto en las células tratadas con HS 2% ó FBS 2% (figura 6.2). Se observó con un aumento de 4x la presencia de algunas fibras alargadas; con el aumento de 10x en las dos condiciones se pudieron ver varias fibras alargadas lo que indica que el proceso de diferenciación ya inició. Algo que se pudo observar es que las células diferenciadas con HS tienen más fibras que aquellas tratadas con FBS.

En las fotografías tomadas con el objetivo 4x correspondiente al día 4 de diferenciación (figura 6.3), en las células diferenciadas con HS y dos ml de medio se observó una gran cantidad de miotúbulos largos que se fusionaron en diferentes direcciones; en cambio, en el pozo con HS y cuatro ml de medio la cantidad de fibras fue menor. Este resultado también se observó en las fotografías tomadas con el aumento 10x. Los pozos en los que se usó BFS tanto con dos como con cuatro ml, hubo una gran cantidad de células diferenciadas en donde se observó una gran abundancia de miotúbulos, que crecen en diferentes sentidos y con longitud considerable. En las imágenes con un aumento de 10x se pudo observar con mayor claridad el tamaño de los miotúbulos.

En el día 6 (figura 6.4) de diferenciación, las células en los pozos con BFS se encontraron muy diferenciadas. Tanto en las fotografías con aumento de 4x como con 10x se pudo apreciar lo largo del tamaño de los miotúbulos además de la cantidad que hay de los mismos. Esto se observó tanto la células diferenciadas con dos o con cuatro ml. Las células diferenciadas con HS utilizando cuatro ml de medio presentaron menos diferenciación que aquellas en el pozo con dos ml de medio. Cuando se compararon las células diferenciadas con BFS con aquellas diferenciadas con HS, las células incubadas con HS presentaron relativamente una menor diferenciación que aquellas incubadas con SBF.

Se concluyó que la diferenciación se puede llevar a cabo tanto con HS 2% como con BFS 2% y que esta depende en parte de la manipulación del usuario y del cuidado de las mismas. También se demostró que la cantidad de medio no es determinante para el proceso de diferenciación como se observa en la figura 6.4, en la cuál tanto las células diferenciadas con dos y con cuatro ml de BFS se diferenciaron de forma muy similar. Esto también se corroboró en ensayos posteriores.

Debido a que se observó que los dos sueros tienen la capacidad de diferenciar a los mioblastos en miotúbulos C2C12 y que la cantidad de medio no es relevante se decidió utilizar medio suplementado con HS 2% con dos ml de medio.

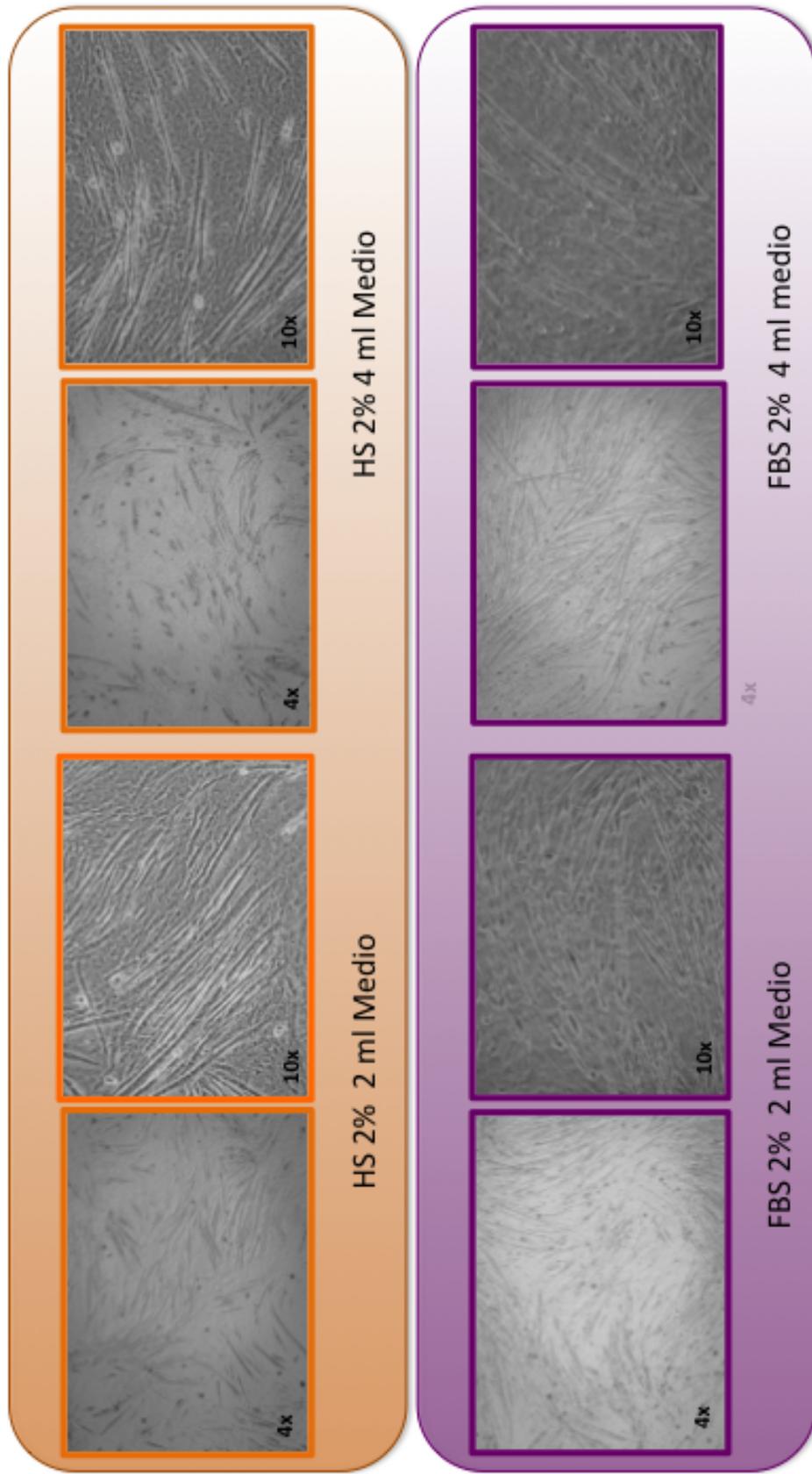


Figura 6.3: Mioblastos C2C12 con medio de diferenciación con suero de caballo 2%(HS2%) con dos y cuatro ml de medio (arriba) . Medio de diferenciación con suero bovino fetal 2% (FBS 2%) con dos y cuatro ml de medio (abajo). Día 4 de diferenciación.

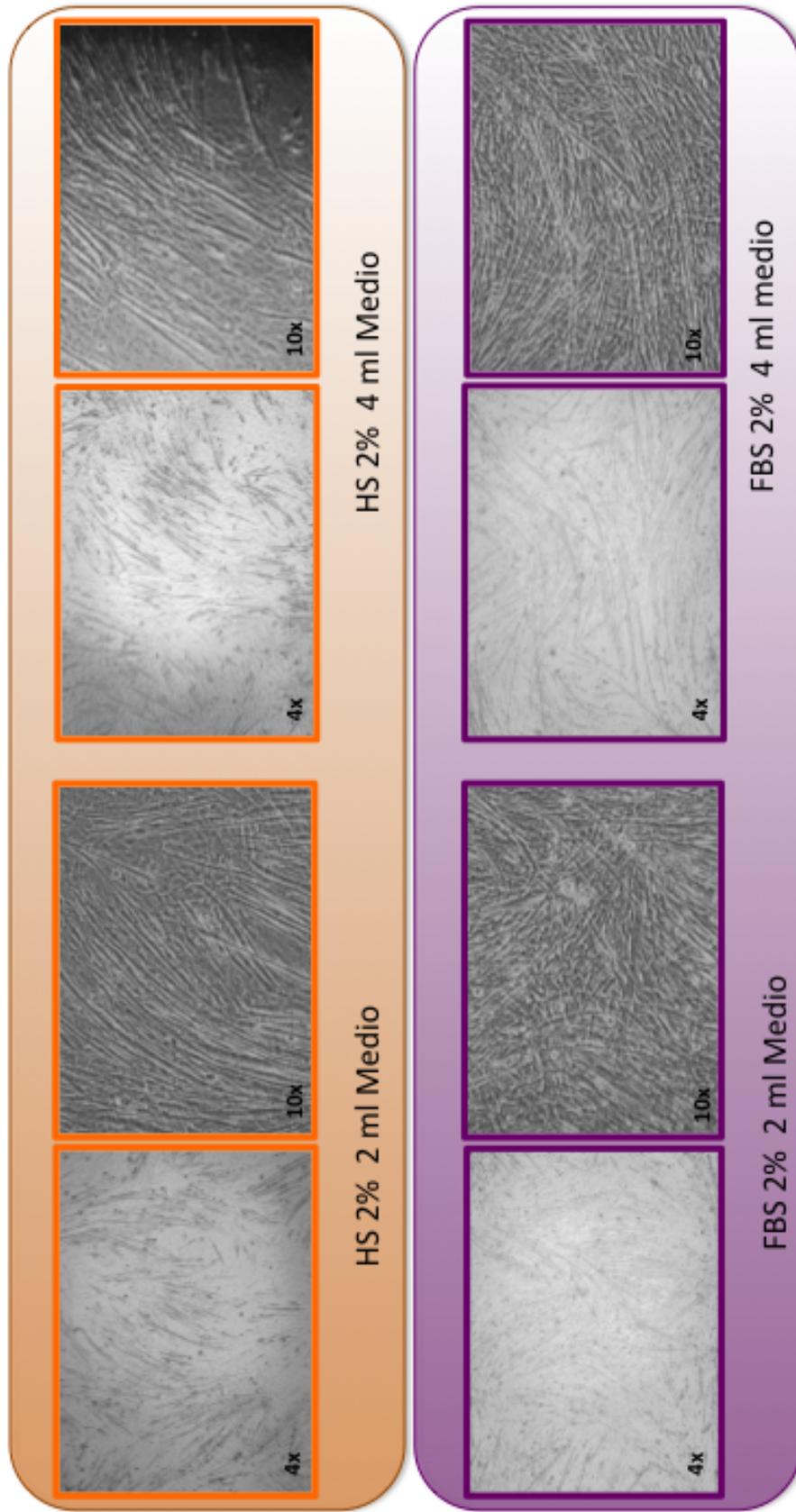


Figura 6.4: Mioblastos C2C12 con medio de diferenciación con suero de caballo 2%(HS2%) con dos y cuatro ml de medio (arriba) . Medio de diferenciación con suero bovino fetal 2% (FBS 2%) con dos y cuatro ml de medio (abajo). Día 6 de diferenciación.

## 6.2. Relación entre distintas concentraciones de genisteína, la fosforilación de AMPK y el AMPc

Con el fin de evaluar si la fosforilación de la AMPK por efecto de la genisteína está relacionado con un incremento en el AMPc por la inhibición de la PDEs, en miotúbulos C2C12, se evaluó el grado de fosforilación de AMPK en 4 condiciones diferentes:

1. Miotúbulos C2C12 incubados con genisteína desde 0.1-300  $\mu M$  durante 60 min.
2. Miotúbulos C2C12 incubados con IBMX 0.1-300  $\mu M$  durante 60 min.
3. Miotúbulos C2C12 incubados con IBMX 300  $\mu M$  durante 60 min y estimulados con genisteína 0.1-300  $\mu M$  60 min.
4. Miotúbulos C2C12 incubados con forskolina 10  $\mu M$  y 30  $\mu M$  en una curva de tiempo de 30, 45 y 60 min.

Para todos los ensayos de Western blot se utilizó a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como proteína estructural para normalizar la abundancia de la proteína de interés.

Inicialmente se realizó el Western blot a partir de la proteína que se extrajo de miotúbulos C2C12 estimulados con genisteína durante 60 minutos con diferentes concentraciones, con el objetivo de determinar el contenido de proteína de la fosfo AMPK (pAMPK) y la AMPK total. El resultado se presenta en la figura 6.5 junto con la densitometría para la pAMPK.

Como se observa en el Western blot (figura 6.5) la fosforilación de AMPK aumentó con respecto al vehículo cuando se estimuló con genisteína en un tiempo de 60 min en la mayoría de las concentraciones, resaltando la banda correspondiente a la concentración de 0.3  $\mu M$ . En la densitometría se observa un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en la fosforilación de la AMPK en concentraciones pequeñas entre 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30  $\mu M$ . La mayor fosforilación se observó cuando se utilizó una concentración de genisteína de 0.3  $\mu M$  (figura 6.6).

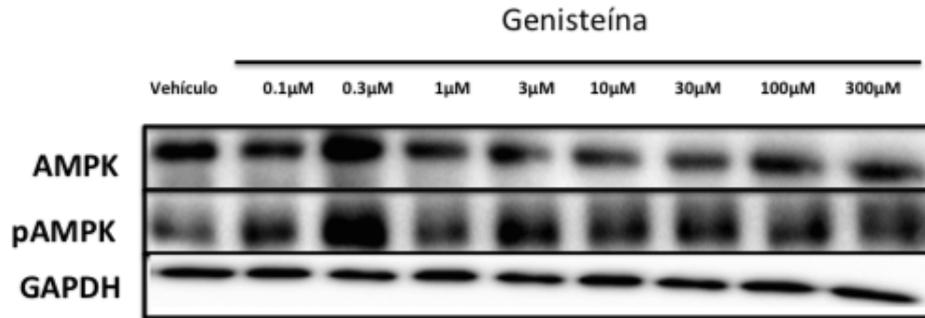


Figura 6.5: Concentración de proteína de la AMPK y la pAMPK en miotúbulos C2C12 tratados con diferentes concentraciones de genisteína en un periodo de 60 min. Se muestra una imagen de un gel representativo de 3 experimentos independientes.

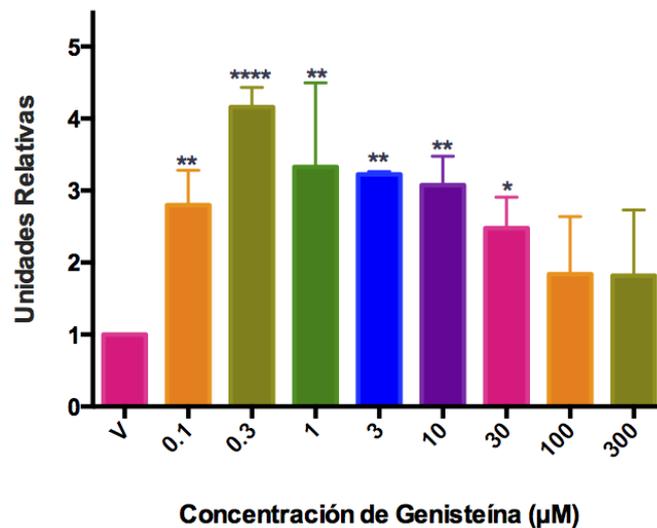


Figura 6.6: Cuantificación de la pAMPK en diferentes concentraciones de genisteína de tres experimentos independientes. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  SD.

A concentraciones más altas de genisteína evaluadas (100 y 300  $\mu\text{M}$ ) el incremento en la activación de AMPK no fue claro, lo que nos sugiere que el efecto de la genisteína solo se observó en concentraciones menores.

Posteriormente se utilizó el compuesto IBMX ya que es un inhibidor de fosfodiesterasas, disminuyendo de esta manera la actividad sobre su sustrato, el AMPc. Este inhibidor establece el papel que juega un incremento de AMPc sobre la fosforilación de AMPK. Con este propósito se incubaron miotúbulos C2C12 con el

inhibidor de fosfodiesterasas IBMX durante un período de 60 min, se lavaron las células con PBS, se lisaron las células con amortiguador de lisis y se extrajo la proteína. Se evaluó por Western blot la abundancia de la AMPK, y su grado de fosforilación con anticuerpos que detectan a la pAMPK.

Como se puede observar en la figura 6.7 la fosforilación de la AMPK aumentó significativamente (figura 6.8). A concentraciones de IBMX de 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$  se observó una mayor fosforilación de la AMPK.

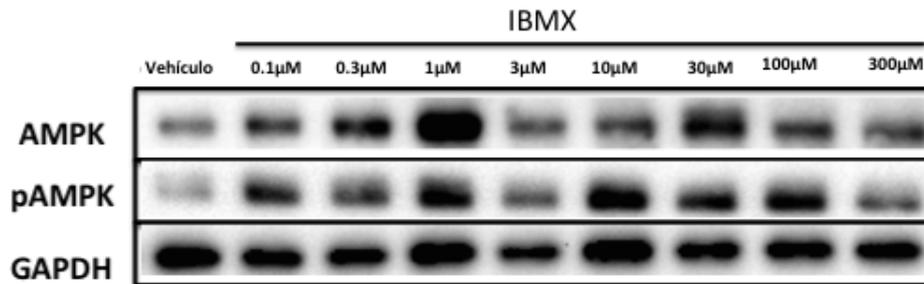


Figura 6.7: Concentración de proteína de la AMPK y la pAMPK en miotúbulos C2C12 tratados con diferentes concentraciones de IBMX en un periodo de 60 min. Se muestra una imagen de un gel representativo de 3 experimentos independientes.

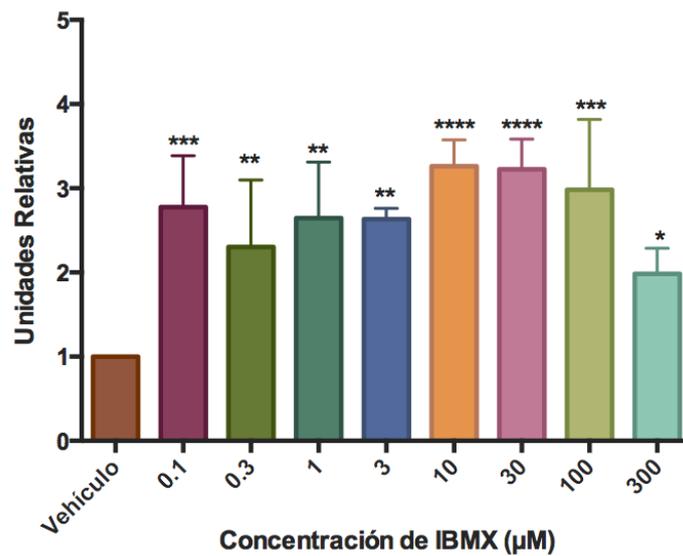


Figura 6.8: Cuantificación de la pAMPK en diferentes concentraciones de IBMX de tres experimentos independientes. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  SD.

Con el fin de comprobar que la magnitud de esta fosforilación puede incrementar cuando se inhiben las fosfodiesterasas con el IBMX y se estimula con la genisteína se realizaron ensayos en los que los miotúbulos C2C12 se incubaron con IBMX  $300 \mu\text{M}$  durante 60 min y posteriormente se estimularon con genisteína en un rango de concentración de  $0.1\text{-}300 \mu\text{M}$  durante 60 min. Se realizó el Western blot para la pAMPK.

En el Western blot de la figura 6.9 se observó que existió una tendencia hacia aumentar la fosforilación de la AMPK cuando se comparó las muestras tratadas con ambos compuestos, IBMX y genisteína contra el control tratado solo con el inhibidor a una concentración de  $300 \mu\text{M}$ . Esta tendencia se observó en la mayoría de las concentraciones de genisteína, sin embargo, este incremento fue sólo significativo ( $p < 0.05$ ) en las muestras en las que las células fueron incubadas con  $300 \mu\text{M}$  de IBMX y se estimuladas con  $10 \mu\text{M}$  de genisteína (figura 6.10).

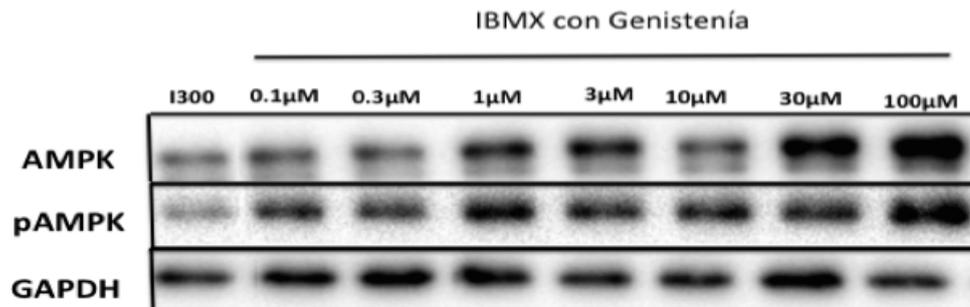
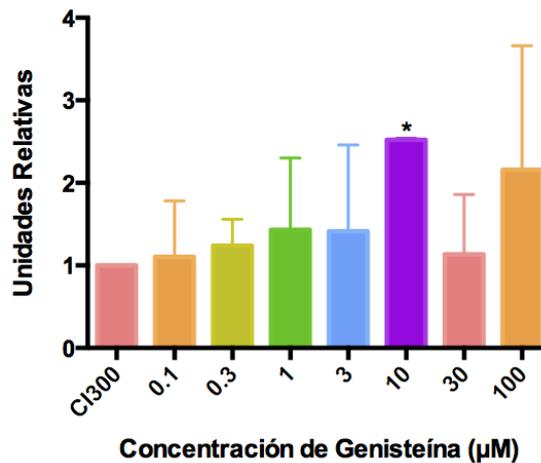


Figura 6.9: Concentración de proteína de la AMPK y la pAMPK en miotúbulos C2C12 tratados con IBMX  $300 \mu\text{M}$  y estimuladas con diferentes concentraciones de genisteína. El tiempo de estímulo fue de 60 min con el inhibidor y se agregó genisteína por 60 min más. Se muestra una imagen de un gel representativo de 3 experimentos independientes.



1

Figura 6.10: Cuantificación de tres experimentos independientes de la pAMPK en miotúbulos C2C12 incubados con IBMX 300  $\mu\text{M}$  y estimuladas con genisteína en diferentes concentraciones. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  SD.

También se usó como estimulador de la respuesta a la forskolina, la cual es un activador ya conocido de adenilato ciclasa. Cuando se estimula con este compuesto, se ha demostrado que se elevan las concentraciones de AMPc, por lo que se evaluó la fosforilación de la AMPK en respuesta a la forskolina para demostrar y evidenciar que el incremento de AMPc estimula la fosforilación de la AMPK como se ha sugerido previamente [9].

Se realizó un ensayo en el cual se estimularon los miotúbulos C2C12 con forskolina en dos concentraciones diferentes 10 y 30  $\mu\text{M}$ , se realizó una curva de tiempo en la que se evaluó la fosforilación de AMPK al inicio, 30, 45 y 60 minutos después del estímulo. Después de los tiempos de estímulo, se lisaron las células, se extrajo la proteína, se cuantificó y se realizó el análisis de la AMPK y la pAMPK por Western blot.

Como se puede observar en la figura 6.11 la fosforilación de la AMPK se incrementó cuando las células se estimularon con forskolina 30  $\mu\text{M}$  siendo la activación notoria a un tiempo de estímulo de 45 y 60 min.

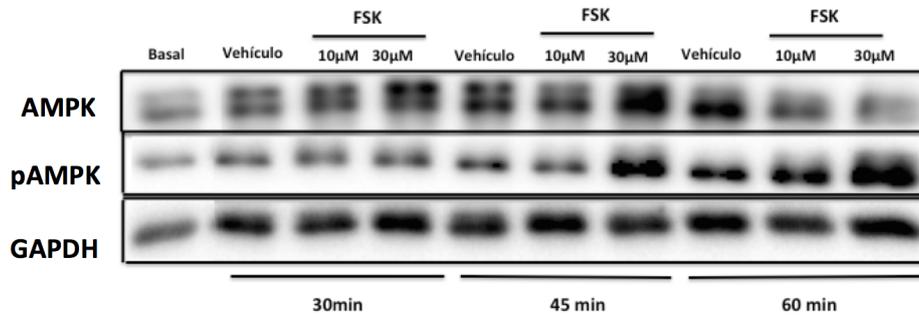


Figura 6.11: Concentración de proteína de la AMPK y la pAMPK en miotúbulos C2C12 tratados con forskolina 10 y 30  $\mu\text{M}$  en un periodo de 30, 45 y 60 min. Se muestra una imagen de un gel representativo de 3 experimentos independientes.

Se graficó un curso temporal con la densitometría para todas las muestras. Se calculó el área bajo la curva por el método trapezoidal para todos los puntos (figura 6.12). En la gráfica de área bajo la curva se observó que la concentración de 30  $\mu\text{M}$  de forskolina incrementó la fosforilación de la AMPK de manera significativa ( $p < 0.05$ ), en comparación con aquellas células que fueron estimuladas con solo vehículo. En la misma gráfica se observa que el estímulo de 10  $\mu\text{M}$  de forskolina no aumentó la activación de la AMPK cuando se comparó con el vehículo, ya que no hubo diferencia entre el vehículo y este tratamiento de forskolina.

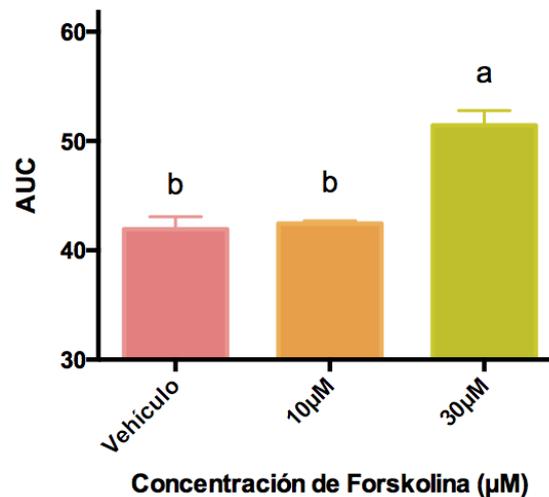
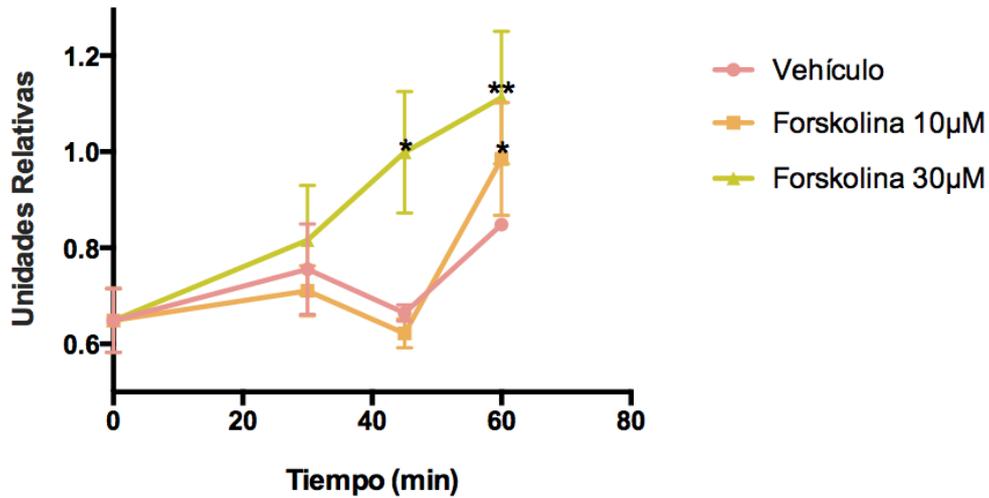


Figura 6.12: Cuantificación de la pAMPK de miotúbulos C2C12 estimulados con 10 y 30  $\mu\text{M}$  de forskolina en un periodo de 30, 45 y 60 min de tres experimentos independientes. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ) Promedio  $\pm$  SEM. Abreviaturas: AUC: área bajo la curva.

En la figura 6.13 se presenta el curso temporal de cada una de las concentraciones de forskolina y el vehículo en todos los tiempos. Se realizó un análisis de ANOVA de 2 vías y se observó que existió una significancia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto al tiempo y al tratamiento, al hacer el análisis post hoc el resultado reveló que cuando se comparó el valor basal con el de las muestras estimuladas con forskolina  $30 \mu\text{M}$ , este resultó significativamente diferente a los 45 y 60 min después del estímulo, y con  $10 \mu\text{M}$  solo a los 60 min, lo que indica que bajo estas condiciones de concentración de forskolina y en estos tiempos se incrementó la fosforilación de la AMPK.

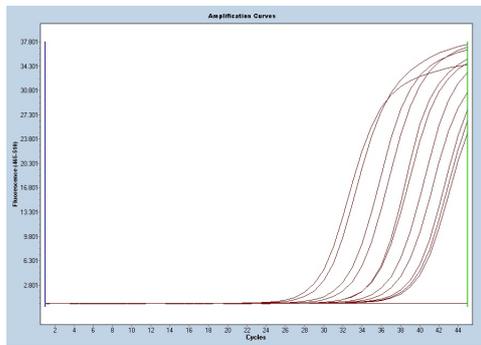


1  
Figura 6.13: Curva temporal de la pAMPK de miotúbulos C2C12 estimulados con 10 y  $30 \mu\text{M}$  de forskolina en un periodo de 30, 45 y 60 min de tres experimentos independientes. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  SEM

### 6.3. Determinación de fosfodiesterasas en la Línea celular C2C12. Posible blanco de la genisteína

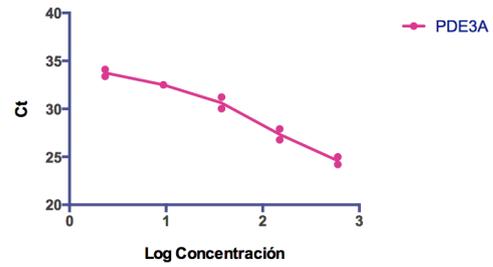
Como se ha mencionado anteriormente la genisteína podría ser un inhibidor de fosfodiesterasas y por esta vía elevar el AMPc. Realizando una revisión en la literatura se buscó cuáles fosfodiesterasas están presentes en los diferentes tipos celulares. Particularmente en músculo esquelético se ha descrito que las fosfodiesterasas 7A1 (PDE7A1) y 7A2 (PDE7A2) son muy específicas de este tejido además de presentar muy alta especificidad por AMPc [33, 34]. Debido a que la línea celular que se utilizó es una línea de músculo esquelético, existe una gran posibilidad de que se expresen en miotúbulos C2C12. Adicionalmente, otra fosfodiesterasa que podría intervenir en este proceso es la fosfodiesterasa 3A (PDE3A); esta fosfodiesterasa está presente en el músculo liso y existe un estudio que indica que esta se puede expresar en la línea celular de miotúbulos C2C12 [35]. Sin embargo, fue necesario demostrar cuál de estas fosfodiesterasas está presente en los miotúbulos C2C12.

Con este propósito, primero se trató de identificar si en los miotúbulos de las células C2C12 estaba presente alguno de estos miembros de la familia de las fosfodiesterasas. Se analizó por qPCR la abundancia para algunos de los mRNA de estas enzimas. En la figura 6.14 se muestra la curva de amplificación del qPCR realizado mediante SYBER green para la fosfodiesterasa 3A, esta determinación se hizo a partir del RT-PCR de muestras de RNA de células de miotúbulos C2C12. Se observó claramente que el mRNA de la fosfodiesterasa 3A se expresa en esta línea celular. La eficiencia de la reacción del qPCR para fosfodiesterasa 3A fue de 1.89.



(a)

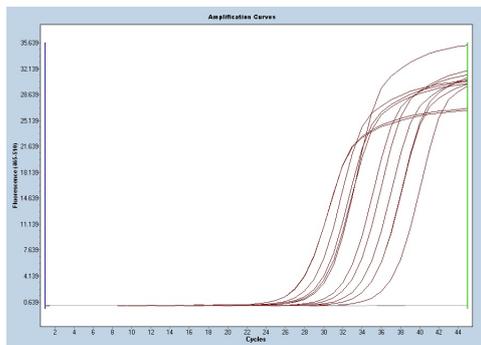
Curva Estandar de PDE3A en miotúbulos C2C12



(b)

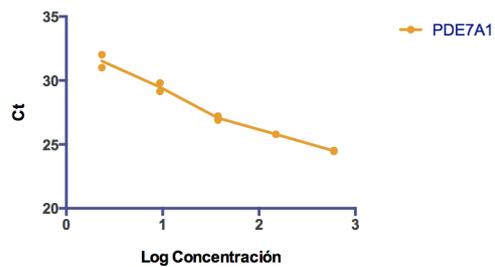
Figura 6.14: (a): Curva de amplificación de Fosfodiesterasa 3A (PDE3A) en miotúbulos C2C12,(b):Gráfica de Curva estándar para Fosfodiesterasa 3A (PDE3A).

Cuando se realizó el PCR cuantitativo por SYBR green para la fosfodiesterasa 7A1 y 7A2 en miotúbulos C2C12 se observó que el mRNA de PDE7A1 también se expresa en miotúbulos C2C12 (figura 6.15). La eficiencia de la reacción del qPCR para fosfodiesterasa 7A1 fue de 2.08.



(a)

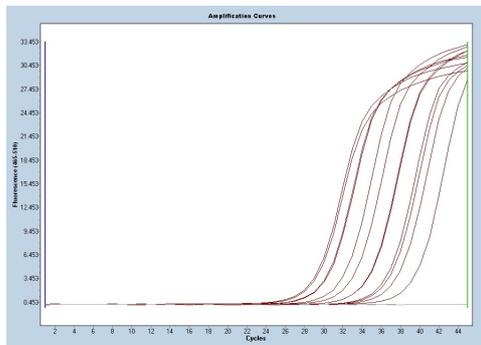
Curva Estandar de PDE7A1 en miotúbulos C2C12



(b)

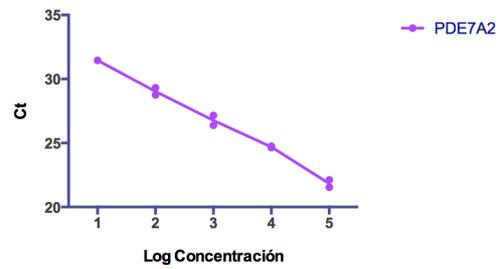
Figura 6.15: (a): Curva de amplificación de Fosfodiesterasa 7A1 (PDE7A1) en miotúbulos C2C12,(b):Gráfica de Curva estándar para Fosfodiesterasa 7A1 (PDE7A1).

De igual manera se realizó la cuantificación por qPCR-SYBR green para la isoforma 2 de la fosfodiesterasa 7A, y los resultados fueron similares a los observados para las otras fosfodiesterasas analizadas como se presenta en la figura 6.16. La eficiencia de la reacción del qPCR para fosfodiesterasa 7A2 fue de 1.77.



(a)

Curva Estándar de PDE7A2 en miotúbulos C2C12



(b)

Figura 6.16: (a): Curva de amplificación de Fosfodiesterasa 7A2 (PDE7A2) en miotúbulos C2C12, (b): Gráfica de Curva estándar para Fosfodiesterasa 7A2 (PDE7A2).

Con el fin de evaluar si la expresión de los genes ya medidos no cambia entre pozos de un mismo pase y entre pases celulares ya diferenciados (ya que se ha informado que la expresión puede cambiar dependiendo de la manipulación [43]), se determinó la expresión de muestras de diferentes pozos y de diferentes pases celulares de miotúbulos C2C12 sin ningún tratamiento. Como se observa en la figura 6.17 no hubo diferencia en la expresión de las fosfodiesterasas entre las muestras cuando se evaluó cada uno de los genes, lo que indicó que la expresión no varió entre muestras de un mismo pase y muestras de pases diferentes.

Al comparar la abundancia de mRNA de las distintas fosfodiesterasas se demostró que sí existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la expresión de genes de las fosfodiesterasas, siendo la fosfodiesterasa 3A la que más se expresó en la línea celular con respecto a la 7A1 y 7A2 (figura 6.18).

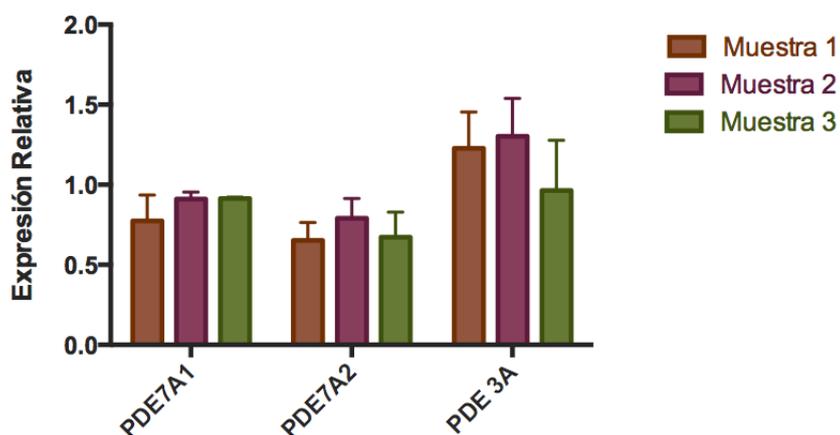


Figura 6.17: Cuantificación de dos experimentos independientes de la expresión génica de fosfodiesterasas 3A, 7A1 y 7A2 en miotúbulos C2C12. Promedio  $\pm$  SD.

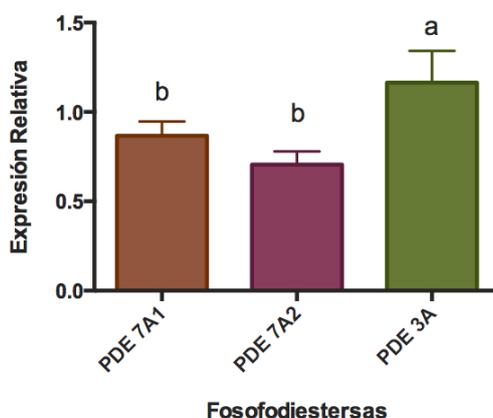


Figura 6.18: Cuantificación de dos experimentos independientes de la expresión génica de fosfodiesterasas 3A, 7A1 y 7A2 en miotúbulos C2C12. Promedio  $\pm$  SD.

También se determinó la abundancia de estas fosfodiesterasas a nivel de la proteína en los miotúbulos C2C12 por medio de análisis de Western blot. Con respecto a la PDE 3A, el análisis por Western blot reveló la presencia de una banda con una masa molecular aproximadamente 125 kDa (figura 6.19), que corresponde con la masa reportada para la PDE 3A. La proteína está presente en cantidades importantes, lo que la puede convertir en el blanco principal de la genisteína.

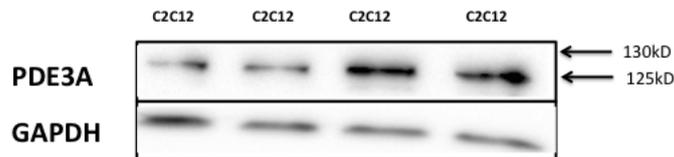


Figura 6.19: Western blot de la proteína PDE3A en miotúbulos C2C12 sin ningún estímulo. Se utilizaron muestras diferentes de las células sin tratamiento para demostrar su presencia.

Posteriormente se evaluó la presencia de proteína de fosfodiesterasas 7A1 y 7A2. Primero, se evaluó la abundancia de esta proteína en músculo esquelético de ratones adultos, en donde se ha descrito que está presente y que sirvió como control positivo. Es importante mencionar que el anticuerpo utilizado reconoce las 2 isoformas de la fosfodiesterasa 7A.

Como se puede observar en el análisis por Western blot se encontró que las dos isoformas están presentes en todas las muestras de músculo esquelético (figura 6.20). La masa molecular para estas proteínas fue de aproximadamente 50 kDa para la isoforma 2 y 57 kDa para la isoforma 1, lo cual corresponde a lo reportado para estas proteínas.

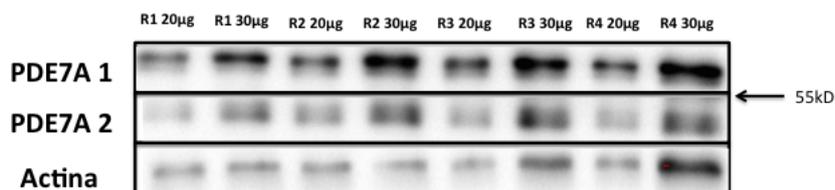


Figura 6.20: Western blot de la proteína PDE7A1 y PDE7A2 en músculo esquelético de ratones adultos. Se utilizaron muestras de 4 ratones diferentes (R1-R4) en dos cantidades (20 y 30  $\mu$ gr) para demostrar su presencia en el músculo esquelético.

Interesantemente, al realizar el análisis por Western blot de estas isoformas de la fosfodiesterasa 7A en miotúbulos C2C12 usando como control positivo la proteína del músculo esquelético, no se detectó su presencia. En el análisis (figura 6.21) solo se aprecia que la fosfodiesterasa 7A1 y A2 se ven presentes en el control positivo correspondiente a la proteína de músculo esquelético, lo que sugiere que estas isoformas, por algún mecanismo desconocido no se traducen a proteínas en la línea celular de miotúbulos C2C12, lo que requiere de estudios adicionales para

establecer este posible mecanismo.

Para corroborar que estas proteínas no se encuentra en los miotúbulos C2C12 se realizó una curva de proteína con 30, 40 y 50  $\mu$ gr usando el control positivo. Como se observa en la figura 6.22, en el control positivo se vió claramente la presencia de la fosfodiesterasa 7A1, mientras que los carriles correspondientes a la muestras de proteína de los miotúbulos, se observó unas bandas extremadamente tenues, re-enfatizando un posible mecanismo de regulación pretraduccional, como podría ser los micro RNA específicos. Más estudios son requeridos para describir esta regulación.

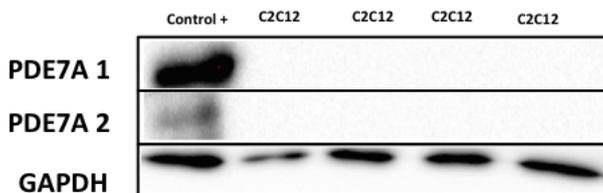


Figura 6.21: Western blot de la proteína PDEA1 y PDE7A2 en miotúbulos C2C12 sin ningún estímulo. Se utilizaron muestras diferentes de las células sin tratamiento para demostrar su presencia. Se usó la proteína del músculo esquelético de ratones como control positivo.

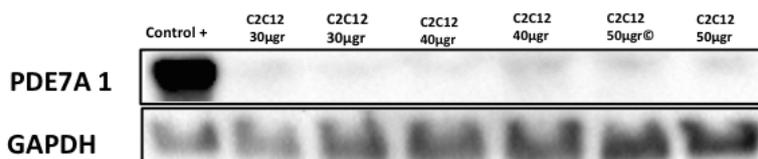


Figura 6.22: Western blot de la proteína PDEA1 en miotúbulos C2C12 sin ningún estímulo. Se utilizaron muestras de diferentes células sin tratamiento y una curva de proteína de 30, 40 y 50  $\mu$ gr para demostrar su presencia o ausencia. Se usó la proteína del músculo esquelético de ratones como control positivo.

A pesar que las tres fosfodiesterasas se expresan en la línea celular pero no se traduce la fosfodiesterasa 7A1 y A2, la evidencia sugiere que la principal fosfodiesterasa que podría estar potencialmente involucrada en el mecanismo de regulación de las concentraciones de AMPc por genisteína es la fosfodiesterasa 3A. Se están conduciendo estudios en el laboratorio para establecer su potencial importancia en el mecanismo de la acción de la genisteína.

## 6.4. Determinación del contenido de proteína del receptor GPR30 en respuesta a la genisteína en miotúbulos C2C12. Posible mediador de los efectos de la genisteína

Como ya se ha mencionado, otra proteína por la cual podrían estar mediados los efectos de la genisteína es el receptor GPR30. Se conoce que el receptor GPR30 se expresa en muchos tejidos, sin embargo, al inicio de este trabajo no se encontraron estudios que demuestren su presencia en los miotúbulos C2C12, por lo que se inició la exploración de este mecanismo potencial estableciendo su presencia por medio de análisis por Western blot en estas células. Se utilizó las muestras de las células que fueron estimuladas con genisteína. Primeramente, se demostró que estas células expresaron este receptor (figura 6.23). Inesperadamente, se observó que la adición de genisteína en el medio a una concentración de 0.1 y 0.3  $\mu\text{M}$ , elevó significativamente la abundancia de este receptor (figura 6.24). Es necesario realizar más estudios para determinar el significado de este hallazgo, con el propósito de corroborar si el GPR30 está involucrado en la ruta de estudio.

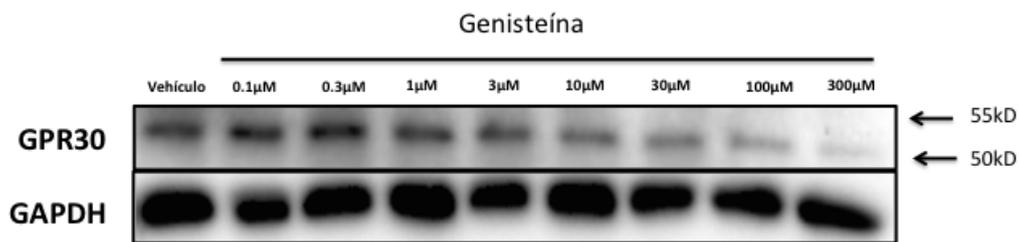


Figura 6.23: Concentración de proteína de GPR30 en miotúbulos C2C12 tratados con diferentes concentraciones de genisteína en un periodo de 60 min. Se muestra una imagen de un gel representativo de 3 experimentos independientes.

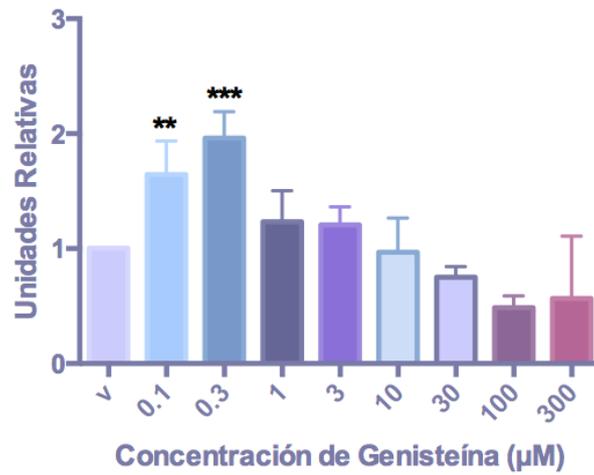


Figura 6.24: Cuantificación de el GPR30 en miotúbulos C2C12 tratados con diferentes concentraciones de genisteína de tres experimentos independientes. Los asteriscos en la gráfica indican la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Promedio  $\pm$  SD.

# 7

## Discusión

En años recientes se ha establecido que los fitoestrógenos juegan un papel importante en el control de la obesidad y la diabetes. Se sabe que en modelos animales el consumo de la proteína de soya, la cual contiene las isoflavonas, disminuye la cantidad de triglicéridos y colesterol circulantes, además de disminuir la cantidad de grasa almacenada en el hígado y el músculo [9, 10, 11]. En estudios en humanos, se ha comprobado que la proteína de soya disminuye la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia [5].

Ya que actualmente se sabe que los compuestos que aportan beneficios a la salud son las isoflavonas como la genisteína, se han enfocado esfuerzos con el objetivo de determinar los mecanismos por los cuales se llevan a cabo estos efectos metabólicos que contribuyen a aminorar o mejorar ciertas condiciones de estos padecimientos crónicos.

Se ha demostrado en modelos experimentales en roedores que uno de los efectos que tiene la genisteína es la de disminuir la resistencia a la insulina en animales con obesidad. El mecanismo establecido en parte para mejorar la sensibilidad a la insulina es por medio del aumento en la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Los estudios en el laboratorio han demostrado que este efecto está mediado por un incremento en la oxidación de ácidos grasos a través de un aumento de la actividad mitocondrial y del incremento en la expresión de genes de la  $\beta$ -oxidación y la termogénesis. Cuando los animales consumen genisteína se incrementa la fosforilación de la AMPK, lo que inicia la activación de los mecanismos

oxidativos [9]. Para poder estudiar este proceso, en el presente trabajo se estandarizó un modelo in vitro de músculo esquelético con la línea celular de miotúbulos C2C12.

Se utilizaron dos sueros diferentes con medio DMEM alto en glucosa para diferenciar mioblastos en miotúbulos. Se usó suero de caballo (HS) en una concentración del 2% y suero bovino fetal (BFS) en el mismo porcentaje. Se utilizaron dos y cuatro mililitros para llevar a cabo el proceso de diferenciación, el cual se documentó cada dos días con fotografías desde el día 0 hasta el día 6 de diferenciación. Se observó que para el caso de HS 2%, las células en el segundo día de diferenciación ya mostraban estructuras similares a miotúbulos sin importar la cantidad de medio, mientras que en las células diferenciadas con BFS, la cantidad de túbulos fue menor en ambas células tanto las diferenciadas con dos ml como las diferenciadas con cuatro ml. Sin embargo, al día 4 de diferenciación las células diferenciadas con BFS presentaron gran cantidad de miotúbulos con una considerable longitud en ambas condiciones (dos y cuatro ml). Las células diferenciadas con HS presentaban menos cantidad de miotúbulos.

Al día 6 las células diferenciadas con HS y cuatro ml se encontraron menos diferenciadas que las células diferenciadas con dos ml de HS y que las diferenciadas con BFS. La diferenciación con HS y dos ml fue menor que la diferenciación de las células tratadas con FBS pero mucho más notoria que en las células diferenciadas con HS y cuatro mililitros. Esto sugiere que la diferenciación se puede llevar a cabo con ambos sueros como se ha descrito previamente [44, 9].

Actualmente se sabe que la genisteína tiene diversos efectos y se ha comprobado que estos efectos varían dependiendo de la concentración en la que se utilice [45, 7]. Para estudiar el efecto de la genisteína se realizó una curva de concentraciones y se estimuló a miotúbulos C2C12. Los resultados sugieren que a concentraciones menores a  $30 \mu\text{M}$  la activación de AMPK es clara a los 60 min del estímulo; la concentración que más incrementa la fosforilación es de  $0.3 \mu\text{M}$ . Se corroboró que a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  se incrementa la fosforilación en miotúbulos C2C12 como se ha reportado anteriormente en esta línea celular y en otros tejidos [46, 9]. La activación de AMPK es mucho menor a concentraciones iguales o mayores a de  $100 \mu\text{M}$ . Se ha reportado que la genisteína tiene un efecto bifásico [7] y un aspecto importante a considerar es la concentración que se utiliza, como se pudo observar en

este estudio. Este efecto bifásico se puede deber a que a diferentes concentraciones los mecanismos y blancos de la genisteína podrían ser diferentes y por lo tanto los efectos varían dependiendo de las concentraciones en los tratamientos. Este efecto de la genisteína solo se ha observado en cáncer, en donde a concentraciones pequeñas el mecanismo por el cuál actúa es diferente al involucrado cuando se usa en altas concentraciones sin cambiar el contexto celular.

Un posible mecanismo por el cual la genisteína podría activar a la AMPK es la elevación del AMPc, ya que se ha descrito que la genisteína puede incrementar las concentraciones de este segundo mensajero en la línea celular de miotúbulos C2C12 [9]. Con el fin de estudiar este mecanismo, se realizaron varios ensayos utilizando estimuladores e inhibidores de enzimas involucradas en la producción de AMPc. Se usó IBMX como inhibidor de fosfodiesterasas y se estudió si la AMPK se fosforila en miotúbulos C2C12 en la presencia de este inhibidor. Como se pudo observar, la fosforilación ocurre tanto en concentraciones pequeñas ( $0.3 \mu\text{M}$ ) como en concentraciones más altas ( $100 \mu\text{M}$ ); sin embargo la concentración  $\text{IC}_{50}$  (Ki) de este inhibidor es de 19 a  $32 \mu\text{M}$  [47] y no se puede establecer claramente si a una concentración de  $0.3 \mu\text{M}$  de IBMX inhibe a las fosfodiesterasas de una manera completa.

Ya que se ha descrito que la genisteína podría funcionar como inhibidor de fosfodiesterasas [35, 36], se evaluó si los efectos del IBMX y la genisteína son aditivos. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la fosforilación de la AMPK tiende a incrementar cuando se incuban miotúbulos C2C12 con IBMX a una concentración de  $300 \mu\text{M}$  (60 min) en presencia de genisteína a distintas concentraciones ( $0.1 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$  después de 60 min de incubación). No obstante, esta tendencia no es significativa para casi ninguna de estas concentraciones.

Debido a que los resultados utilizando el IBMX requieren aún confirmarse, en la actualidad se está trabajando con shRNA para fosfodiesterasas presentes en esta línea celular con el fin de observar una respuesta más óptima de la fosforilación de AMPK en presencia de la genisteína.

Otra estrategia utilizada para estudiar si la estimulación por AMPc incrementa la fosforilación de AMPK fue el utilizar la forskolina, un activador de la adenilato ciclasa. Se observó que las células incubadas con  $30 \mu\text{M}$  tuvieron un incremento significativo de la fosforilación de AMPK a un tiempo de incubación de 60 min.

Esta respuesta es similar a la observada en estudios previos con esta línea celular y con adipocitos [9, 48]. Para poder confirmar si el AMPc está involucrado en esta activación de AMPK en la actualidad se está trabajando con miotúbulos C2C12 incubados con un análogo de AMPc, el 8-bromo adenosina monofosfato 3'5' cíclico (8-bromo AMPc), para establecer más claramente la importancia del AMPc en este mecanismo de activación por genisteína.

Como ya se ha mencionado, se ha documentado que la genisteína puede ser un inhibidor de fosfodiesterasas. Debido a esto, se determinó tanto la expresión como el contenido de proteína de fosfodiesterasas.

Ya que la línea celular utilizada, la C2C12, es un modelo *in vitro* de músculo esquelético, se investigó en estudios anteriores cuáles fosfodiesterasas se expresan en músculo esquelético y músculo liso que pudieran estar presentes en los miotúbulos C2C12 [49, 50, 33, 34]. Con este fin se determinó particularmente la expresión de las fosfodiesterasa 3A, y la fosfodiesterasa 7A para la isoforma 1 y 2, las cuales están presentes en músculo. Interesantemente, se observó la presencia de mRNA para las tres fosfodiesterasas en la línea celular, siendo la fosfodiesterasa 3A la que más expresa de las tres isoenzimas. De las fosfodiesterasas 7A1 y 7A2 su mRNA se expresa en la misma proporción. Sin embargo, cuando se determinó la abundancia proteica de las fosfodiesterasa 3A, 7A1 y 7A2 en la línea celular miotúbulos C2C12, se observó que la fosfodiesterasa 3A sí se traduce de manera abundante en la línea celular mientras que para las fosfodiesterasas 7A1 y 7A2 su abundancia es extremadamente baja, lo que indica que a pesar de que existe una expresión de esta enzima existe un mecanismo que inhibe su traducción en estas células.

Se ha encontrado que en los miotúbulos C2C12 la fosfodiesterasa 3A representa una parte de la actividad total de las fosfodiesterasa de la línea celular [35]. Con base en esta evidencia, se sugiere a partir del presente trabajo que el posible efecto de la genisteína sobre las fosfodiesterasas, sea sobre la 3A. Aunque no es parte de este proyecto, resulta interesante el conocer que mecanismo regula a la baja a la traducción de la fosfodiesterasa 7A1 y 7A2, en donde posiblemente exista un microRNA que establezca esta función.

Debido a la evidencia que apunta a que la genisteína eleva el AMPc y a la interacción que tiene la genisteína con receptores de estrógenos, se ha sugerido que un receptor también podría estar involucrado en la interacción de la genisteína con

la activación de la AMPK, y un posible blanco podría ser el receptor GPR30. Se ha reportado principalmente en células cancerosas la importancia de este receptor como mediador de los efectos de la genisteína. [51, 41, 42].

Antes de iniciar este trabajo no se encontraron estudios que indicaran que la línea celular C2C12 expresara este receptor, por lo que se determinó la presencia de la proteína de GPR30 en la línea celular diferenciada y claramente se observó que GPR30 se encuentra en esta línea celular, hallazgo que se reportó posteriormente [37].

Se evaluó si el contenido de proteína de GPR30 cambia en respuesta al estímulo de la genisteína. Los resultados indicaron que a concentraciones entre  $0.1 \mu\text{M}$  y  $0.3 \mu\text{M}$  el contenido de esta proteína incrementa. Se ha reportado mediante ensayos de competencia con estradiol que la genisteína sí interactúa con este receptor y que la concentración  $\text{IC}_{50}$  (Ki) con respecto a su ligando endógeno es de  $133 \text{ nM} = 0.133 \mu\text{M}$ . El porcentaje de unión de la genisteína fue del 13 % con respecto al  $17\beta$  estradiol [52]. Esta concentración coincide con las concentraciones de genisteína reportadas en este trabajo en las cuales se produjo una elevación en el contenido del receptor así como un incremento de la fosforilación de AMPK.

Con base en los resultados obtenidos, se propone evaluar el papel de GPR30 sobre la fosforilación de la AMPK por la genisteína, silenciando y sobre-expresando el receptor en la línea celular y evaluando la fosforilación en presencia de genisteína.

Un aspecto que no se abordó en este estudio en relación a GPR30 es su ubicación celular. Ya que se ha descrito que su ubicación celular es diversa y se ha observado que el receptor puede cambiar dicha localización celular en respuesta a un estímulo de estrógenos en ensayos con esta línea celular [53, 37], se considera importante determinar la localización celular del receptor en la línea celular de miotúbulos C2C12 y si esta localización cambia en respuesta a la genisteína.

Otro aspecto a considerar en esta ruta de señalización es que se ha sugerido, mediante modelos computacionales, que la genisteína podría interactuar con la enzima adenilato ciclasa [32]. Esto sería una posible alternativa para explicar cómo se da la fosforilación de AMPK por el efecto de la genisteína en los miotúbulos C2C12.

# 8

## Conclusiones

En la figura 8.1 se resumen los resultados obtenidos en este trabajo así como las posibles perspectivas del mismo.

1. Los miotúbulos C2C12 se pueden obtener diferenciando con suero de caballo o con suero bovino fetal independientemente de la cantidad de medio.
2. La genisteína promueve la fosforilación de AMPK en concentraciones menores a  $30 \mu\text{M}$  y esta fosforilación está relacionada a la producción de AMPc a través de diversos mecanismos.
3. El incremento de la actividad de la adenilato ciclasa, estimula la fosforilación de AMPK en miotúbulos C2C12.
4. Uno de los mecanismos de activación de la AMPK en respuesta al tratamiento con genisteína para estimular la producción de AMPc podría ser a través de la inhibición de la fosfodiesterasa 3A en los miotúbulos C2C12.
5. Otro mecanismo que podría promover la fosforilación de la AMPK en respuesta a la genisteína puede estar mediado por un incremento en la expresión de GPR30 en los miotúbulos.

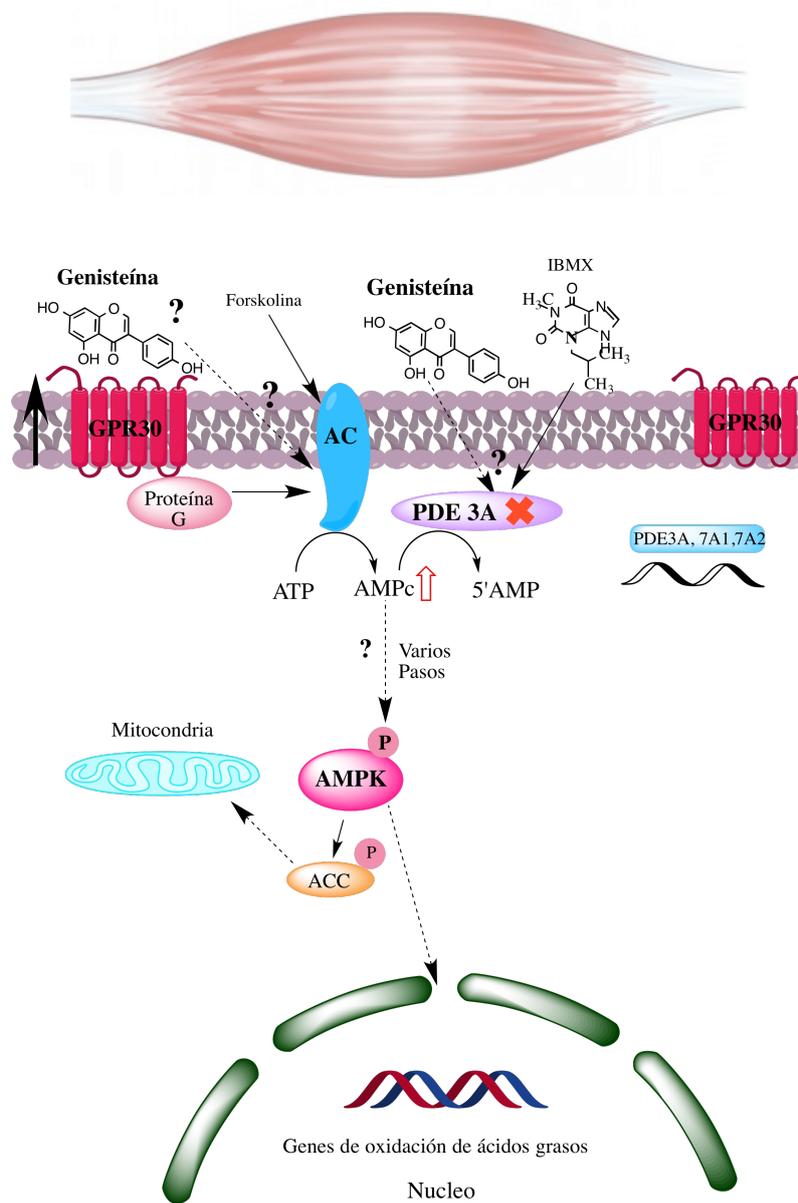


Figura 8.1: Posibles rutas que intervienen en la fosforilación de AMPK en respuesta al estímulo de la genisteína. La inhibición de fosfodiesterasas y la activación de adenilato ciclasa promueven la fosforilación de AMPK lo que implica que el AMPc está involucrado en la ruta. La fosfodiesterasa que podría estar involucrada en este mecanismo es la 3A ya que la fosfodiesterasa 7A1 y 7A2 se expresa solo a nivel de mensajero. La genisteína podría estar promoviendo la activación de AMPK mediante la producción de AMPc ya sea por el incremento en la expresión de el GPR30, ó la inhibición de PDE3A.

# 9

## Bibliografía

- [1] World Health Organization. Global health observatory. [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/), 10 nov 2016.
- [2] World Health Organization. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 10 nov 2016.
- [3] Setchell K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr.*, 68(suppl):1333S–46S, Dec 1998.
- [4] Morton M. S., Arisaka O., Miyake N., Morgan L.D., and B.A. Evans. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *The Journal Of nutrition*, pages 3168–3171, Oct 2002.
- [5] Bhathena S.J. and Velasquez M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Of Clin Nutr.*, 76:1191–1201, Dec 2002.
- [6] Nef S. Cederroth C.R. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol.*, 304(30–42), 2009.
- [7] Magee P.J. and Rowland I.R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr.*, 91:513–531, Apr 2004.

- [8] Zava D.T. and Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer in vitro. *Nutr Cancer.*, 27(1):31–40, 1997.
- [9] Palacios-Gonzalez B., Zarain-Herzberg A., Flores-Galicia I., Noriega L. G., Aleman-Escondrillas G., Zarinan T., Ulloa-Aguirre A., Torres N., and Tovar A. R. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1841(1):132–140, Jan 2014.
- [10] Torre-Villalvazo I., Tovar A. R., Ramos-Barragan V. E., Cerbon-Cervantes M. A., and Torres N. Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J. Nutr.*, 138(3):462–468, Mar 2008.
- [11] Tovar A. R., Torre-Villalvazo I., Ochoa M., Elias A. L., Ortiz V., Aguilar-Salinas C. A., and Torres N. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J. Lipid Res.*, 46(9):1823–1832, Sep 2005.
- [12] Voet D. and Voet J.E. *Biochemistry*, chapter Chapter 27. Metabolism Homeostasis: Regulation of appetite, Energy Expenditure, and Body Weight, pages 1088–1101. John Willis and Sons, Inc, 4th edition edition, 2011.
- [13] Hardie D.G., Ross F. A., and Hawley S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 13:251–262, Mar 2012.
- [14] D.G. Hardie. Signal transduction: How cells sense energy. *Nature*, 472(7342):176–177, Apr 2011.
- [15] Gwinn D. M., Shackelford D. B., Egan D.F., Mihaylova M.M., Mery A., Vazquez D.S., Turk B.E., and Shaw R.J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.*, 30:214–226, Apr 2008.

- [16] Hardie D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8:774–785, Oct 2007.
- [17] Lee K.Y., Kim J.R., and Choi H.C. Genistein-induced LKB1–AMPK activation inhibits senescence of VSMC through autophagy induction. *Vascul Pharmacol.*, 81:75–82, 2016.
- [18] Sakamoto K., McCarthy A., Smith D., Green K.A., Grahame Hardie D., Ashworth A., and Alessi D.R. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.*, 24(10):1810–1820, May 2005.
- [19] Barnes K., Ingram J.C., Porras O.H., Barros L.F., Hudson E.R., Fryer L.G., Foufelle F., Carling D., D.G. Hardie, and Baldwin S.A. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci.*, 15(10):2433–2444, Jun 2002.
- [20] Jager S., Handschin C., St-Pierre J., and Spiegelman B.M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104(29):12017–12022, Jul 2007.
- [21] Hwang C. S., Kwak H. S., Lim H. J., Lee S. H., Kang Y. S., Choe T. B., Hur H. G., and Han K. O. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 101(4-5):246–253, Nov 2006.
- [22] Setchell K.D., Brown N. M., Desai P., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T., Kirschner A.S., Cassidy A., and Heubi J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.*, pages 1362S–1375S, Apr 2001.
- [23] Uifalean A., Schneider S., Ionescu C., Lalk M., and Iuga C. A. Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules.*, 21(1):E13, Dec 2015.

- [24] Russo M., Russo G. L., Daglia M., Kasi P. D., Ravi S., Nabavi S. F., and Nabavi S. M. Understanding genistein in cancer: The good and the bad effects: A review. *Food Chem.*, 196:589–600, Apr 2016.
- [25] Thomas C. and Gustafsson J.A. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.*, 11:597,608, Jul 2011.
- [26] Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., and Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.*, 262(12):5592–5595, Apr 1987.
- [27] Jiang Y., Gong P., Madak-Erdogam Z., Martin T., Jeyakumar M., Carlson K., Khan I., Smillie T.J., Chittiboyina A.G., Rotte S.C., Helferich W.G., Katzenellenbogen J.A., and Katzenellenbogen B.S. Mechanisms enforcing the estrogen receptor beta selectivity of botanical estrogens. *FASEB J.*, 27(11):4406–4418, Nov 2013.
- [28] B. Palacios-Gonzalez. *Mecanismo de activación de AMPK por genisteína independiente del receptor de leptina en la línea celular C2C12*. PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, enero 2014.
- [29] Ghilardi N. and Skoda R.C. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol.*, 11(4):393–399, Apr 1997.
- [30] Kellere M., Koch M., Metzinger E., Mushack J., Capp E., and Haring H.U. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12myotubes via januskinase-2 (JAK-2) and insulinreceptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetología.*, 40:1358–1362, Nov 1997.
- [31] Janovska A., Hatzinikolas G., Staikopoulos V., McInerney J., Mano M., and G.A. Wittert. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol Cell Endocrinol.*, 284:1–10, Mar 2008.
- [32] Salleh N., Ismaila N., Muniandy S., Korla P.K., and Giribabu N. Combinatorial effects of genistein and sex-steroids on the level of cystic fibrosis

transmembrane regulator (CFTR), adenylylate cyclase (AC) and cAMP in the cervix of ovariectomised rats. *Reprod Toxicol.*, 58:194–202, Dec 2015.

- [33] Bender A.T. and Beavo J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.*, 58:488–520, Sep 2006.
- [34] Beavo J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.*, 75:725–748, Oct 1995.
- [35] Park S. J., Ahmad F., Philp A., Baar K., Williams T., Luo H., Ke H., Rehmann H., Taussig R., Brown A. L., Kim M. K., Beaven M. A., Burgin A. B., Manganiello V., and Chung J. H. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.*, 148(3):421–433, Feb 2012.
- [36] Shih C. H., Lin L. H., Lai Y. H., Lai C. Y., Han C. Y., Chen C. M., and Ko W. C. Genistein, a competitive PDE1-4 inhibitor, may bind on high-affinity rolipram binding sites of brain cell membranes and then induce gastrointestinal adverse effects. *Eur J Pharmacol.*, 643(1):113–120, Sep 2010.
- [37] Ronda A. C. and Boland R. L. Intracellular distribution and involvement of GPR30 in the actions of E2 on C2C12 cells. *J Cell Biochem.*, 9999:1–13, Sep 2015.
- [38] Thomas P., Pang Y., Filardo E.J., and Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.*, 146(2):624–632, Feb 2005.
- [39] Prossnitz E.R., Arterburn J.B., and Sklar L.A. GPR30: a g protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.*, 265-266:138–142, Jan 2007.
- [40] Funakoshi T., Yanai A., Shinoda K., Kawano M.M., and Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.*, 346:904–910, Aug 2006.
- [41] Vivacqua A, Bonoffio D., Albanito L., Madeo A, V. Rago, Carpino A., Musti A.M., Picard D., Ando S., and Maggliollini M.  $17\beta$ -estradiol, genistein, and

4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol.*, 70:1414–1423, Jul 2006.

- [42] Maggiolini M., Vivacqua A., Fasanella G., A.G. Recchia, D. Sisci, Pesci V., Montanaro D., A.M. Musti, Picard D., and Ando S. The g protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by  $17\beta$ -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem.*, 279(26):27008–27016, Apr 2004.
- [43] Kim Y.J., Noguchi S., Hayashi Y.K., Tsukahara T., Shimizu T., and Arahata K. The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(a)-binding protein2, interacts with skip and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum Mol Genet.*, 10(11):1129–1139, May 2001.
- [44] Burattini S., Ferri P., Curci R., Luchetti F., and Falcieri E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem.*, 48(3):223–234, Sep 2004.
- [45] Polkowsky K. and Mazurek A.P. Biological properties of genistein, a review of in vivo and in vitro data. *Acta Pol Pharm.*, 57(2):135–155, Apr 2000.
- [46] Lee K.Y., Kim J.R., and Choi H.C. Genistein-induced LKB1–AMPK activation inhibits senescence of vsmc through autophagy induction. *Vascul Pharmacol.*, 81:75–82, Jun 2016.
- [47] Santa Cruz Biotechnology. *3-Isobutyl-1-methylanxthine; Methylisobutylxanthine. Información técnica.*
- [48] Miranda N., Tovar A.R., B., Palacios B., and Torres N. La AMPK como un sensor de energia ceclular y su funcion en el organismo. *Rev Invest Clin.*, 59(6):458–469, 2007.
- [49] Polson J.B. and S.J. Strada. Cyclic nucleotide phosphodiesterase and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 36:403–427, 1996.
- [50] Han P., Zhu X., and Michaeli T. Alternative splicing of the high affinity cAMP-Specific Phosphodiesterase (PDE7A) mRNA in human skeletal muscle and heart. *J Biol Chem.*, 272(26):16152–16157, Jun 1997.

- [51] Lin B.C., Suzawa M., Blind R.D., Tobias S.C., Bulun S.E., Scanlan T.S., and Ingraham H.A. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res.*, 69(13):5415–5423, Jul 2009.
- [52] Thomas P. and Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 102:175–179, Dec 2006.
- [53] Cheng S.B., Quinn J.A., C.T. Graeber, and E.J. Filardo. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-golgi-proteasome pathway. *J Biol Chem.*, 286(25):22441–22455, Jun 2011.