



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

La termogénesis y diferenciación de adipocitos blancos a beige mediada por genisteína involucra la activación transcripcional de elementos de respuesta a cAMP en el promotor de UCP1

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

Rebeca Iris Fuentes Romero

TUTOR PRINCIPAL:

[Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, INCMNSZ](#)

CÓMITE TUTOR:

[Dr. Alejandro Zentella Dehesa, IIB, UNAM](#)

[Dr. Angel Alfonso Zarain Herzberg, FacMed, UNAM](#)

Ciudad de México, 2023



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.

Dedicatoria

A Lily. Tu fuiste mi motor y espero sea un ejemplo de que puedes hacer todo lo que te propongas.

Te amo con toda mi alma

Agradecimientos

Como todas las historias esta está compuesta de temas y cada tema tiene nombres de las personas que siempre saltarán a mi cabeza cuando recuerde “La historia del doctorado”.

El inicio o la ingenuidad: Ari, Lili, Eli, Sayra, Yazmin y Dani, con las que tuve el placer de comenzar este camino de incertidumbre y caos. Que con su amistad y gran corazón me ayudaron a navegar esta primera parte del camino tan tumultuoso. Ustedes son la parte más bonita de este inicio de historia.

El intermedio o la candidatura: Paul, Leo, Rebe, Angie y John. El mejor equipo que uno necesita para estudiar para una candidatura sin morir en el intento. ¿Quién hubiese dicho que estudiar fuese tan divertido? Desde análisis exhaustivos de artículos, a jugar realidad virtual, a escribir ciencia en el tallercito. Ustedes fueron un gran apoyo y no me imaginó que alguien que tenga que hacer esto sin un dream team como el mío.

Hay luz después de todo o la esperanza: Valentín. Acá el nombre quien restauró sobretodo mi confianza en esto de la ciencia. Quien me recordó que puedo hacer esto y que lo sé hacer. Gracias infinitas por tu amistad, enseñanzas y por ser la persona que eres en la ciencia. Y especialmente por tus historias que me hacen reír.

El final ó ¿Por qué no sería un doctorado sin su última cereza de frustración?: Bere, Zuli, Sara, Chio y Bere 2. Porque a lo último se le agregó más intriga, frustración y muchos experimentos finales. Les agradezco todo su empeño, tiempo y amistad en esta última fase. Porque se apropiaron de mi problema como el suyo y me dieron apoyo sin límites, Gracias por

vivir esas últimas frustraciones conmigo, jugar a la pólice, ir por un vinito y hablar bobadas en medio de esa última ola de desperfectos. Lo hizo todo más ligero tenerlas en mi vida.

Toda esta historia no hubiese pasado sin el personaje al que le sucedieron todos los hechos. A mí, y yo no sería nada y no se hubiese escrito esto sin mis padres a quien les debo toda mi persona, mis valores, mi fortaleza, y mi persistencia. Ellos son mi gran ejemplo y apoyo incondicional, que como siempre con su amor, tiempo, consejos y cariño me permitieron seguir el camino. Les agradezco infinito y espero ser para mi hija lo que ustedes son para mí.

Como está pasmado en estas hojas de agradecimiento, esta historia no fue fácil y tomo mucho de mi persona, pero siempre tuve la suerte de que tener a alguien de la mano que no dejo que me rindiera. Thommy te agradezco por ser mi roca y el mejor compañero de esta y todas las historias. Gracias por acompañarme en este viaje, por impulsarme, motivarme, por las asesorías de Excel, estadística y matemáticas, apoyarme y amarme. *Je t'aime à la folie*. Sin ti no lo hubiese logrado.

En esta historia también hay personajes intrínsecos como mis hermanos y mi sobrina Valerita, que con sus ánimos y risas ayudaron este proceso, mi familia cercana y lejana que también me dio muchos ánimos y apoyo. Agradezco también a los que me permitieron el escape de esta historia: Dani (pepito), Cesarito, Lau, Wen, Tona, Adri, Mara y Dani (CCH) que cuando necesitaba escapar ahí tenía su amistad, consejos y risas como siempre.

También agradezco al Dr. Tovar, la Dra. Laura, el Dr. López Casillas y Dr. Zarain y el Dr. Zentella, por sus consejos, y su guía. A los compañeros del lab por formar parte de esta historia.

Abreviaturas

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

ATF2: Factor de transcripción activador 2

BAT: Tejido Adiposo Pardo

BMP7: Proteína morfogenética ósea 7

CD137: Proteína transmembranal tipo 1, de la familia de factor de necrosis tumoral

CREB: Proteína de Unión a los elementos de respuesta a AMPc

C/EBP: Proteínas de unión a CCAAT

DAPI: Diamidino-2-fenilindol

DT2: Diabetes mellitus tipo 2

Ebf2: Factor celular temprano B2

ER β : Receptor de estrógenos beta

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

EWAT: Tejido adiposo blanco epididimal

NE: Norepinefrina

MEM: Medio minimo esencial

Mfy5: Factor Miogénico 5

T3: Triyodotironina

TBX1: Factor de transcripción de T-box

TR β : Receptor de hormona tiroidea β

TSS: Sitio de inicio de transcripción

PBS: Tampón de fosfato salino

p38-MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

PET-CT: Tomografía computarizada por emisión de positrones.

PGC1 α : Coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa1.

PKA: Proteína cinasa A

PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisomales

PPARE: Elementos de respuesta de receptores activados por proliferadores peroxisomales

PRDM16: Proteína 16 con dominio PR

RAR: Receptor de ácido retinoico

RARE: Elementos de respuesta a receptor de ácido retinoico.

RXR: Receptor X Retinoide

scWAT: Tejido adiposo blanco subcutáneo

SDS: poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema Nervioso Parasimpático

SNS: Sistema Nervioso Simpático

SVF: Fase de estroma vascular

TBX1: Factor de Transcripción de T-Box 1

TMEM26: Proteína transmembranal 26

TR: Receptor de hormonas Tiroideas

TRE: Elementos de respuesta a receptor de hormonas tiroideas

TZD: Tiazolidinedionas

IMBX: 3-Isobutil-1 metilxantina

UCP1: Proteína desacoplante-1

UCP2: Proteína desacoplante-2

UCP3: Proteína desacoplante-3

WAT: Tejido Adiposo Blanco

ZFP516: Proteína con anillos de zinc 516

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	1
Resumen	7
1. Marco teórico	10
1.1 Introducción	10
1.2 Origen del tejido adiposo beige	11
1.3 Regulación transcripcional de UCP1	15
1.4 Estímulos inductores de “Browning”	17
2. Antecedentes	19
2.1 La genisteína como inductor de “browning”	19
3. Hipótesis	21
4. Objetivo General	21
4.1 Objetivos Específicos	22
5. Metodología	22
5.1 Ratones	22
5.2 Estudio: Efecto de la genisteína en termoneutralidad	24
5.3 Análisis histológico	24
5.4 Análisis de Western blot	24
5.2 Manipulación de las células 3T3-L1	25
5.3 Diferenciación celular	26
5.4 Ensayo de Mitotracker	26
5.5 Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>Ucp1</i> de ratón <i>Mus musculus</i>	26
5.6 Diseño de construcciones	27
5.7 Secuenciación	28
5.8 Transfección y ensayos de Luciferasa	29
5.9 Mutagénesis dirigida	30
5.10 Extracción de ARN y PCR tiempo real	30
5.11 Inmunoprecipitación de la cromatina (chIP)	31
5.12 Análisis estadístico	33
6. Resultados	33
6.1 La genisteína induce la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos termogénicos.	33
6.2 Administración de genisteína a temperatura ambiente estimula el “browning” en tejido adiposo blanco.	35
6.3 Determinación de los potenciales elementos de respuesta involucrados a genisteína en el promotor de UCP1.	36
6.4 La genisteína estimula el promotor del gen <i>Ucp1</i>	39

6.5 La estimulación del promotor de <i>Ucp1</i> mediante genisteína no ocurre vía el receptor de estrógenos. __	40
6.6 La estimulación de la transcripción del gen <i>Ucp1</i> por genisteína ocurre vía CREB _____	42
6.7 La mutación del sitio de unión CREB -146 pb del gen del promotor de <i>Ucp1</i> anula el efecto de la genisteína. _____	43
6.8 El análisis de inmunoprecipitación de cromatina en células HEK293 confirma que la genisteína activa la transcripción del gen <i>Ucp1</i> vía CREB _____	45
6.9 Inyección intraperitoneal de genisteína aumenta la unión de CREB en tejido adiposo. _____	47
7. Discusión _____	48
8. Conclusiones _____	51
9. Referencias _____	52
Suplementarios _____	56

Resumen

La genisteína es una isoflavona presente en la soya y se considera un compuesto bioactivo debido a su actividad biológica ampliamente descrita. Anteriormente hemos demostrado que la administración intraperitoneal de genisteína y la suplementación dietética activan el programa termogénico en el tejido adiposo blanco subcutáneo (scWAT) de ratas y ratones bajo múltiples estímulos ambientales, como la exposición al frío y la alimentación con una dieta rica en grasas. Sin embargo, hasta ahora no se habían esclarecido los mecanismos de este proceso. La proteína desacoplante 1 (UCP1), un polipéptido de la membrana mitocondrial responsable de disipar la energía en calor, se considera el marcador termogénico más relevante; por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar si la genisteína regula la transcripción de la UCP1. Aquí se demuestra que la administración de genisteína a ratones alojados en condiciones de termoneutralidad conduce a la aparición de marcadores de adipocitos de color beige, incluyendo una fuerte regulación al alza de la abundancia de la proteína UCP1 en el scWAT. Los ensayos con genes reporteros demostraron un aumento de la actividad promotora de *Ucp1* tras la estimulación con genisteína, y los análisis *in silico* revelaron la presencia de elementos de respuesta al estrógeno (ERE) y elementos de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPc) como candidatos putativos de la activación por genisteína. La mutación de elementos de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (CRE), pero no del ERE, redujo la actividad promotora inducida por genisteína en un 51%. Además, los ensayos CHIP *in vitro* e *in vivo* demostraron la unión de la proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB) al promotor de UCP1 tras la administración aguda de genisteína. En conjunto, estos datos aclaran el mecanismo de

inducción de UCP1 mediado por genisteína y confirman sus aplicaciones potenciales en el tratamiento de trastornos metabólicos.

Summary

Genistein is an isoflavone present in soybeans and is considered a bioactive compound due to its widely reported biological activity. We have previously shown that intraperitoneal administration and diet supplementation of genistein activates the thermogenic program in rats and mice subcutaneous white adipose tissue (scWAT) under multiple environmental cues, including cold exposure and high-fat feeding. However, the mechanistic insights of this process were not previously unveiled. Uncoupling protein 1 (UCP1), a mitochondrial membrane polypeptide responsible for dissipating energy into heat, is considered the most relevant thermogenic marker; thus, we aimed to evaluate whether genistein regulates UCP1 transcription. Here we show that genistein administration to thermoneutral-housed mice leads to the appearance of beige adipocyte markers, including a sharp upregulation of the UCP1 protein abundance in scWAT. Reporter gene assays showed an increase in *Ucp1* promoter activity after genistein stimulation, and *in silico* analysis revealed the presence of estrogen (ERE) and cAMP (CRE) response elements as putative candidates of genistein activation. Mutation of the CRE but not the ERE reduced genistein-induced promoter activity by 51%. Additionally, *in vitro* and *in vivo* ChIP assays demonstrated the binding of CREB to the UCP1 promoter after acute genistein administration. Taken together, these data elucidate the mechanism of genistein-mediated UCP1 induction and confirm its potential applications in managing metabolic disorders.

1.Marco teórico

1.1 Introducción

La obesidad a lo largo de los años ha tenido un dramático aumento, convirtiéndose en un problema de salud mundial. Dicha patología conlleva al desarrollo de otras condiciones metabólicas entre ellas: resistencia a la insulina, dislipidemia, aterosclerosis y diabetes tipo 2 (DT2). Ciertamente, se publicó que el 90% de los casos de DT2 están asociados con obesidad (Ohlson et al., 1985). Esto ha llevado a varios investigadores a estudiar los mecanismos para la prevención de ésta enfermedad (Schrauwen, van Marken Lichtenbelt, & Spiegelman, 2015).

Dado que la obesidad es una acumulación en la cantidad de tejido adiposo, el estudio de éste se mantiene en auge. Hasta hace 50 años solo se conocían dos tipos celulares de tejido adiposo en humano: el tejido adiposo blanco (WAT, White Adipose Tissue, por sus siglas en inglés) el cual está involucrado principalmente en el almacenamiento de energía a través de la acumulación de triglicéridos en la vesícula lipídica, y se divide en tejido adiposo subcutáneo y tejido adiposo visceral; particularmente este último juega un papel importante en la obesidad mediante la secreción de numerosas sustancias bioactivas conocidas como adipocinas que contribuyen a la inflamación y al desarrollo del síndrome metabólico (Dempersmier et al., 2015), y el tejido adiposo pardo (BAT, Brown Adipose Tissue, por sus siglas en inglés) que se especializa en mantener la temperatura corporal en mamíferos, debido a su cantidad importante de mitocondrias. Este tipo celular se encarga principalmente de la conversión de la energía para generar calor mediante la proteína desacoplante 1 (UCP1), un polipéptido que reside en la membrana interna de la mitocondria. Su activación, disipa el gradiente de protones de la cadena transportadora de electrones; lo cual induce una fuga de los mismos reduciendo el potencial de

membrana mitocondrial, resultando en altos niveles de oxidación de sustratos y generación de calor (Cannon & Nedergaard, 2004);(Lowell & Spiegelman, 2000).

En 2009, un estudio retrospectivo, reveló la presencia de adipocitos pardos funcionales en áreas supraclaviculares de humanos adultos, por medio de tomografía computarizada (PET-CT). Estos adipocitos eran los mismos presentes en animales mamíferos con necesidades termogénicas, como por ejemplo los osos. Posteriormente, se descubrió la presencia de adipocitos semejantes a los adipocitos pardos en el tejido adiposo blanco, y a este tipo celular se le llamó tejido adiposo beige. Estos adipocitos se encuentran intercalados en el tejido adiposo blanco subcutáneo y la diferenciación de precursores de adipocitos a adipocitos beige conlleva a un proceso altamente inducible llamado “beiging” o “browning” (Cypess et al., 2009).

Al tener el mismo perfil metabólico que BAT, los adipocitos beige presentan altas tasas de oxidación de sustratos que contribuyen eficazmente a la disipación de energía a través de la termogénesis adaptativa (Schrauwen et al., 2015). Esta actividad termogénica se ha demostrado que tiene efectos para prevenir el desarrollo de obesidad y de algunas de sus alteraciones como DT2 (Cederberg et al., 2001). Por tanto se ha dado un énfasis especial al estudio de este tipo celular y de los circuitos moleculares que promueven el “browning” como un objetivo para nuevas oportunidades terapéuticas (Kajimura, Spiegelman, & Seale, 2015).

1.2 Origen del tejido adiposo beige

A pesar de tener la misma capacidad para producir termogénesis, el tejido adiposo pardo y beige poseen varias características que deben ser consideradas para distinguirlos como distintos tipos

celulares. Los estudios de análisis inmunohistoquímicos han revelado que el tejido adiposo beige deriva de células somáticas precursoras diferentes al factor miogénico 5 negativo (Mfy5; Miogenic factor 5, por sus siglas en inglés), las cuales dan lugar a tejido adiposo pardo y al músculo (Harms & Seale, 2013). Posteriormente, la expresión del factor factor celular temprano B2 (Ebf2; Early transcription factor 2, por sus siglas en inglés) actúa como un marcador específico en los preadipocitos para dirigir el destino celular hacia adipocitos pardos (Kajimura, 2015). Se ha propuesto que la proteína morfogenética ósea 7 (BMP7; Bone morphogenetic protein 7, por sus siglas en inglés) pudiese ser el inductor del Ebf2, ya que su ausencia resulta en una carencia completa de tejido adiposo pardo (Schulz et al., 2013). Ya que los adipocitos pardos y el músculo esquelético derivan del mismo origen somático, se reconocen la presencia de diferentes factores que son marcadores del destino celular hacia BAT, como son: proteína 16 con dominio PR (PRDM16), proteínas de unión a CCAAT (C/EBP) y proteína con anillos de zinc 516 (ZFP516) (Dempersmier et al., 2015).

En el caso de los adipocitos beige, su diferenciación aún no se dilucidado completamente. Se sabe que existen diferentes estímulos externos que inducen su diferenciación, de los cuales se abordaran algunos más adelante. En cuanto a su diferenciación existe controversia en si los adipocitos derivan de WAT a través de un proceso de transdiferenciación, o si derivan *de novo* a partir de la maduración de precursores (Harms & Seale, 2013 & Cinti et al., 2002). Se sugería que había inducción de células de tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige en respuesta a un estímulo. Sin embargo, otros estudios han mostrado que los adipocitos beige del tejido adiposo subcutáneo provienen de células precursoras (Frontini & Cinti, 2010). El estímulo al cual están expuestos los adipocitos beige es reversible y determina su fenotipo, ya que se ha visto que

cuando son expuestos a calor pierden su fenotipo pardo y presenta características de tipo WAT nuevamente, este proceso es llamado “whitening”. (Figura 1)(Kajimura, 2015).

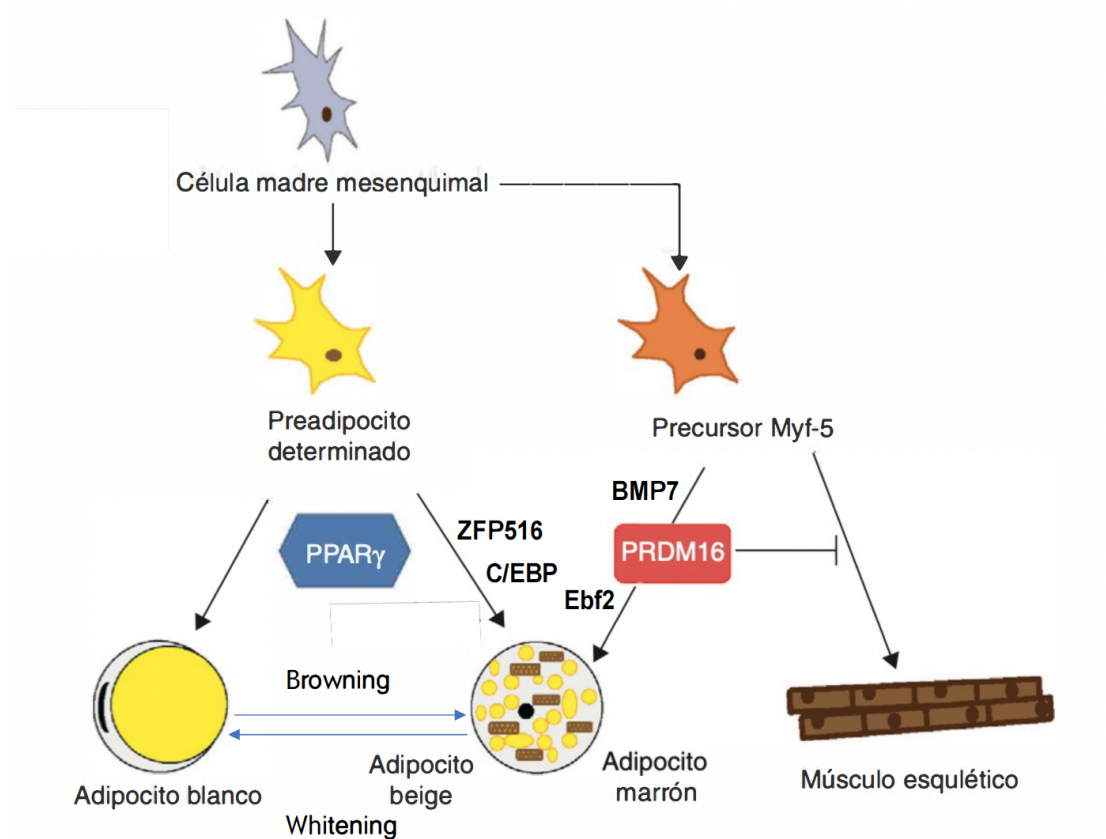


Figura 1. Orígenes de adipocitos blanco, pardo y beige. Precursores de adipocitos pardos y beige. El fenotipo beige puede ser reversible a blanco al eliminar el estímulo inductor de beiging. (Myf5, factor miogénico 5 negativo), (BMP7, proteína morfogenética ósea 7), (PRDM16, proteína 16 con dominio PR), (Ebf2, factor celular temprano B2), (ZFP516, proteína con anillos de zinc 516), (PPAR γ , receptor activado por proliferadores de peroxisomas), (C/EBP, proteínas de unión a CCAAT). (Figura modificada de Esteve R, 2013).

Para poder distinguir a los adipocitos beige existen marcadores específicos que se expresan en la superficie celular como son el Cd137 (Proteína transmembranal tipo 1, de la familia de factor de necrosis tumoral) y la proteína transmembranal 26 (TMEM26, así como caja T1 (TBX1). De igual

manera se expresan en este tipo celular: UCP1, el coactivador del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PGC-1 α) y PRDM16, hay que tomar en cuenta que últimas tres proteínas también son marcadores de tejido pardo (Wu et al., 2012).

De todos estos marcadores, UCP1 es fisiológicamente el más relevante y está relacionado con los efectos metabólicos, ya que presenta funciones adicionales a la termorregulación. Se sabe existen dos homologos de UCP1: Proteína desacoplante 2 (UCP2) y proteína desacoplante 3 (UCP3). Ambos son 56% idénticos a UCP1. Su diferencia radica en su localización, ya que UCP2 está expresado en varios tejidos, mientras que UCP3 se encuentra predominantemente expresado en el músculo esquelético. Los tres polipeptidos se encuentran expresados en tejido adiposo pardo, pero UCP1 constituye 10% de la proteína de la membrana mitocondrial, en contraste a UCP2 y UCP3 que constituyen solamente el 0.1% de la proteína de membrana. La función de estos homologos con respecto a termogénesis y regulación mitocondrial del metabolismo energético, se mantiene incierta (Fleury et al., 1997), en contraste con UCP1 la cual ha sido ampliamente estudiada por su papel que juega en la termogénesis adaptativa.

La importancia de UCP1 ha sido bien establecida en relación con el desarrollo de obesidad en un estudio donde se utilizaron ratones knockout para UCP1. Los ratones carentes de UCP1 mostraron mayor susceptibilidad a una obesidad inducida por dieta (Keipert, 2020). Y su sobreexpresión indujo en ratones un perfil más delgado y estos animales fueron más sensibles a la insulina (Kozak & Anunciado-Koza, 2008). De manera similar en los seres humanos, un polimorfismo que reduce la expresión de *Ucp1* está ligado a la obesidad y un incremento en la expresión de *Ucp1*, específicamente en el tejido adiposo subcutáneo, se asocia con una mejor

tolerancia a la glucosa en personas obesas (Sramkova et al., 2007).

1.3 Regulación transcripcional de UCP1

El estudio del promotor del gene que codifica para UCP1 y su expresión en tejido adiposo pardo/beige es de especial interés porque es el único tejido en mamíferos que funciona exclusivamente como órgano termogénico (Lowell & Spiegelman, 2000). El promotor del gen *Ucp1* contiene varios elementos-cis que son blanco de varios factores de transcripción que se han visto son críticos para la adipogénesis de tejido adiposo blanco y pardo. (Hirsch, 1997).

Estudios del promotor de *Ucp1* han identificado un segmento potenciador de 220 pares de bases localizado aproximadamente 2.9 kilobases río arriba. Dicho segmento potenciador tiene sitios de unión para el receptor de hormona tiroidea (TR), el receptor de ácido retinoide (RAR) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR; por sus siglas en inglés). La isoforma gamma del PPAR y su unión al promotor es esencial para la función del potenciador de *Ucp1* (Sears MacGinnitie, Kovacs, & Graves, 1996). Se ha observado que PPAR γ puede activar *Ucp1* solamente en los adipocitos pardos, indicando que éste puede actuar como componente clave en la respuesta termogénica. Una regulación mediada por PPAR γ , se comprueba al administrar ligandos de éste como es la tiazolidinediona (TZD) en adipocitos pardos, los cuales activa el programa termogénico. El coactivador de PPAR γ conocido como PGC-1 alfa se le puede unir a una variedad de receptores nucleares incluyendo al RXR y TR e igualmente regular la expresión de *Ucp1*. (Lowell & Spiegelman, 2000) (**Figura 2**).

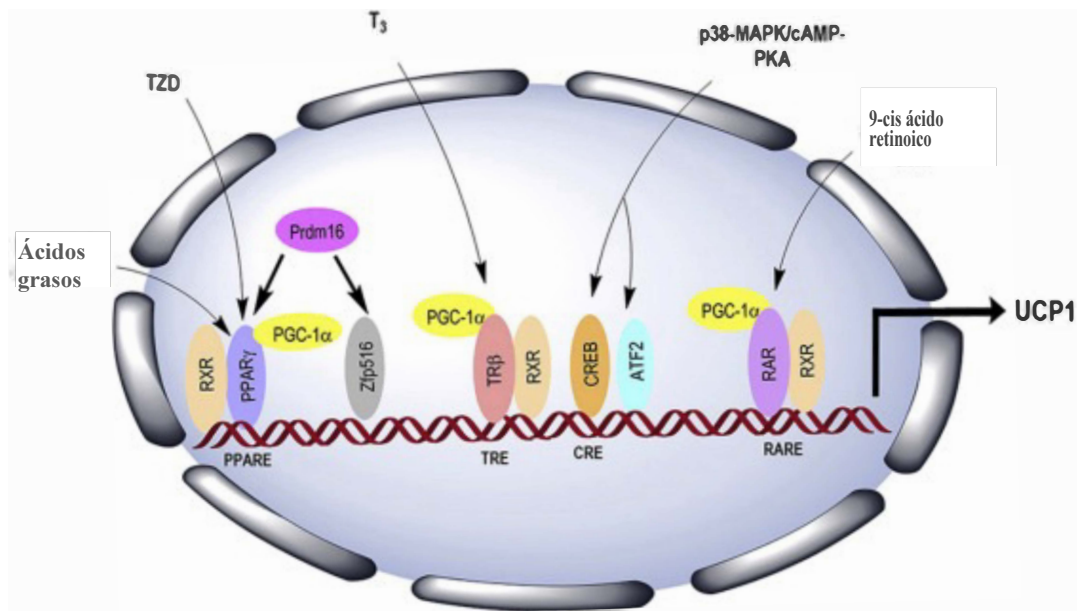


Figura 2. Factores de transcripción y estímulos que activan la transcripción de *Ucp1*. (TZD, tiazolidenediona), (T₃, triyodotironina), (p38-MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos), (cAMP, adenosín monofosfato cíclico), (PKA, proteína cinasa A), (PRDM16, proteína 16 con dominio PR), (RXR, elementos de respuesta receptor retinoide), (PPAR γ , receptores activados por proliferadores peroxisomales), (PGC1 α , coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa1), (Zfp516, proteína con anillos de zinc 516), (TR β , receptor de hormona tiroidea β), (CREB, proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), (ATF2, factor de transcripción activador 2), (RAR, receptor de ácido retinoico) (Figura tomada de Vargas-Castillo, et al., 2017)

Otro elemento de respuesta que se encuentra en la región potenciadora es el elemento de respuesta para adenosín monofosfato cíclico (CRE), del cual existen en la parte distal de potenciador y en el promotor proximal (Kozak et al., 1994). Efectivamente se ha visto que la adición de AMPc, así como la activación constitutiva de la proteína cinasa A (PKA) pueden inducir *Ucp1* en el tejido adiposo pardo (Sims & Danforth, 1987). La regulación transcripcional del gen *Ucp1* es también controlada por diferentes estímulos externos como por ejemplo el frío, o por medio de ciertos compuestos que activen cascadas de señalización que finalmente activan su transcripción (Fenzl, 2014). Una pregunta fundamental es conocer cómo algunos fármacos o

compuestos bioactivos pueden activar y modular la inducción de la diferenciación de adipocitos beige para activar el programa de termogénesis, incluyendo a *Ucp1*.

1.4 Estímulos inductores de “Browning”

La termogénesis en BAT está regulada por el Sistema Nervioso Central (SNC), el cual a su vez ejerce señales a la periferia por el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP) (Sternberg, Silverman, & Cizza, 2007). Se sabe que el tejido adiposo se encuentra inervado por el SNS, el cual se encarga de regular el crecimiento de BAT, así como su función termogénica.

La exposición al frío es detectada por el cerebro, lo que activa al SNS (aumento del tono simpático) promoviendo la liberación de catecolaminas como la norepinefrina (NE), las cuales son interactúan con la célula por medio de receptores β eta-adrenérgicos, y como se ve en la **Figura 3** inician cascadas de señalización que incrementan la transcripción de genes termogénicos y a su vez a genes de proliferación y diferenciación de células precursoras de adipocitos (Young, Saville, Rothwell, Stock, & Landsberg, 1982). Efectivamente, el mayor estímulo de “browning” estudiado a la fecha es el frío.

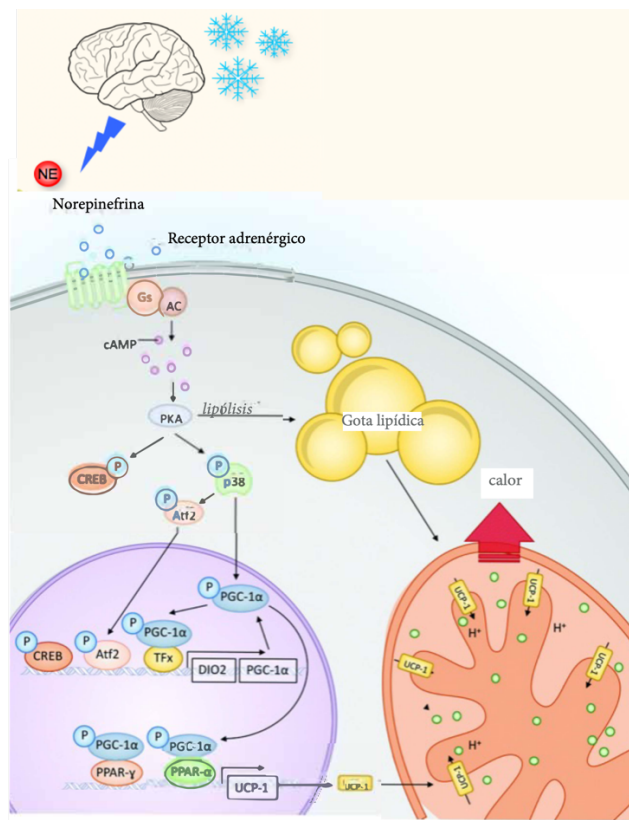


Figura 3. La norepinefrina entra a la célula por medio del receptor β 3-adrenérgico, acoplado a proteínas G que inician cascadas de señalización que finaliza en la transcripción de *Ucp1*. La activación de la transcripción de UCP1 finaliza en la formación de calor por la disipación de protones en la mitocondria (AC, adenilato ciclasa), (cAMP, adenosín monofosfato cíclico), (PKA, proteína cinasa A), (CREB, proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), (ATF2, factor de transcripción activador 2), (p38-MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos), (PGC1 α , coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa1), (PPAR γ , receptores activados por proliferadores peroxosimales gamma), ((PPAR α , receptores activados por proliferadores peroxosimales alfa), (DIO2, diodina tipo2), (TFx, factor de transcripción). (Figura modificada de Wang, 2019).

Adicionalmente al frío, otros factores han sido identificados como inductores del programa termogénico. Dentro de estos hay reguladores transcripcionales, factores endocrinos como la irisina, los cuales actúan de manera endógena. Existen también estímulos externos como sustancias farmacológicas como “simpatomiméticos”, factores ambientales (Harms & Seale,

2013) y factores alimenticios. Estos últimos tienen una importante participación dado que se sabe la dieta es un factor clave que puede modificar la bioquímica molecular de los adipocitos.

2. Antecedentes

2.1 La genisteína como inductor de “browning”

Dentro de los factores alimenticios que favorecen el proceso de “browning” en el tejido adiposo blanco esta la proteína de soya y de manera particular la genisteína (isoflavona de la soya). Se ha demostrado que la proteína de soya y la genisteína podrían activar el programa termogénico, ya que en estudios previos del laboratorio se observó que el consumo proteína de soya protegía a animales de obesidad inducida por dieta, al regular los factores de transcripción relacionados con el metabolismo de lípidos. Esta mejora era acompañada de un aumento de *Ucp1* (Torre-Villalvazo, Tovar, Ramos-Barragan, Cerbon-Cervantes, & Torres, 2008). De manera particular, se ha demostrado que la ingesta de genisteína, que es la principal isoflavona de la soya (metabolito secundario vegetal), disminuye la adiposidad (Kim et al., 2010). Y que está podría jugar un papel importante en el metabolismo de lípidos (Palacios-Gonzalez et al., 2019).

Reforzando esta idea, se ha observado que una administración intraperitoneal de genisteína durante 4 días en ratas sanas de la cepa Wistar, tiene un efecto en tejido adiposo. Indicando que esta isoflavona estimula la expresión de genes de la biogénesis mitocondrial y termogénesis, del coactivador de receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa1 (*Pgc1 α*) y *Ucp1* sugiriendo que la genisteína podría inducir “browning” (Palacios-Gonzalez et al., 2019). De igual

manera, se observó que la genisteína incrementa la abundancia de uno de los principales marcadores de adipocitos beige, el TBX1 en el tejido adiposo blanco subcutáneo (**Figura 4**). (Palacios-Gonzalez et al., 2019).

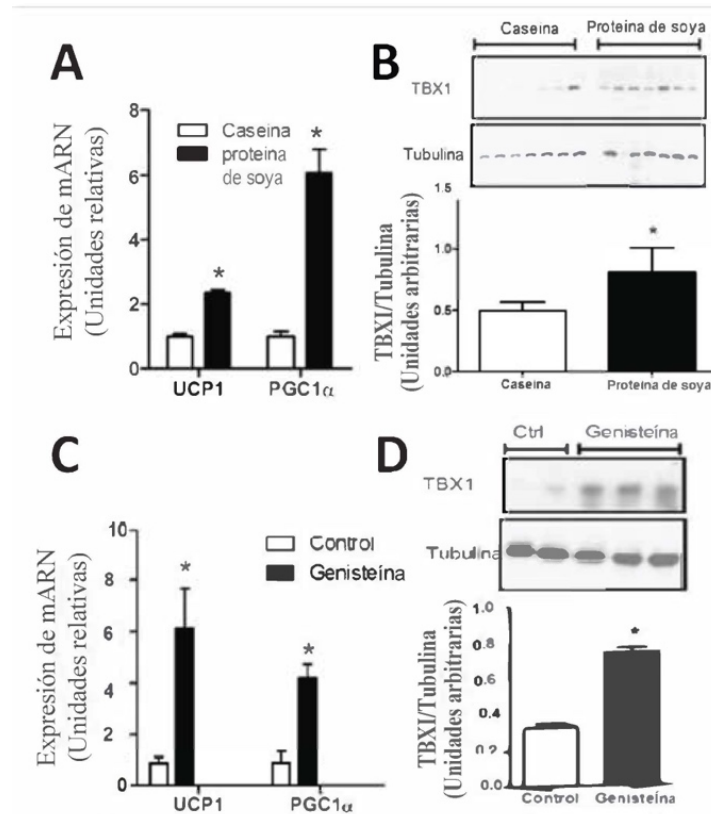


Figura 4. Efecto de la proteína de soja y la genisteína sobre la expresión de marcadores de adipocitos beige en tejido adiposo blanco. **(A)** Contenido de ARNm de *Ucp1* y *Pgc1 α* y **(B)** abundancia de la proteína TBX1 en tejido adiposo blanco de ratas Zucker (fa/fa) alimentadas con caseína o proteína de soja. **(C)** Contenido de mRNA de *Ucp1* y *Pgc1 α* y **(D)** abundancia de la proteína TBX1 en tejido adiposo blanco de ratas sanas de la cepa Wistar inyectadas con genisteína durante 4 días. Los resultados se muestran como las medias \pm S.E. (n = 4/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos (p < 0.05) (Figura editada de Palacios-González, 2019).

Adicionalmente, otros estudios previos describen que la genisteína es capaz de incrementar las concentraciones intracelulares de AMPc en el músculo y el tejido adiposo (Palacios-Gonzalez et

al., 2019, & 2014). La activación de esta vía por la genisteína podría dar lugar a la fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) y activación de proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) como se ha observa en la **Figura 5** y subsecuentemente podría activar al factor de transcripción o proteína de unión a los elementos de respuesta a AMPc (CREB) que se conoce están presentes en el promotor de *Ucp1*. Sin embargo, todavía no se conoce claramente el proceso de la activación y la inducción del programa termogénico en el tejido adiposo blanco por medio de la genisteína.

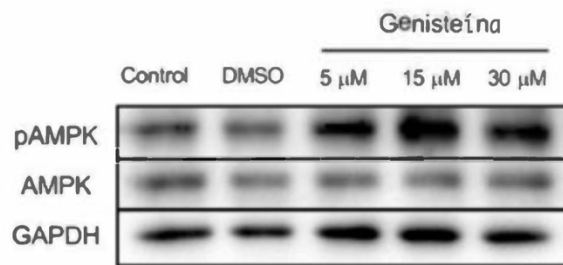


Figura 5. Fosforilación de AMPK en respuesta a la genisteína, concentración 5, 15 y 30 μM . Inmunoblot de adipocitos derivados de fase estromal vascular (SVF) que fueron expuestos 7 días a diferentes concentraciones de genisteína. (DMSO, dimetilsulfóxido), (AMPK, proteína cinasa activada por AMP), (GAPDH, gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa). (Figura tomada de Palacios-González B, 2019)

3. Hipótesis

La genisteína induce la activación de un complejo transcripcional, aumentando la expresión de *Ucp1* permitiendo la inducción al fenotipo termogénico del tejido adiposo *in vitro* e *in vivo*

4. Objetivo General

Identificar los posibles factores de transcripción involucrados en la regulación de *Ucp1*, en

respuesta a genisteína *in vitro* e *in vivo*.

4.1 Objetivos Específicos

In vivo

- Determinar la capacidad de genisteína de inducir “browning” en termoneutralidad.
- Determinar los factores de transcripción que regulan la transcripción de *Ucp1* mediante estímulo de genisteína, *in vivo*.

In vitro

- Demostrar la capacidad de la genisteína para inducir el “browning” directamente.
- Identificar los potenciales factores de transcripción involucrados en la regulación de *Ucp1*.
- Determinar los factores de transcripción que regulan la transcripción de *Ucp1* mediante estímulo de genisteína, *in vitro*.

5. Metodología

5.1 Ratones

Los protocolos y procedimientos descritos en esta sección fueron aprobados por el comité del cuidado de los animales del Instituto de Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, CICUAL 1900, de la Ciudad de México. Para el estudio, ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de peso 20-25 gramos fueron mantenidos en cajas en un ciclo luz-obscuridad de 12h. Para evaluar el efecto de

la genisteína en la expresión de UCP1, los ratones estuvieron expuestos a una temperatura de 30°C (a lo que nos referiremos como termoneutralidad) por 8 días con 5 días de aclimatación. Posteriormente 5 días consecutivos se les administró un tratamiento intraperitoneal de genisteína para evitar la expresión de UCP1 inducido por el estímulo de la temperatura. Durante el estudio los animales fueron alimentados con dieta control (**Tabla1**) de acuerdo con el Instituto Americano de Nutrición. El consumo de alimento fue medido dos veces a la semana, así como la ganancia de peso fue evaluada al final del periodo de aclimatación y después del tratamiento de genisteína.

Tabla 1. Composición de la dieta control AIN-93.

Ingredientes	Control (%)
L-Cystina	0.3
Birtartrato de Colina	0.25
Mix de vitamina	1
Fibra	5
Mix de Minerales	3.5
Aceite de soya	7
Maícena	39.74
Pan dextrinado	13.2
Sucarosa	10
Caseína	20
Manteca de cerdo	0
TBHQ	0.0014
TOTAL	99.99
TBHQ:Terbutilhidroquinona	

5.2 Estudio: Efecto de la genisteína en termoneutralidad

Después del periodo de aclimatación, los ratones fueron asignados aleatoriamente en dos diferentes grupos, el primer grupo recibió una inyección intraperitoneal con genisteína (Enzo life Sciences, Farmingdale, Nueva York, EUA) a una dosis de 40/mg/kg/día, dosis con efecto en la inducción de adipocitos termogénicos previamente utilizada en (Palacios-González B, 2019). El segundo grupo recibió una inyección con el vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO; Millipore sigma, Burlington, Massachussets, EUA). Este procedimiento se llevó a cabo por 5 días. En el día 5 de la inyección intraperitoneal los ratones fueron eutanizados. Las muestras de tejido adiposo subcutáneo (scWAT) y de tejido adiposo epididimal (eWAT) fueron pesados, una fracción del tejido fue utilizado para análisis histológico y el tejido remanente fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C.

5.3 Análisis histológico

El tejido adiposo fue fijado durante la noche en formalina al 10%, para una deshidratación posterior, fueron limpiados con xilenos e incorporadas en parafina. Los tejidos fueron seccionados (4 μ m) y teñidos con hematoxilina y eosina, fueron visualizados en microscopio 40X.

5.4 Análisis de Western blot

Se utilizaron extractos de scWAT y eWAT fueron homogenizados en amortiguador RIPA (preparado con amortiguador PBS), SDS, deoxicolato de sodio, azida de sodio P-40 (NP-40), e inhibidores de proteasas y fosfatasa. (Roche Diagnostics, Basel, Suiza). La proteína total fue

obtenida por centrifugación a 17784g por 20 minutos y se cuantificaron por fluorimetría (Qbit 4, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Las proteínas fueron separadas en un gel de electroforesis- SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, EUA). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos específicos contra UCP1 (Abcam ab10983, Cambridge, Reino Unido), PGC1 α (Santa cruz sc-13067, Dallas, Texas, EUA) y TBX1 (Abcam ab109313), fueron revelados usando un anticuerpo secundario (Abcam ab205718), . El anticuerpo anti-GAPDH (Abcam ab181602) fue utilizado como un control de carga. Las bandas fueron detectadas usando Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore Sigma). La quimioluminiscencia se digitalizó usando el sistema de imagen del equipo ChemiDoc MP (Bio Rad Laboratories) y analizados mediante el software de procesamiento de imagen ImageJ 1.51 (100) 2015.

5.2 Manipulación de las células 3T3-L1

Se crecieron células de la línea celular 3T3-L1 de (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EUA). Las células se mantuvieron en flask de 75 cm² con medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido en glucosa marca (Gibco, Billings, Montana, EUA) más suero fetal bovino (SFB) al 10%y antibiótico, antimicótico al 1%. Se multiplicaron las células dejándolas crecer a una confluencia del 80%. A este punto se les agregó tripsina-EDTA al 5%, está se inactivó con PBS al 1%. Se recolectaron las células y centrifugaron por 4 min a 138g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de DMEM. Se realizó el conteo y se sembraron en los siguientes matraces.

5.3 Diferenciación celular

A partir de un pase celular joven de células 3T3-L1, se sembraron células en placas de 6 pocillos, cada uno con 5,0000 células por pozo aproximadamente. Cuando las células alcanzaron la confluencia del 70-80%, se indujo su diferenciación con IBMX (0.5mM), dexametasona (1 μ M) e insulina (1 μ M) (Medio de diferenciación). El medio fue intercambiado al tercer día por el medio de maduración (medio Eagle modificado de Dulbecco, DMEM alta glucosa + insulina) adicionándoles estímulos con genisteína a diferentes concentraciones (60, 30, 15 y 5 μ M). Se mantuvo un control positivo con triyodotironina (T3) y pioglitazona, así como un control negativo con DMSO. Las células se mantuvieron bajo este tratamiento hasta su maduración. Al finalizar la diferenciación las células fueron tripsinizadas y separadas para tratamiento con mitotracker o bien extracción de ácido ribonucleico (ARN).

5.4 Ensayo de Mitotracker

Posterior a la diferenciación celular las células se tripsinizaron y centrifugaron a 138g y fueron re-sembradas en una nueva placa. Se incubaron con mitotracker (100 nM) por 30 min, y se lavaron con PBS. Dos días después las células fueron examinadas bajo el microscopio de luz y las imágenes fueron capturadas usando un ocular de ampliación 10X.

5.5 Análisis *in silico* del promotor de *Ucp1* de ratón *Mus musculus*

Para analizar los posibles elementos de respuesta del promotor de *Ucp1* que podrían ser activados por la genisteína, se buscó la secuencia del promotor de *Ucp1* en NCBI, considerando el sitio de inicio transcripcional (identificado en L. P. Kozak, Britton, Kozak, & Wells, 1988) y se

tomaron -2999 pb rio arriba. Posterior a esto se analizó dicha secuencia en la base de datos MatInspector (www.genomatix.de/matinspector.html), para identificar los elementos de respuesta presentes en el promotor. Se seleccionaron los elementos de respuesta putativos que tuvieran un puntaje de similitud por arriba de 0.75. Por consiguiente, se diseñaron 5 fragmentos dentro de los cuales cada uno tuviera uno de los posibles elementos de respuesta involucrados en respuesta a genisteína, para una posterior evaluación de la funcionalidad con un ensayo de luciferasa.

5.6 Diseño de construcciones

Se diseñaron los “primers”, que contienen los sitios de restricción de las enzimas Kpn I y XhoI (Roche, Indianápolis, EUA), los cuales amplificaron los fragmentos por reacción en cadena de polimerasa (PCR) (**Tabla 2**). Para poder determinar la temperatura de amplificación del fragmento, se hizo un PCR de gradiente de temperatura. Se establecieron las temperaturas óptimas de cada fragmento. El vector pGL3 se digirió con enzimas de restricción y se trató con fosfatasa alcalina. Los productos de la PCR se clonaron en el Pjet2.1, siguiendo las instrucciones del estuche (CloneJet PCR cloning, Agilent, Santa Clara, California, EUA). Una vez purificados los plásmidos pJet que contenían los fragmentos, se procedió a la subclonación con el vector pGL3. La ligación de los fragmentos con el vector se realizó con la enzima T4 (Invitrogen, Waltham, Massachussets, EUA). La transformación se llevó a cabo por choque térmico. Cuando las colonias crecieron, se obtuvieron plásmidos mediante miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania). Se confirmó la presencia de fragmentos por medio de una digestión enzimática con KpnI y XhoI. Posteriormente se verificó la presencia del fragmento por medio de la secuenciación.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados en este proyecto.

Nombre del Plásmido	Oligonucleotidos (5'-3')
Oligonucleotidos usado en la generación de los constructos del promotor	
F1 -9 forward	GGGTACCCCGCAATCTGGGCTTAAC
F2 -260 forward	GGGTACCCGAGTGACAAAAGGCACCA
F3 -551 forward	GGGTACCCAGTTTTTGCATGGATTCCC
F4 -689 forward	CCGGGGTACCTATTCAAAGGAGCAAGGG
F5 -2999 forward	GGGTACCCATGCCAATTTATAGTGCCGTC
Rvs- reverse	CCTCGAGGGGCG TGAGTGCAAGAA
Oligo nucleótidos para la mutación del promotor (5'-3')	
mutERE1f	GTGCATCGTGTGGTCACTTaTAGTTGGGCG
mutERE1r	CGCCCAACTAtAAGTGACCACACGATGCAC
mutERE2f	CTATATAGATCTCCCAAtGaCAGGGCGCAGAAGTGC
mutERE2r	GCACTTCTGCGCCCTGtCaTGGGAGATCTATATAG
mutCREf	GGCTTTGGGAGTgtGCGCGGCTGGGAGGCTTG
mutCREr	GCCGCGCcaCACTCCCAAAGCCCTGGCCAC
Oligonucleótidos para secuenciar (5'-3')	
Rvprimer 3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
Glprimer 2	GGAAGACGCCAAAACATAAAG

(ERE; elemento de respuesta a estrógenos), CRE (elementos de respuesta a AMPc)

5.7 Secuenciación

Con el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las colonias cultivadas, se utilizó el estuche de secuenciación "DTCS" (Beckman Coulter, Brea, California, EUA) para analizar los productos de la PCR. A continuación, se purificaron por medio de las instrucciones recomendadas por el estuche y se secuenciaron con el estuche Ceq 8800 de Beckman Coulter, utilizando los "primers" de los vectores RV3 y GL2 (**Tabla 2**).

5.8 Transfección y ensayos de Luciferasa

Para una transfección exitosa se utilizó la línea celular Hek293. Las células cultivadas se mantuvieron en un flask de 75 cm² con Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM; Gibco), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y un 1% de antibiótico/antifúngico. Una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, las células se trataron con tripsina-EDTA al 5%, que luego se inactivó con PBS al 1%. Se recolectaron las células y se sembraron en cajas de 12 pozos a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo en 1 ml de medio. Al estar las células de nuevo a una confluencia del 80% se hizo una transfección transitoria de los plásmidos UCP1-luc (750 ng) o el vehículo vacío (pGL3b, Promega, Madison, Wisconsin, EUA) utilizando Lipofectamina 2000 (proporción 1:3 de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Cinco horas después de la transfección se agregó el estímulo de genisteína 15 μ M o su vehículo. Las células se lisaron 24 horas después con 250 μ l de amortiguador de lisis pasiva 5X. Se midió la actividad de luciferasa con el sobrenadante obtenido con el amortiguador de lisis de las células transfectadas. Se midió la actividad como unidades relativas de luz con un Luminómetro BD Monolight 3010C (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, EUA). Se normalizó con proteína total cuantificadas por el método de Lowry. Para conocer el porcentaje de transfección se realizó previamente una cotransfección con la proteína verde fluorescente (GFP) junto con la construcción completa (-2999 pb), los núcleos de las células se tiñeron con DAPI a las 24 horas y posteriormente se analizaron con el software del equipo cytation (Biotek, Winooski, Vermont, EUA). Se hizo la cuantificación y calculó la eficiencia. Se obtuvo el número de células que contenían el verde fluorescente y se normalizó con el número de células totales. Como se observa

en la **Figura 6**, los núcleos están teñidos de azul y de verde se visualiza el GFP.

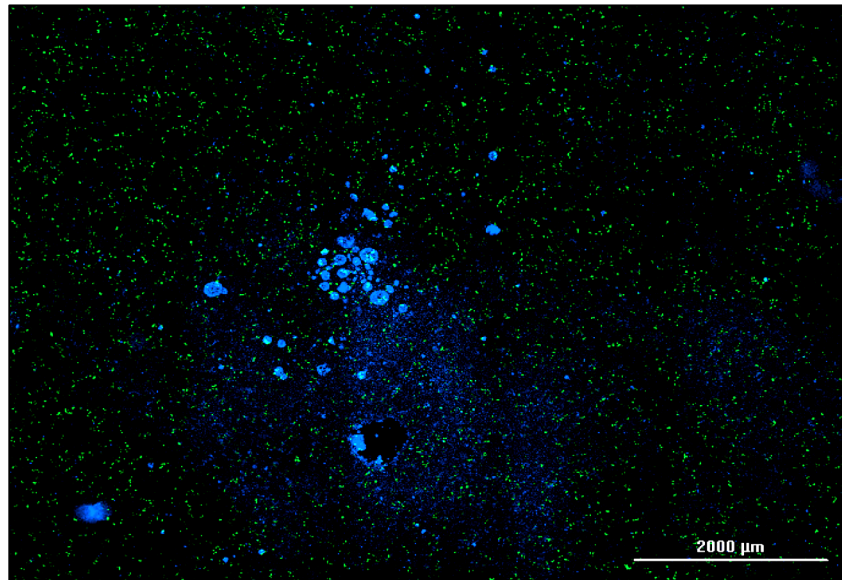


Figura 6. Eficiencia de transfección. Células Hek293 cotransfectadas con plásmido del promotor completo de UCP1 (-2999pb) y la proteína verde fluorescente (GFP) con una proporción 1:3 de lipofectamina 2000. La eficiencia calculada por el software es de 43%.

5.9 Mutagénesis dirigida

Utilizando las construcciones del promotor proximal como plantilla, se diseñaron primers (**Tabla 2**) para realizar la mutagénesis. Siguiendo las instrucciones del kit de mutagénesis Quikchangell, (Agilent) se realizó la PCR, se transformó y se cultivaron colonias. Tras la purificación del ADN de los plásmidos mediante Maxiprep (Qiagen), se secuenciaron para verificar la mutación deseada. Una vez verificada la mutación, se realizaron transfecciones como se describió antes.

5.10 Extracción de ARN y PCR tiempo real

Después de la diferenciación celular de las células 3T3-L1, así como extractos de scWAT de

ratones se extrajo el RNA mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen) utilizando 200 μ L de cloroformo para separar las fases, 500 μ L de isopropanol para precipitar el ARN y 1ml de etanol al 75% para lavar la pastilla de ARN. Posterior al lavado de pastilla de ARN se dejó secar durante 30 minutos y se resuspendió en 20 μ l en agua libre de ADNasas y ARNasas. Una vez obtenido el ARN se cuantificó por medio de espectrofotometría usando el quipo Nanodrop 2000 (Bio Rad Laboratories). A partir de ahí se sintetizó ADN complementario (cADN) por medio de transcripción reversa de RNA (3000 ng). El cADN fue sometido a reacción en cadena de la polimerasa. Para realizar la cuantificación de la abundancia relativa del mARN se utilizó Syber Green (Roche Diagnostics). La expresión se determinó por triplicado y se analizó la expresión de los genes: UCP1, CITED1, TMEM26. Se utilizó HPRT y 336B4 como genes “housekeeping” y para su normalización.

5.11 Inmunoprecipitación de la cromatina (chIP)

Preparación de muestras de línea celular: las células HEK293 fueron transfectadas después de recibir los estímulos Posterior a las 24 h, las células se fijaron con formaldehido al 0.8% y PBS por 10 minutos. Se mantuvieron 5 minutos con glicina a 125 nM y se le hicieron 3 lavados con PBS frío. Se almacenaron en PBS con inhibidor de proteasas y se sonicaron en tubo 1.5 ml con 100 μ l de ADN (32ng/ μ l RIPA 0.5% SDS). La cromatina se fragmento por medio de sonicación con 45 ciclos: 60s ON, 60s OFF en hielo. Se hizo el “reverse cross-linking” por medio de PCR. Los fragmentos se buscaron de un tamaño de 100-500 pb. Se verificó el tamaño de los fragmentos mediante un gel de agarosa 1% se corrió por electroforesis.

Preparación de muestras de tejido adiposo subcutáneo (scWAT): 0.5 g del tejido fue fragmentado

con bisturí en base congelada. Los fragmentos se fijaron con formaldehído al 0.8% con PBS por 10 minutos. Posterior a una incubación de 5 minutos con glicina, se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se almacenó con PBS frío adicionado con inhibidor de proteasas. Para el aislamiento de núcleos, se eliminó el PBS 1X y se lisó con amortiguador de lisis de membrana plasmática (HEPES 10 mM; KCl 60 mM; EDTA 1 mM; NP40 1%). Se dieron 20 golpes con homogeneizador manual. Se centrifugó para eliminar una capa de grasa. Se transfirió la pastilla y la fase acuosa a tubo nuevo. Posteriormente se centrifugó y se lisaron los núcleos con RIPA 0.5% de SDS. Se tiñeron los nucleos con diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se visualizó en el microscopio y se utilizó el software del Cytation (Biotek) para su visualización y cuantificación celular (**Figura 7**).

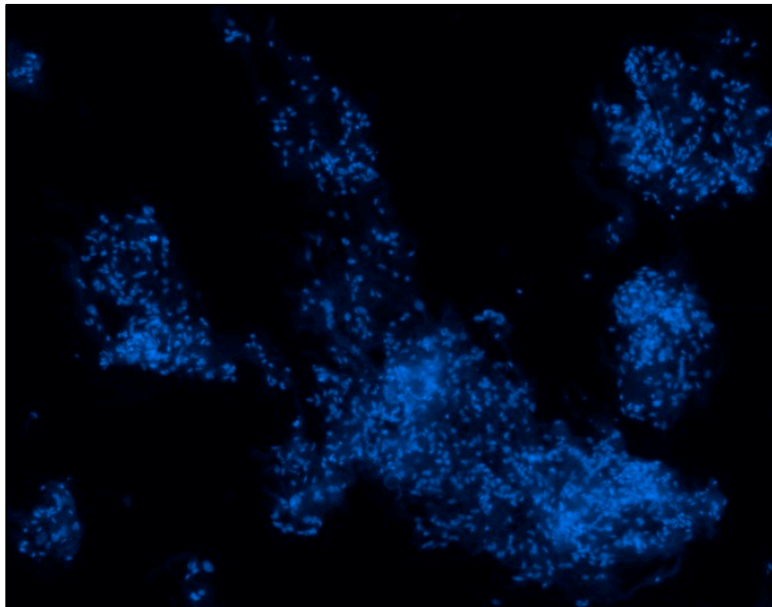


Figura 7. Núcleos de adipocitos de scWAT, teñidos con diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Posterior a la preparación de cromatina en células y en tejido, la inmunoprecipitación fue llevada

a cabo durante toda la noche a 4°C, usando 3 µg de anticuerpo antifosfoCREB (Invitrogen, Cat # 44-927G). Al día siguiente, se agregaron perlas magnéticas proteína-G (ThermoFisher) y continuaron la incubación a 4°C. Después de lavados, el complejo fue eluido de las perlas, se hizo el “reverse crosslinking” y las proteínas fueron digeridas por la proteinasa K a 65°C durante toda la noche. ADN fue purificado usando perlas magnéticas (AMPure XP, Beckman Coulter #A63880) y amplificadas usando los primers de la **Tabla 2**.

5.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan como promedio ± Error estándar. Para examinar el efecto de los tratamientos se utilizó t- test, ANOVA de una vía o dos vías seguida de Tukey’s post-hoc test para comparación múltiple e interacciones variables. Todos los valores de p fueron pruebas bilaterales con $p < 0.05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism 9.

6. Resultados

6.1 La genisteína induce la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos termogénicos.

La diferenciación de las células 3T3L1 fue inducida *in vitro* en respuesta a genisteína a diferentes concentraciones (60, 30, 15 y 5 µM). Después de los tratamientos de diferenciación, las células fueron incubadas con Mitotracker para teñir las mitocondrias de los adipocitos. La genisteína pudiese estar induciendo biogénesis mitocondrial (**Figura 8**). Especialmente a una concentración de 30 µM de genisteína. El vehículo o DMSO no indujo diferenciación. En la **Figura 3B** se observa la cuantificación de mitocondria que fue analizado por el programa de software ImageJ, el cual

nos indica que a una concentración de 30 μM de genisteína se induce mayor número de mitocondrias.

Para confirmar que estas células se han diferenciado en adipocitos termogénicos, se midió la expresión del marcador UCP1 por q-PCR. Como se observa en la **Figura 8B** gráfica inferior, la concentración 30 μM de genisteína fue la dosis donde se encontró mayor expresión de *Ucp1* comparado con las otras dosis.

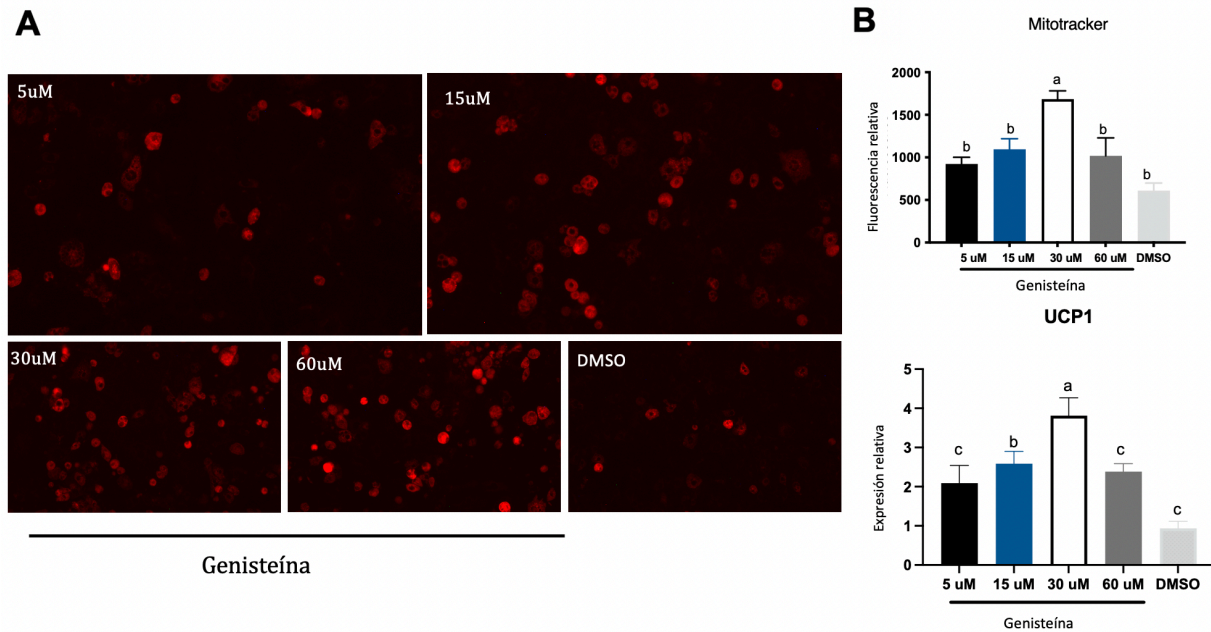


Figura 8. Tinción y densitometría mitocondrial en adipocitos diferenciados en respuesta a genisteína. **(A)** Mayor cantidad de mitocondrias presentes en respuesta a genisteína 30 μM a comparación de 5, 15 y 60 μM . El vehículo no indujo la diferenciación de adipocitos beige a comparación del tratamiento con genisteína **(A)(B)** expresión de *Ucp1* en respuesta a diferentes dosis de genisteína en células 3T3L1. Dosis de 30 μM induce mayor expresión de los marcadores de adipocitos beige *ucp1* en comparación con otras dosis. n=3

6.2 Administración de genisteína a temperatura ambiente estimula el “browning” en tejido adiposo blanco.

Para determinar el efecto de la genisteína como activador de la remodelación de adipocitos “beige” en tejido adiposo blanco, ratones C57BL/6 fueron sujetos a administración de genisteína por 5 días. Para evitar cualquier contribución potencial del sistema nervioso simpático en este proceso, los animales se mantuvieron a una termoneutralidad. (30 °C). Aunque no se encontró diferencia en el peso de los animales **Figura 9A** y el consumo de alimento **Figura 9B** entre los tratados con genisteína y el grupo control, el tamaño de los adipocitos observados estaba significativamente reducido en ambos scWAT **Figura 9C, D** y eWAT **Figura 9C, E** comparado con los ratones a los que se les administró únicamente el vehículo. Un incremento significativo en la abundancia de la proteína UCP1 se encontró en scWAT y en eWAT, así como en los marcadores de “browning” incluyendo PGC1 α y TBX1. Estos se encontraban aumentados cuando los animales recibieron administración de genisteína en comparación del grupo control **Figura 9F, G** indicando claramente que este compuesto bioactivo es capaz de estimular el proceso de “browning” particularmente en la transcripción de *Ucp1*. Por tanto, el mecanismo por el cual la genisteína estimula la expresión de *Ucp1* es capaz de llevar este proceso necesita de ser investigado.

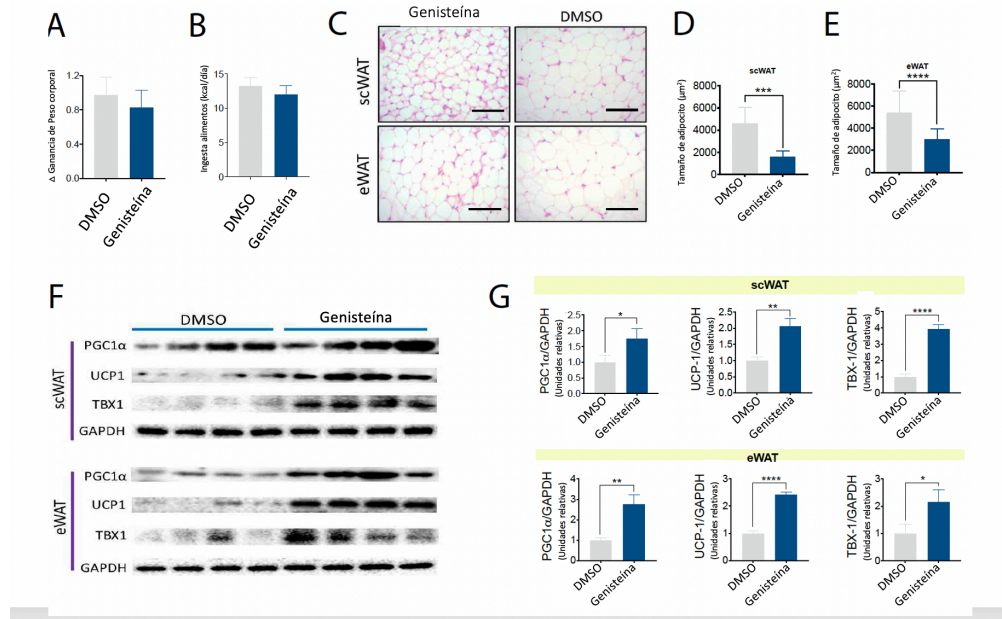


Figura 9. La genisteína induce “browning” a termoneutralidad. **(A)** Ganancia de peso de ratones C57BL6 en termoneutralidad (30 °C) y sujetos a administración diaria de genisteína o vehículo (DMSO, dimetilsulfóxido) por 5 días. n = 8 por grupo. **(B)** Ingesta de comida (kcal/día) de ratones descrita en A. **(C)** Tinción representativa (n = 5 por grupo) de hematoxilina y eosina de scWAT y de eWAT de los ratones descritos en A. Escala de barra = 50 µm. Cuantificación del área de adipocitos de **(D)** scWAT y de **(E)** eWAT de las imágenes mostradas en C. **(F)** Western blot de PGC-1α, y de marcadores de “browning” UCP1 y TBX1 de scWAT y eWAT de los ratones descritos en A. GAPDH fue utilizado como control de carga. **(G)** Densitometría cuantitativa del western blot mostrados en F. Resultados representados en medias ± SEM. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01 y ***P ≤ 0.001 ****P ≤ 0.0001 vs. grupo del vehículo (DMSO, dimetilsulfóxido) por Student t test.

6.3 Determinación de los potenciales elementos de respuesta involucrados a genisteína en el promotor de UCP1.

Para establecer cuáles de los elementos en cis podrían ser los potenciales blancos responsables de la estimulación de la transcripción de *Ucp1*, se llevó a cabo un análisis de la región promotora de *Ucp1* utilizando la base de datos MatInspector (versión 8.0), En la **Figura 10**, así como en la **Tabla suplementaria 1** se muestra el promotor de *Ucp1*, así como todos los elementos de respuesta putativos responsables de la transcripción de *Ucp1* con un core de similitud superior a 0.75, que se han visto implicados en los procesos de “browning” o diferenciación de adipocitos.

5' ATGCCAATTT ATAGTGCCGT CACTAACAGT ACTGATACTT TAACATGCT -2951
 AGTTACGACG GGAGGGTGCA GATGGAGGCA AAGCGCTGTG ATGCTTTTG -2701
 GGT TTGAGTG CACACATTTG AATGGCGTTC TACATCTTAA AGTGAGCAA -2651
 TGGTGACCGG GTGCCCTGTA TTCAGTGATT CTGTGAAATG GAGAAGAAC -2601
 CGGACACTAG GTAAGTGAAG CTTGCTGTCA CTCCTCTACA GCGTCACAG -2551
 GGGTCAGTCA CCCTTGACCA CACTGAACTA GTCGTCACCT TTCCACTCT -2501
 RARE PPARE CRE2 RARE
 CCTGCCAGAA GAGCAGAAAT CAGACTCTCT GGGGATATCA GCCTCACCC -2451
 TACTGCTCTC TCCATTATGA GGCAAACCTT CTTTCACTTC CCAGAGGCT -2401
 TGGGGGCAGC AAGGTCAACC CTTTCCTCAG ACTCTAGAAC CACTCCCTG -2351
 RARE
 CTTGAGTTGA CATCACGGGC CTCCTTGAGC GAGAATTTCA TTCTGCCAT -2301
 CCAGGGCTCC GAGTGCCATT CCTCTAAGAC CATAGCTTGG TTCCTTATG -2001
 TTTGTTCTTG TTTCTTTTCA ACCGGCTGTG CTCATTCCA CAGAAAGTT -1951
 RXR
 CCAGTTCCTT CACTACCCTA CTAACCACCT CCGATACCTC TCAGCTTTG -1901
 TTCTCTGATG CAAGTAGCAT GACGCTTCTT ATGGGAGCAT GATGCAAGC -1851
 GCATGATGTT TTAATGAAAA CATCAATGCC ATTTTCTCCT AATAATCCT -1801
 TTTAAAGCTT TTCAAATACA AATCTTTGCT CAAAGATAGA AGTAAGAAA -901
 ACCCCCCACA CACACACACA CACACCAACA AACCACCTTA CAATGTCTG -851
 ACTGGCACTA GGGATAACAG GAGTTCAAAT CTGGGACTAT ATTTGACAC -801
 ATCACAAACC AAAGCTAGAG GACTTTCTCA GGGTCACGAA GCTGGTCAG -751
 TGGCTTGGTT GCATCTGCAG CCAACCAACC CTCTGTCTT CCAGGGCTC -701
 TGCTAAGAAC TATTCAAAGG AGCAAGGGCT GGCATTCCCT GCAGAGATC -651
 ACAGGCTTGC TAGCGTGGCT ATGAGCTTAG TTGATCTCGC CCAACTAAA -601
 ERE
 GTGACCACAC GATGCACTCA CTTTCTCGAA AAAGTTTAGG GCGTTATTA -551
 ERE
 TTTTGCATG GATTCCCTCC CCTCCCACAT CCTCATCCCC ACCCCATCC -501
 GTCACCCGAA TCTGAAGGTG ACATTTGAAA AGGAATGTAA AGAAAGGGA -451
 ATTCAGAATT GAAAGGAGAA GAATCAGTAG CCAAGTAGAT GCATGGGAA -401
 GGGGCCCGGG ACTGGGAGTT CATCCTACAG CTATTCTAGC TGTGGAECT -351
 TTCAGCAAAA TCTCGGAGGA GATCAGATCG CGCTTATTCA AGGGAGCCA -301
 TCCCTGCTCT GCGCCCTGGT CCAAGGCTCC GCGGTTGAAG AGTGACAAA -251
 GGCACCACGC TGCGGGGACG CGGGTGAAGC CCCTCTGTGT GTCCTCTGG -201
 CATAATCAGG AACTGGTGCC AAATCAGAGG TGATGTGGCC AGGGCTTTG -151
 GAGTGACGCG CGGCTGGGAG GCTTGCGCAC CCAAGGCACG CCCCTGCCA -101
 CREB4
 GTCCACATG CAGCTCTTTG GAGACCTGGG CCGCTCAGCC ACTTCCCCC -51
 GTCCCTCCTC CAGCAAGGGG CTATATAGAT CTCCCAGGTC AGGGCGCAG -1
 TATABOX
 AGTGCCGGGC AATCTGGGCT TAACGGGTCC TCCCTGCCCC AGCAAGAGG 50

transcription start

Figura 10. La región del promotor *Ucp1* contiene varios elementos de respuesta putativos que pudiesen ser los mediadores de la activación de genisteína. Secuencia de nucleótidos de la región 5' (nt -2999pb a +50) del promotor del gen de *Ucp1*. Los números indican la posición relativa del sitio de inicio de transcripción (TSS por sus siglas en inglés) designado como +1. Los potenciales elementos de respuesta predicho por el análisis de MatInspector se les asigno un color. (TRE; elemento de respuesta a tiroides; (CRE, elementos de respuesta a AMPc); (RARE, elementos de respuesta a ácido retinoico); (PPARE, elementos de respuesta a proliferador de peroxisomas); (RXR elementos de respuesta receptor retinoide X); (ERE, elementos de respuesta a estrógenos) .

Se encontraron dentro de este análisis de promotor, dos elementos de respuesta de estrógeno (ERE), -27 bp y -609 bp, río arriba del sitio arriba de transcripción. Se ha visto que la genisteína puede unirse al receptor de estrógeno, especialmente una particular afinidad al receptor de estrógeno β (ER β), debido a su similitud estructural con 17 β -estradiol. A pesar de que se ha sugerido que las hormonas esteroideas podrían modular la expresión de *Ucp1*, no se ha demostrado que la genisteína pudiera activar este gen vía el receptor de estrógenos.

De igual manera, el análisis del promotor también nos mostró 4 sitios CRE en el promotor de *Ucp1*. La genisteína puede incrementar los niveles de AMPc y por lo tanto la enzima PKA, que culmina en la activación de CREB, un potencial factor transcripcional que pudiese activar la transcripción de *Ucp1*, de igual manera el mecanismo mediado por CRE tampoco ha sido documentado. El análisis de -2999pb río arriba del sitio de inicio de transcripción también reveló la presencia de otros sitios de unión putativos, incluyendo el elemento de respuesta a hormona tiroidea (TRE, por sus siglas en inglés), el elemento de respuesta a receptor activados por proliferadores peroxisomales (PPARE, por sus siglas en inglés), los elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE, por sus siglas en inglés), que pudiesen ser capaces de inducir la expresión de *Ucp1* (**Figura 10**). Por lo tanto, se diseñaron cinco construcciones usando el vector reportero pgl3b y unas partes del promotor de *Ucp1* que contienen algunos de los elementos de respuesta

putativos a unión del promotor. Para determinar su funcionalidad y conocer la activación transcripcional de la genisteína a nivel promotor. En la **Figura 11**, presentamos el esquema de la construcción más grande conteniendo los elementos de respuesta que pudieran ser afectados por la acción de la genisteína.

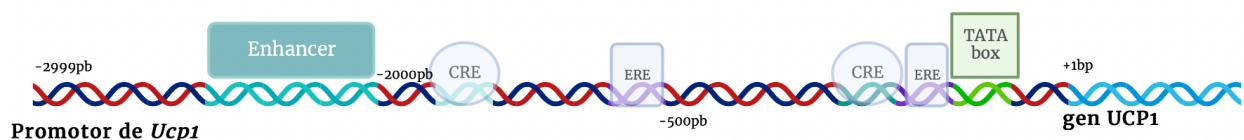


Figura 11. Diagrama del promotor del gen *Ucp1* de 5' región flanqueada nt -2999pb a +1 demostrando los elementos de respuesta a AMPc (CRE) y elementos de respuesta a estrógenos (ERE). (TATA box; caja TATA).

6.4 La genisteína estimula el promotor del gen *Ucp1*

Para determinar la capacidad de la genisteína de activar el promotor del gen *Ucp1*, las células Hek293 fueron transfectadas con diferentes construcciones *Ucp1*-Luc. El vector vacío (pGL3b) fue incluido como control negativo. Después de las transfecciones, el estímulo de genisteína fue agregado a una concentración de 15 μ M. Como se observa en la **Figura 12**, la genisteína significativamente aumento la actividad del promotor de *Ucp1* comparado con el vehículo. Este efecto puede ser observado desde -260 pb hasta el vector completo (-2999 pb) indicando por lo menos la presencia de un elemento de respuesta mediado por la genisteína en el promotor de *Ucp1* y este efecto no se observa en el vector vacío pGL3b.

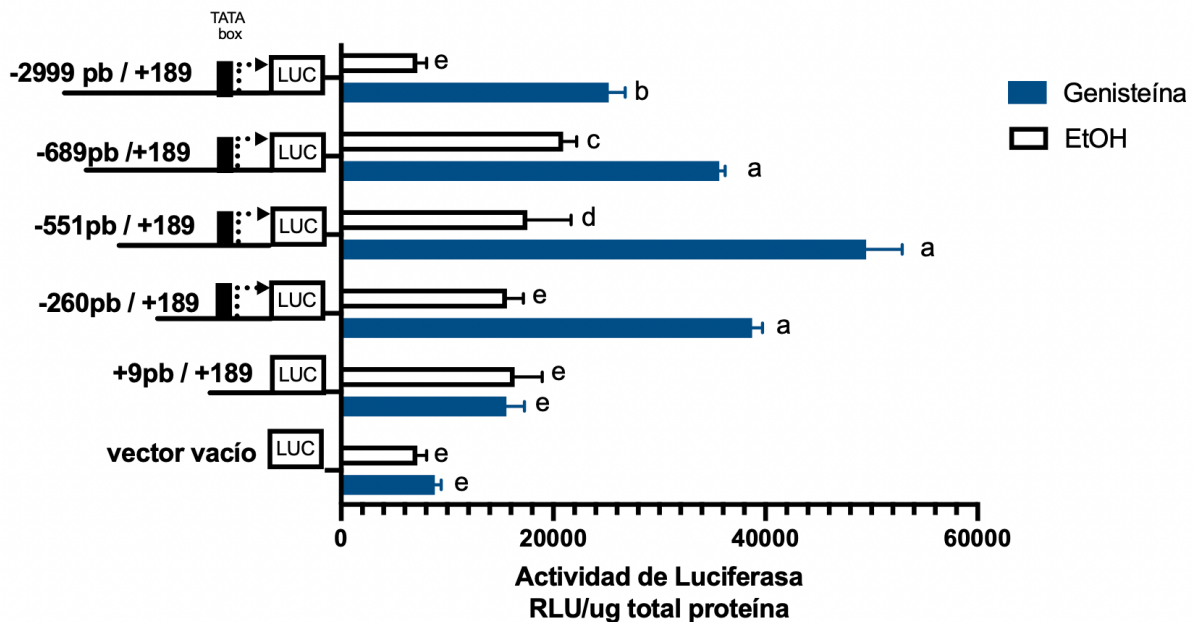


Figura 12. La genisteína estimula la actividad del promotor de *Ucp1*. Efecto de la genisteína (15 μ M) y del vehículo (EtOH) en la actividad del promotor de *Ucp1*. Análisis funcional del promotor del gen *Ucp1* de ratón. Fragmentos de los tamaños indicados en la región 5' fueron clonadas en el vector de pGI3 basic y transfectadas en células Hek293 seguidas de estimulación con genisteína o vehículo. La actividad de luciferasa fue medida 24h después y normalizado con el contenido de proteína total. Los resultados se expresan en promedio \pm SEM de los tres experimentos independientes por plásmido. LUC, luciferasa. RLU, Unidad relativa de luz. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c > d > e$.

6.5 La estimulación del promotor de *Ucp1* mediante genisteína no ocurre vía el receptor de estrógenos.

Exploramos si la genisteína puede promover la transcripción del gen de *Ucp1* a través de los EREs encontrados en el análisis *in silico*. Para este propósito, hicimos construcciones con mutaciones sitio-dirigidas localizadas en -27 pb y -609 pb, respectivamente desde el sitio de inicio de transcripción (**Figura 13A**). Los ensayos de luciferasa revelaron que las mutaciones de estos cis-elementos de respuesta no redujeron la estimulación de la genisteína en el promotor del gen

Ucp1 (Figura 13A), indicando que el efecto de este compuesto bioactivo en la transcripción del gen *Ucp1* no está mediada por la vía del receptor de estrógenos.

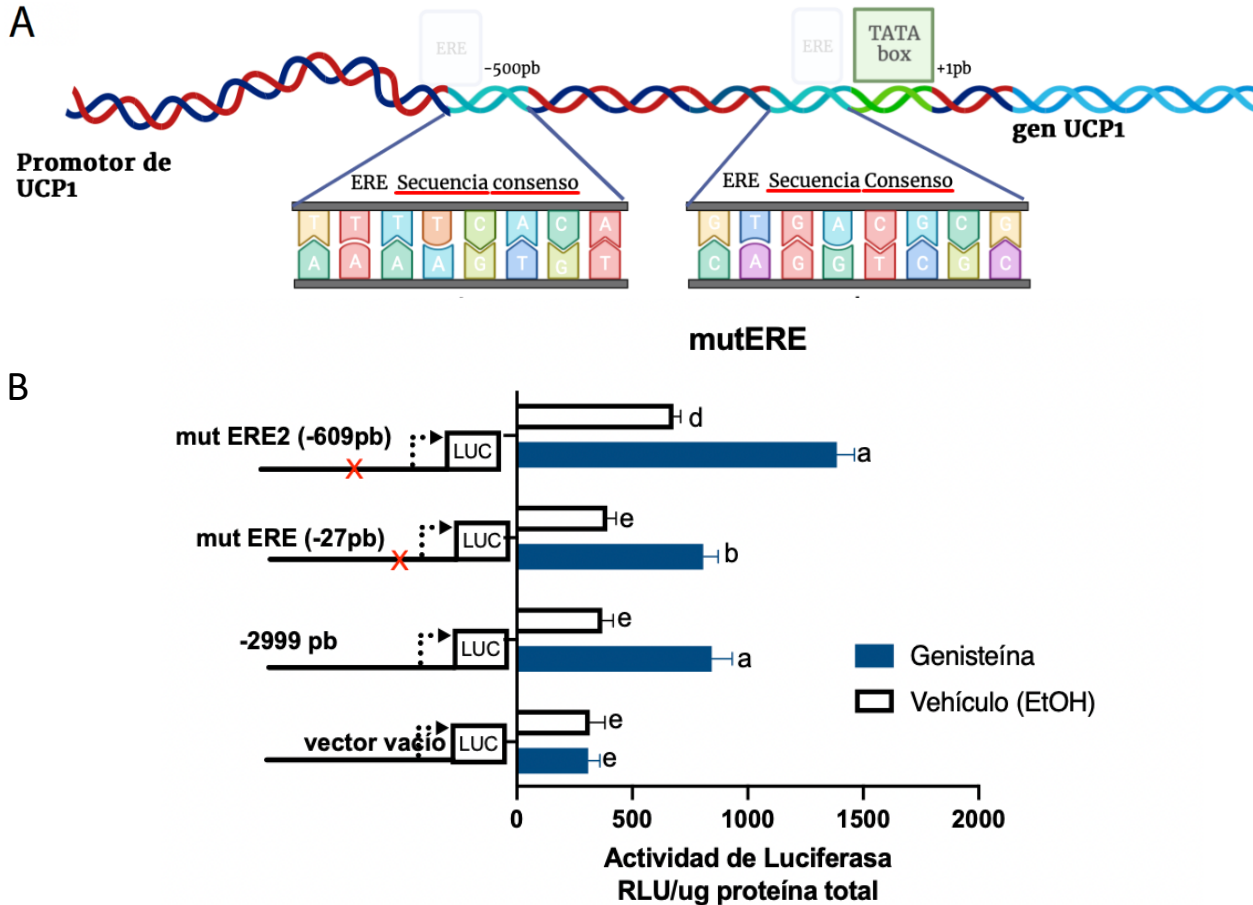


Figura 13. Estimulación del promotor de *Ucp1* mediante genisteína no corre vía elementos de respuesta a estrógenos. **(A)** Diagrama del promotor de *Ucp1* de la region 5' flanqueante nt -2999 pb a +1 demostrando la secuencia y localización de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) así como mutagénesis sitio dirigida llevada a cabo en los EREs. **(B)** Efecto de la genisteína (15 μ M) y el vehículo (EtOH) en el plásmido completo -2999 pb a +1 y los plásmidos mutados en sitios EREs del promotor de *Ucp1*. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la estimulación y normalizada con el contenido total de proteína. Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de tres experimentos

independientes por constructo. LUC; luciferasa. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. RLU, Unidad relativa de luz. Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c > d$.

6.6 La estimulación de la transcripción del gen *Ucp1* por genisteína ocurre vía CREB

El promotor del gen de *Ucp1* tiene cuatro potenciales sitios de unión a CREB. Como mencionamos previamente, ha habido una regulación a la alta en la actividad del promotor de *Ucp1* mediado por la genisteína usando los plásmidos ucp1-Luc que contienen solo -551 y -260 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción comparado con el vector completo (-2999 pb), sugiriendo la presencia de un elemento de respuesta putativo activado por la genisteína en esta región del promotor activado por la genisteína o bien la ausencia de un potencial sitio de inhibición. Interesantemente, al aumento de la actividad que se observa con la genisteína en el promotor, es suprimido cuando las células son incubadas con MDL-12330 (**Figura suplementaria 1**) y con H89, un inhibidor selectivo de PKA, indicando que la activación de *Ucp1* mediante la genisteína ocurre vía cAMP/PKA/CREB (**Figura 14**). Notablemente, el efecto supresor puede observarse con mayor impacto en el plásmido -260 pb, sugiriendo que los elementos de respuesta CRE próximos al inicio de inicio de transcripción del gen *Ucp1* están involucradas en esta regulación.

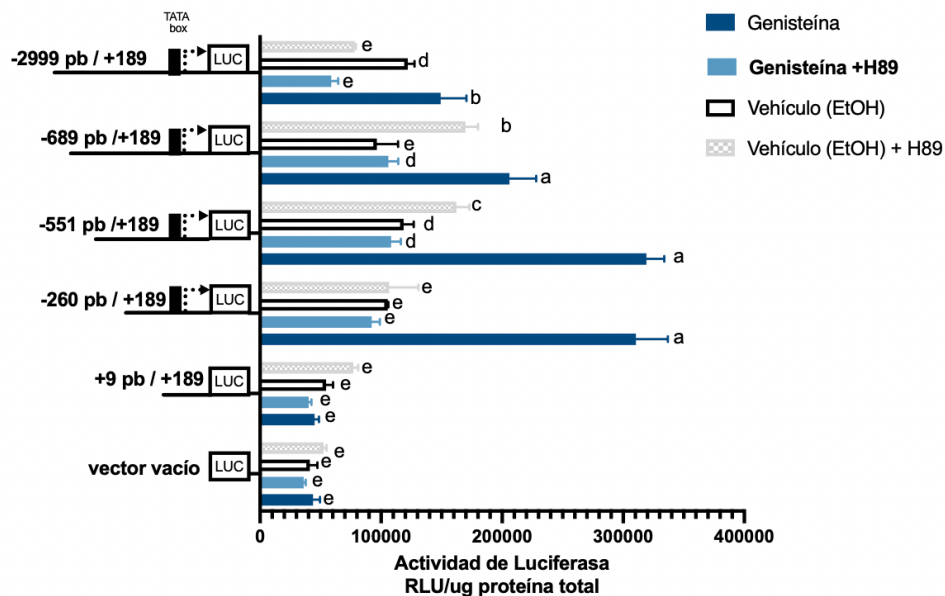


Figura. 14. Promotor de *Ucp1* es inducido por genisteína via cAMP/PKA/CREB. Análisis funcional de promotor de *Ucp1*, los fragmentos de tamaños indicados fueron transfectados en células Hek293 y estimulado con genisteína (15 μ M) o el vehículo (EtOH) en presencia o ausencia de un inhibidor selectivo de la proteína cinasa A, H89. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de estimulación y normalizada con el contenido de proteína total. Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de seis experimentos independientes por constructo. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. RLU, Unidad relativa de luz Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c > d > e$.

6.7 La mutación del sitio de unión CREB -146 pb del gen del promotor de *Ucp1* anula el efecto de la genisteína.

Para validar que la activación de *Ucp1* ocurre vía cAMP/PKA/CREB, mutaciones de sitio de unión a CREB localizados en la región del promotor proximal fueron realizadas. Los resultados claramente muestran que la mutación de CRE sitio dirigida a -146 pb del inicio de transcripción del gen *Ucp1* anulan la activación mediada por genisteína **Figura 15A**. De hecho, la estimulación con forskolina un activador de PKA, también estimula el promotor del gen *Ucp1*. **Figura 15B** Por tanto, esta evidencia demuestra que la genisteína activa la transcripción del gen *Ucp1* vía cAMP/PKA/CREB mediante el sitio de unión de -146pb CRE.

Figura 15. Promotor de *Ucp1* es inducido por genisteína y forskolina vía cAMP/PKA/CREB. **(A)** Diagrama del sitio de unión de CREB y la mutación de CRE realizada en -551 pb +1 de la región del promotor de *Ucp1*. Las células Hek293 fueron transfectadas con promotor de *Ucp1* de la región -551 pb + *Ucp1* -Luc reportero o plásmido mutado en CRE incubado con genisteína o vehículo. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la estimulación y normalizada con el contenido total de proteína. Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de seis experimentos independientes por constructo. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c > d > e$ **(B)** Análisis funcional de fragmentos *Ucp1*-luc de los tamaños indicados en la región 5' del promotor transfectado en células Hek293 estimulados por genisteína a (15 μ M), forskolina (10 μ M) y vehículos (DMSO, dimetilsulfóxido o EtOH) en presencia o ausencia del inhibidor selectivo de la proteína cinasa A, H89. La actividad de luciferasa fue medida 24 h después de la estimulación y normalizada con el contenido total de proteína. Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de seis experimentos independientes por constructo. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. RLU, Unidad relativa de luz. Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c > d > e$.

6.8 El análisis de inmunoprecipitación de cromatina en células HEK293 confirma que la genisteína activa la transcripción del gen *Ucp1* vía CREB

Para conocer si el factor de transcripción CREB en su forma fosforilada se une al promotor de *Ucp1* en respuesta a la genisteína, las células Hek293 fueron transfectadas con el luc-plásmido del promotor proximal *Ucp1* y fueron expuestas a genisteína. Después de esta transfección, se obtuvo la cromatina, así como de los experimentos control. Se llevaron a cabo los análisis de CHIP usando el anticuerpo fosfo-CREB (p-CREB). Como se ve en la **Figura 16A**, después de la estimulación con genisteína, hay una mayor interacción de p-CREB con el sitio CRE en el promotor de *Ucp1* comparado con el vehículo. Sin embargo, cuando las células Hek293, fueron transfectadas con el plásmido mutCRE (-146pb), el reclutamiento de fosfo-CREB se perdió aún con el estímulo de genisteína **Figura 16A**. La estimulación con forskolina fue también utilizada como control positivo en este experimento, de esta manera, la unión de p-CREB al promotor de

Ucp1 se expresa como la expresión relativa normalizada contra el input, el enriquecimiento es similar al observado con la estimulación de genisteína. **Figura 16 B, C.**

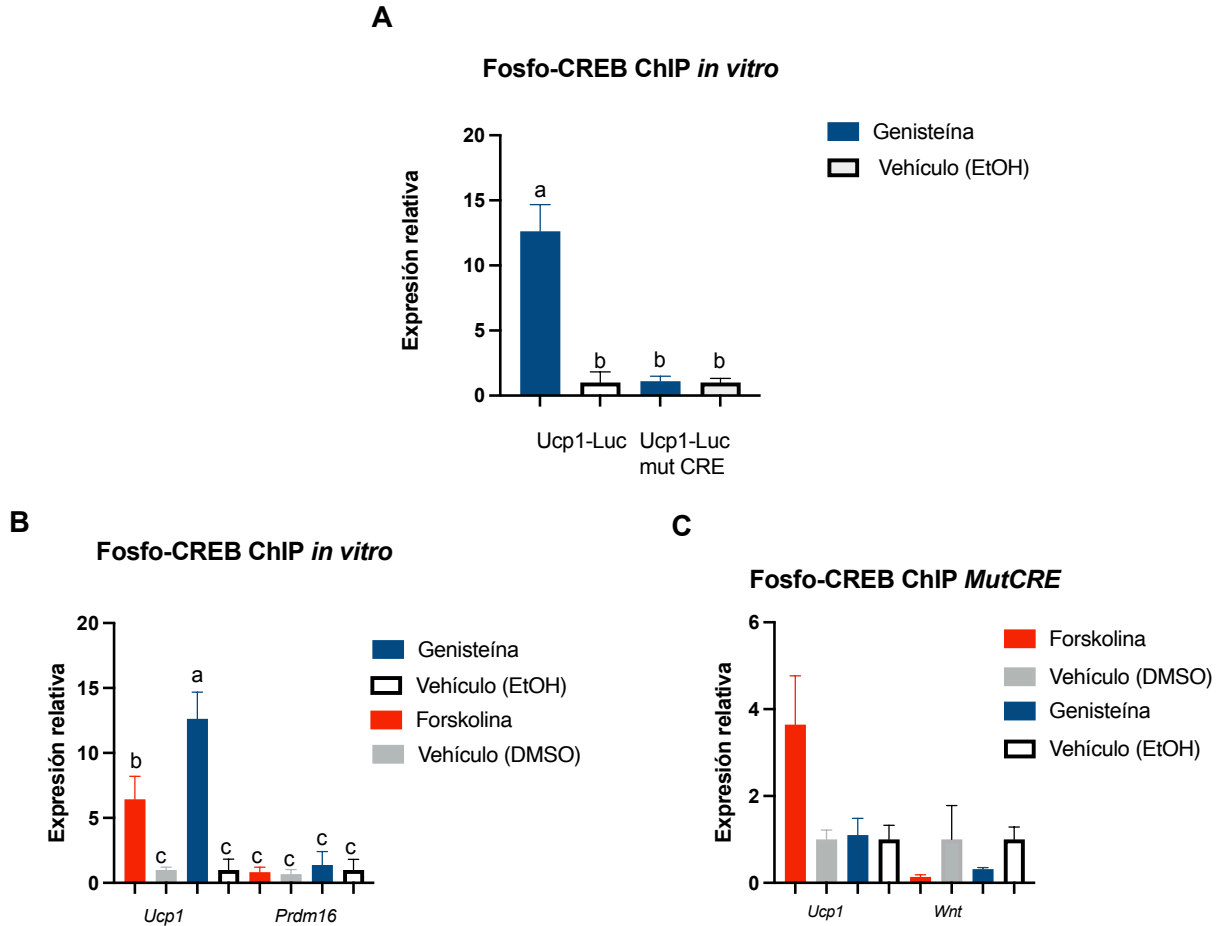


Figura 16. ChIP-PCR. Fosfo-CREB se une al promotor de *Ucp1* en respuesta a genisteína y de forskolina. **(A)** Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostrando efecto relativo del reclutamiento de fosfo-CREB al promotor de *Ucp1*. Los ensayos de ChIP fueron realizados en cromatina obtenida de plásmidos que contienen -551pb y plásmidos mutCRE Ucp1-luc transfectados a células Hek2983 que fueron estimuladas con 15 μ M de genisteína (15 μ M), forskolina (10 μ M) o vehículos (DMSO, dimetilsulfóxido y EtOH). Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes por construcción. **(B)** Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostrando efecto relativo del reclutamiento de fosfo-CREB al promotor de *Ucp1*. Los ensayos de ChIP fueron realizados en cromatina obtenida de plásmidos que contienen -551pb Ucp1-luc y plásmidos mutCRE Ucp1-Luc **(C)** Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostrando efecto relativo del reclutamiento de fosfo-CREB al promotor de *Ucp1*. Los ensayos de ChIP fueron realizados en cromatina obtenida plásmido mutCRE Ucp1-Luc transfectadas con células transfectadas que fueron estimuladas con genisteína, forskolina o vehículos. Los *Prdm*, *Wnt* son genes utilizados como controles negativos del ChIP. Los resultados se expresan en promedios \pm SEM de 3 experimentos independientes por

construcción. Se realizó ANOVA de dos vías seguida de Tukey's post-hoc test. Diferentes letras indican significancia donde $a > b > c$.

6.9 Inyección intraperitoneal de genisteína aumenta la unión de CREB en tejido adiposo.

Para evaluar si el mecanismo que se caracterizó en el modelo *in vitro* se lleva a cabo en organismos vivos, utilizamos scWAT de ratones donde previamente hemos mencionado el efecto de la genisteína en la regulación al alza de la transcripción de *Ucp1*. Los análisis de CHIP *in vivo* llevados a cabo en ratones tratados con genisteína también mostraron un aumento en la unión de p-CREB al sitio CRE dentro del promotor de *Ucp1* comparado con los animales que recibieron el vehículo (DMSO). (**Figura 17**). Este resultado confirma que la genisteína activa la transcripción de *Ucp1* en scWAT vía CREB ambos *in vitro* e *in vivo*.

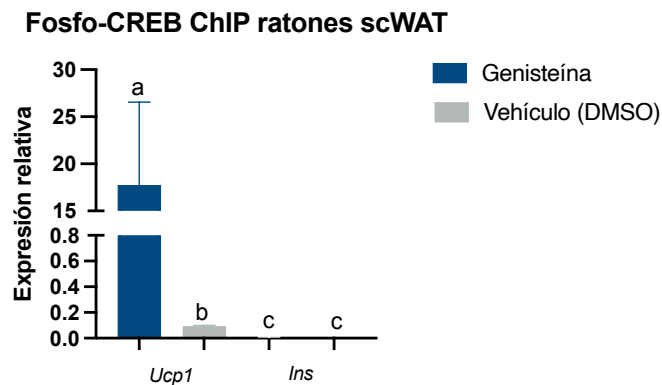


Figura 17. Fosfo-CREB se une al promotor de *Ucp1* en respuesta a genisteína en ratones. CHIP-PCR y el efecto relativo del reclutamiento de fosfo-CREB al promotor *Ucp1* en ratones C57Bl6 expuestos a administración aguda intraperitoneal de genisteína. El gen de *Ins* (insulina) es usado como control negativo. Los resultados son expresados en promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=3 animales por grupo). ANOVA de una vía fue realizada seguida de Tukey's post-hoc test. Las diferentes letras indican significancia donde $a > b > c$.

7. Discusión

La genisteína es un compuesto bioactivo dietario que se encuentra en la soya y cuyo consumo ha reportado varios efectos biológicos en el metabolismo de lípidos y glucosa. Además, algunos estudios han demostrado que la genisteína puede activar la termogénesis mediante el aumento del proceso de “browning” en el WAT, un efecto asociado con un aumento de UCP1 (Palacios-González, 2019 y 2014). En el presente estudio, demostramos que la administración de genisteína redujo el tamaño de los adipocitos scWAT y eWAT y aumentó la abundancia de marcadores de “browning”, incluyendo UCP1, en termoneutralidad. Este resultado indicó que este efecto podría ser independiente de la actividad simpática activada por el frío, revelando un nuevo modelo de remodelado del “browning” mediado por genisteína que reforzó nuestros estudios previos.

Debido a que todos los modelos reportados (Torre-Villalvazo, Tovar, Ramos-Barragan, Cerbon-Cervantes, & Torres, 2008 & Palacios-Gonzalez et al., 2019) para la inducción del “browning” mediada por genisteína coinciden en un claro aumento de la expresión de *Ucp1*, fue de nuestro interés conocer el mecanismo molecular responsable de este efecto. El uso de luc-plásmidos de *Ucp1* demostró que la genisteína aumentaba la actividad promotora de *Ucp1* en comparación con el vehículo, lo que indica que este compuesto bioactivo dietético podría activar uno o más factores de transcripción y por tanto, la transcripción de *Ucp1*. Estudios previos describieron que la genisteína es un ligando para el receptor de estrógeno, con una mayor afinidad para el ER β que para el receptor de estrógeno alfa (ER α) (Cassard-Doulcier A., 1998). Se han descrito varios genes como blancos del ER β (Cassard-Doulcier A., 1993), incluidos algunos genes implicados en el metabolismo de los adipocitos (Cao, 2004 & Barkhem, 1998). Así, en el presente estudio, se

exploró la posible participación de este receptor en la inducción de *Ucp1* mediada por genisteína ya que, el análisis de MatInspector reveló la presencia de 2 EREs potenciales localizados en - 609 pb y -27 pb río arriba del promotor del gen *Ucp1*. Interesantemente, la mutación de los potenciales EREs no disminuyó el efecto de la genisteína, sugiriendo que la activación del promotor de *Ucp1* por este compuesto no implicaba al receptor de estrógenos. Por otra parte, se ha demostrado que se requiere un aumento de la concentración de AMPc estimulado por la genisteína para activar la transcripción del gen *Ucp1*, lo que sugiere que la genisteína puede promover su expresión a través de la vía PKA/CREB. Evidencias recientes han demostrado que el aumento de AMPc está en parte mediado por la interacción de la genisteína con el receptor GPR30 (Vasquez-Reyes, 2022). El análisis *in silico* reveló la presencia de cuatro CRE putativos, previamente descritos por Kozak y sus colaboradores (Kozak, 1994). Para establecer si un elemento sensible al AMPc estaba implicado en el mecanismo por el cual la genisteína activa la transcripción de *Ucp1*, se utilizó la incubación de células con MDL-12330A y con H89, inhibidor de adenilato ciclasa y de PKA, respectivamente. Se estableció que la inhibición de la vía PKA reprimía el efecto de la genisteína, apoyando fuertemente que el mecanismo de activación transcripcional de *Ucp1* por genisteína es vía CREB. Por otro lado, la activación de la región promotora de *Ucp1* con genisteína se activó fuertemente con la adición de forskolina. Estos últimos resultados concuerdan con investigaciones previas que indican que la genisteína induce la fosforilación de CREB en las células β (Vivar, 2010) y en el hipocampo (Foryst-Ludwig, 2008). Las evidencias evolutivas han demostrado que los sitios de unión a CREB están presentes en los mamíferos (Ponnusamy, 2017), y existen pruebas de que un polimorfismo en humanos de

un sitio CRE en el promotor del gen *Ucp1* está asociado a un aumento de la masa grasa corporal (Kozak, 1994).

Los estudios con el reportero de luciferasa demostraron que el constructo que contiene el promotor proximal (-260 pb) de *Ucp1* es suficiente para generar una respuesta a la estimulación con genisteína. Aunque existe evidencia que la activación de CRE en el promotor proximal por sí solo no induzca una respuesta robusta de la transcripción de *Ucp1* en la diferenciación de adipocitos pardos y requiere la activación de elementos de respuesta a CRE y de PPAR, ambos localizados en el enhancer del gen de *Ucp1* que a su vez son inducidos por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Cao, 2004). Adicionalmente, el promotor de 2.9 kpb de *Ucp1* es también responsivo a genisteína, sin embargo, observamos una respuesta 1.5 veces menor a comparación de la respuesta con solo el promotor proximal. Estos resultados difieren a los observados de la activación del gen de *Ucp1* en respuesta a norepinefrina, no obstante, estos estudios presentan mutaciones en los sitios tanto en los CRE del “enhancer” y en los proximales. No discierne la importancia de los CRE localizados en la parte proximal del promotor de *Ucp1* y su papel en la inducción del gen (Kozak, 1994). Cabe notar que no podemos descartar que exista interacciones entre el enhancer o con otras regiones del promotor para un trabajo sinérgico para la regulación de la expresión de *Ucp1*. Por tanto, estudios posteriores a este se requieren para conocer el complejo transcripcional conformado en respuesta a genisteína.

En este estudio, se describe una inducción del “browning” mediada por la genisteína a corto plazo, puede ser importante diseñar más estudios en modelos animales y en humanos para

determinar la capacidad a largo plazo de la genisteína para mantener la termogénesis y generar un efecto benéfico sobre el peso corporal y la acumulación de grasa corporal, que conduzca a una mejora en los parámetros metabólicos. Existen pruebas de que, en la fracción vascular del estroma de sujetos obesos con resistencia a la insulina, la capacidad de los precursores de adipocitos para diferenciarse en adipocitos beige está limitada, asociada con una menor expresión del gen *Ucp1* (Luo, 2018). Por lo tanto, es fundamental determinar qué factores pueden estar implicados en este efecto, la atenuación en la vía de señalización para aumentar los niveles de AMPc o la interferencia con la activación del sitio de unión CRE en el promotor del gen *Ucp1*. Se necesitan más estudios para determinar esta alteración.

8. Conclusiones

Este estudio demostró que la genisteína es un compuesto bioactivo que estimula la termogénesis mediante el aumento de la expresión génica del gen *Ucp1*. Este efecto se produjo debido a la activación de la genisteína sobre el factor de transcripción CREB estimulando su unión al sitio CRE en la región proximal del promotor del gen *Ucp1*, induciendo su transcripción. Así pues, la genisteína podría utilizarse como posible agente terapéutico para promover la termogénesis y generar beneficios para la salud en individuos con obesidad; sin embargo, aún son necesarios más estudios para establecer su uso.

9. Referencias

- Barkem T., Carlsson B., Nilsson Y., Enmark E., Gustafsson J., and Nilsson S. (1998) Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonist/antagonist. *Mol Pharmacol* 54, 105-112.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- Cao W., Daniel K., Robidoux J., Puigserver P., Medvedev A., Bai X., Floreing L., Spiegelman B., Collins S., (2004) p38 mitogen activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* 24, 3057-3067.
- Cassard-Doulicier A., Gelly C., Bouillaud F., Ricquier D., (1998) A 211 bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue. *Biochem J* 333 (pt2), 243-246
- Cassard-Doulicier A., Gelly C., Fox N, Scherementi J., Raimbault S., Klaus S., Forest C., Bouillaud F., Ricquier D., (1993) Tissue-specific and beta adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region. *Mol Endocrinol* 7, 497-506.
- Cederberg, A., Gronning, L. M., Ahren, B., Tasken, K., Carlsson, P., & Enerback, S. (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*, 106(5), 563-573. doi:10.1016/s0092-8674(01)00474-3
- Cinti, S., Cancelli, R., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., De Matteis, R., Giordano, A, *et al.* (2002). CL316,243 and cold stress induce heterogeneous expression of UCP1 mRNA and protein in rodent brown adipocytes. *J Histochem Cytochem*, 50(1), 21-31. doi:10.1177/002215540205000103

- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360. doi:10.1056/NEJMoa0810780
- Dempersmier, J., Sambeat, A., Gulyaeva, O., Paul, S. M., Hudak, C. S., Raposo, H. F., *et al.* (2015). Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol Cell*, 57(2), 235-246. doi:10.1016/j.molcel.2014.12.005
- Fenzl A, Kiefer WF, (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis, *Horm Mol Biol Clin Investig*, Jul;19(1):25-37. doi: 10.1515/hmbci-2014-0022.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., *et al.* (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 15(3), 269-272. doi:10.1038/ng0397-269
- Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, Hartge M, Sprang C, Frost N, Krikov M, Bhanot S, Barros R, Morani A, Gustafson J, Unger T and Kintscher U. (2008) Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 4, 31000108.
- Frontini, A., & Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*, 11(4), 253-256. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004
- Esteve R, Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional (2013) *J Endocrinol Nutri*, 61(2), 100-112, doi: 10.1016/j.endonu.2013.03.011
- , M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19(10), 1252-1263. doi:10.1038/nm.3361
- Hirsch, J. (1997). Some heat but not enough light. *Nature*, 387(6628), 27-28. doi:10.1038/387027a0
- Kajimura, S. (2015). Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway. *Int J Obes Suppl*, 5(Suppl 1), S11-14. doi:10.1038/ijosup.2015.4
- Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*, 22(4), 546-559. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.007.

- Keiper S., Lutter D., Schroeder B., Brandt D., Stahlman M., Schwarzmayr T., Graf E., Fuchs H., Hrabe de Angelis M., Tschop M., Rozman J & Jastroch M. (2020), Endogenous FGF21-signaling controls paradoxical obesity resistance of UCP1-deficient mice. *Nature communications*, 11:624, Doi:110.1038/s41467-019-14069-2.
- Kim H., Park S., Seo J, Jung, Lee S., Kang S, Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells via Wnt/ β -catenin signalling or lipolysis (2010)., *J Cell Prol*, Dec;43(6):594-605.doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00709.x.
- Kozak, L. P., & Anunciado-Koza, R. (2008). UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7, S32-38. doi:10.1038/ijo.2008.236
- Kozak, L. P., Britton, J. H., Kozak, U. C., & Wells, J. M. (1988). The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J Biol Chem*, 263(25), 12274-12277. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3410843>
- Kozak, U. C., Kopecky, J., Teisinger, J., Enerbäck, S., Boyer, B., & Kozak, L. P. (1994). An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol*, 14(1), 59-67. doi:10.1128/mcb.14.1.59
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778), 652-660. doi:10.1038/35007527
- Luo J., Wang A., Zhen W., Wang Y., Si H., Jia Z.m, Alkhalidy H., Cheng Z., Gilbert E., Xu B and Liu D (2018) Phytonutrient genistein is a survival factor for pancreatic beta cells via GPR30-mediated mechanism. *J Nutr Biochem* 58, 59-70.
- Ohlson, L. O., Larsson, B., Svardsudd, K., Welin, L., Eriksson, H., Wilhelmsen, L., *et al.*(1985). The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*, 34(10), 1055-1058. doi:10.2337/diab.34.10.1055
- Palacios-Gonzalez, B., Vargas-Castillo, A., Velazquez-Villegas, L. A., Vasquez-Reyes, S., Lopez, P., Noriega, L. G., *et al.*(2019). Genistein increases the thermogenic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice. *J Nutr Biochem*, 68, 59-68. doi:10.1016/j.jnutbio.2019.03.012

- Palacios-Gonzalez B., Zarain-Herberg A., Flores-Galicia I., Noriega LG., Aleman-Escondrillas G., Zarinan T., Ulloa-Aguirre A., Torres N. and Tovar AR (2014) 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, 132-140.
- Ponnusamy S, Tran Q., Smallwood H., Thiyagarajan T., Banerjee S., Johnson D., Dalton J., Sullivan R., Miller D., Bridges D., and Narayanan R (2017). Pharmacologic activation of estrogen receptor beta increases mitochondrial function, energy expenditure, and brown adipose tissue. *FASEB J*, 31, 266-281.
- Schrauwen, P., van Marken Lichtenbelt, W. D., & Spiegelman, B. M. (2015). The future of brown adipose tissues in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 58(8), 1704-1707. doi:10.1007/s00125-015-3611-y
- Schulz, T. J., Huang, P., Huang, T. L., Xue, R., McDougall, L. E., Townsend, K. L., *et al.* (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495(7441), 379-383. doi:10.1038/nature11943
- Sears, I. B., MacGinnitie, M. A., Kovacs, L. G., & Graves, R. A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol*, 16(7), 3410-3419. doi:10.1128/mcb.16.7.3410
- Sims, E. A., & Danforth, E., Jr. (1987). Expenditure and storage of energy in man. *J Clin Invest*, 79(4), 1019-1025. doi:10.1172/JCI112913
- Sramkova, D., Krejbichova, S., Vcelak, J., Vankova, M., Samalikova, P., Hill, M., *et al.* (2007). The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 115(5), 303-307. doi:10.1055/s-2007-977732
- Sternberg, E. M., Silverman, M. N., & Cizza, G. (2007). The neuroendocrine system and rheumatoid arthritis: insights from anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *J*

Rheumatol, 34(7), 1443-1445. Retrieved from
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611960>

- Torre-Villalvazo, I., Tovar, A. R., Ramos-Barragan, V. E., Cerbon-Cervantes, M. A., & Torres, N. (2008). Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr*, 138(3), 462-468. doi:10.1093/jn/138.3.462
- Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R., Rodriguez-Lopez LA., Torres N., Tovar-Palacio AR, (2017). Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity?. *Arch Med Res*. Jul;48(5):401-413. doi 10.1016/j.arcmed.2017.10.002.
- Vasquez-Reyes S, Vargas-Castillo A, Noriega LG., Velazquez-villegas L., Perez B., Sacher-Tapia M., Ordaz G., Suarez-Monroy R., Ulloa-Aguirre A, Offner H., Torres N and Tovar AR (2022) Genistein stimulation of white adipose tissue thermogenesis is partially dependent on GPR30 in mice. *Mol Nutr Food Res* 66, e2100838.
- Vivar o., Zhao X., Saunier F., Griffin C., Mayba S.,m Tagliaferri M, Cohen I., Speed P., Leitman D (2010), Estrogen receptor beta binds and regulated three distinct classes of target genes *J Biol Chem* 285, 22059-22066.
- Wang S, Hsiung P., Hung H., Tung C., Tang Ho, From white to beige adipocytes: eutic potential of dietary molecules against obesity and their molecular mechanisms (2019). *J Food Funct*, Mar 20;10(3):1263-1279. doi: 10.1039/c8fo02154f.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., . . . Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
- Young, J. B., Saville, E., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Landsberg, L. (1982). Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. *J Clin Invest*, 69(5), 1061-1071. doi:10.1172/jci110541

Suplementarios

	Posición	hebra	secuencia consenso de CRE TGACGTCA	Walton, 2005
CRE	(-146 pb)	(+)	...TTTGGGAG TGACG --CGGCT	
CRE	(-1886 pb)	(+)TGAGCA TGACG --CTTC	
CRE	(-2524 pb)	(-)GAAAGG TGACG ---ACTAG	
			secuencia consenso de RARE GGGTCA GTTCACTGACCT TGACCT	Zhang R, 2015
RARE	(-2551 pb)	(+)	.. GGGTCA GT--CACTGACGGAGTGAC	
RARE	(-2397 pb)	(-)	..GGAAGG GTTGACTG —CCCCAG.	
RARE	(-2516 pb)	(-)	.. AGGTGA GTTCA GTGTGGTCC....	
			secuencia consenso de ERE GGTCA.. TGACC. GGTCA	Jing Huang 2003; CM Klinge, 2015
ERE2	(-27 pb)	(+)	.. GGG-T-ATATAGATCTCCC ----- GGTCAGG	
ERE	(-609 pb)	(+)	...CTAAAAG TGACC --TGCACTCACTTTC	
			secuencia consenso de PPARE AGGTCANAGGTCA/ TGACCT	Tzeng, 2015
PPARE	(-2552 pb)	(+)	GAGG-TCA ----- GTCATGACCACA	
			secuencia de consenso de TRE A/GGGTCANNN(A/G)GGTCA	Xiong S., 1998
TRE1	(-2753 pb)	(+) GGGT.CAGATGG ---- AGG-CAAAGCGCT	
TRE2	(-2432 pb)	(+) GAGG--CAA ACTTTCTT-- TCA	

Tabla Suplementaria 1. Elementos de respuesta encontrados en el promotor de *Ucp1*. Secuencia consenso de cada elemento de respuesta y similitud con promotor de *Ucp1*. (CRE, elementos de respuesta al adenosín monofosfato cíclico), (RARE, Elementos de respuesta a receptor de ácido retinoico), (ERE, elemento de respuesta a estrógenos), (PPARE, elementos de respuesta a proliferador de peroxisomas), (TRE, Elemento de respuesta a receptor de hormonas tiroideas).

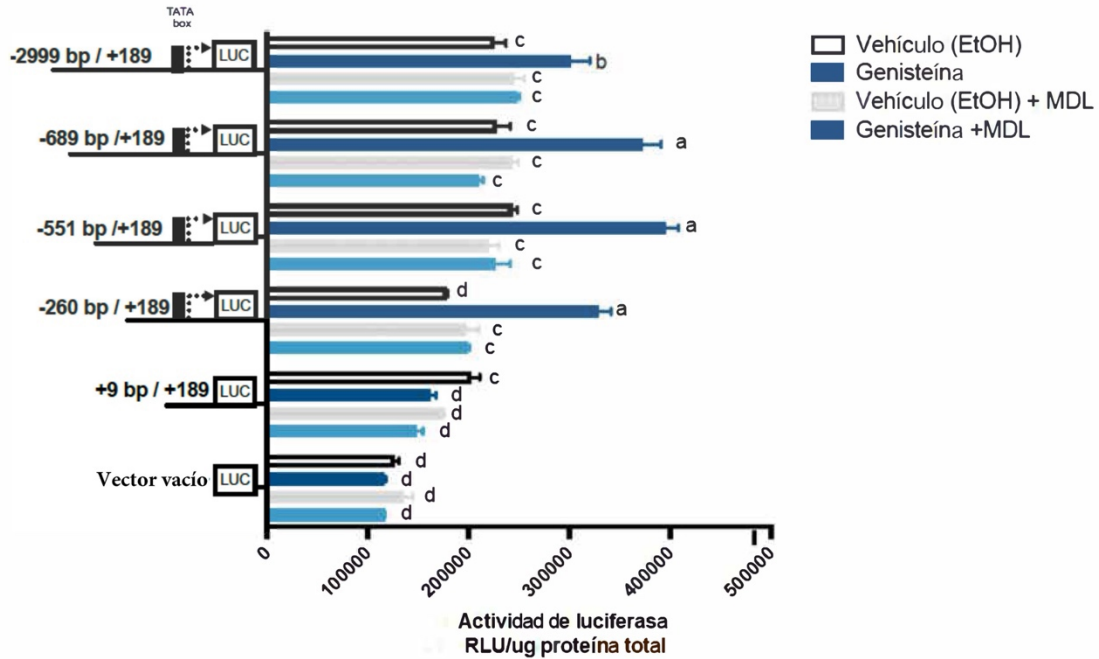


Figura Suplementaria 1. Activación del promotor de *Ucp1* mediante genisteína y forskolina via cAMP/PKA/CREB. Análisis funcional de los fragmentos de *Ucp1*-luc, los tamaños indicados en región 5' transfectados en células HEK293 y estimulados por genisteína (15 μ M), o vehículo (EtOH) en la presencia y ausencia del inhibidor selectivo de adenilato ciclasa, MDL-12330^a. (LUC, gen de luciferasa), (RLU, Unidad relativa de luz), (TATA box, caja TATA).