



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Ciudad de México julio 23 de 2019

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL

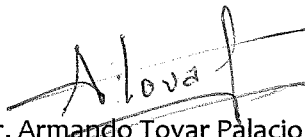
Presente

En respuesta a su oficio CICUAL-177-19 adjunto artículos científicos que se publicaron del proyecto CINVA-FNU-1208-14/14-1

- Efecto del consumo de resveratrol sobre la microbiota intestinal de ratones
- Long-term genistein consumption modifies Gut microbiota, improving glucose metabolism, metabolic endotoxemia, and cognitive function in mice fed a high-fat diet

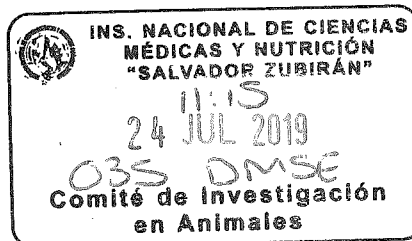
Cabe mencionar que en estas dos publicaciones participa como autor Patricia López Romero, quien se jubilo este año; por lo que solicito que cualquier otra aclaración me lo haga saber.

Atentamente


Dr. Armando Tovar Palacio
Fisiología de la Nutrición

ATP/gpa

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



Efecto del consumo de resveratrol sobre la microbiota intestinal de ratones

Effect of resveratrol consumption on the gut microbiota of animal model

Patricia López-Romero,* Mónica Sánchez-Tapia,* Nimbe Torres-Torres,* Armando R. Tovar-Palacio.*

*Departamento de Fisiología de la Nutrición. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. CDMX, México.

RESUMEN

Introducción: estudios recientes han demostrado que el consumo de polifenoles en la dieta tiene efectos metabólicos benéficos. Uno de estos compuestos es el resveratrol, el cual incrementa el gasto energético y la sensibilidad a la insulina. Recientemente, se ha sugerido que un posible mecanismo de acción por el cual el resveratrol tiene esos efectos es mediante la modificación de la microbiota intestinal. **Objetivo:** determinar si el consumo de resveratrol en ratones alimentados con una dieta alta en grasa era capaz de modificar la microbiota. **Material y método:** se utilizaron ratones macho de la cepa C56BL/6 los cuales consumieron una dieta alta en grasa con o sin 0.1% de resveratrol por seis meses. **Resultados:** al final del estudio no se observó diferencia significativa en la ganancia de peso entre los grupos, a pesar de que el grupo de resveratrol tuvo un consumo de alimento significativamente mayor. Adicionalmente, el consumo de resveratrol se asoció con un modesto incremento en diversidad de la microbiota intestinal. Particularmente, se observó un incremento en la *Phyla* de los *Bacteroidetes*. A nivel de género en la taxonomía de la microbiota intestinal se observó un incremento de *Bacteroides* y una disminución de *Prevotella*, bacterias que se han asociado en diversos estudios con una mejoría en el perfil metabólico. **Conclusión:** el consumo de resveratrol, modificó la microbiota intestinal, incrementando la *alpha* diversidad, además de disminuir la presencia de *Prevotella*.

Palabras clave: resveratrol, microbiota intestinal, dieta alta en grasa.

ABSTRACT

Introduction: Recent studies have shown that consumption of polyphenols in the diet may have beneficial metabolic effects. One of these compounds is resveratrol, which stimulates energy expenditure and insulin sensitivity. Recently, it has been suggested that some of the benefits of these compounds may be associated with a modification of the intestinal microbiota. **Objective:** to study whether the consumption of resveratrol in mice fed a high fat diet was able to modify the microbiota. **Material and method:** mice of the C56BL/6 strain were studied, which consumed a high fat diet with or without 0.1% resveratrol for 6 months. **Results:** At the end of the study, animals that consumed resveratrol did not gain a different weight from those who did not consume it, despite having a significantly higher consumption. These changes were associated with a modest increase in diversity of the intestinal microbiota. In particular, an increase in the *Phyla* of *Bacteroidetes* was observed. At the genus level in the taxonomy of the intestinal microbiota an increase of *Bacteroides* and a decrease of *Prevotella* was observed, which was associated in several studies with a better metabolic profile. **Conclusion:** the consumption of resveratrol modified the intestinal microbiota, increasing *Alpha* diversity, in addition to reducing the presence of *Prevotella*.

Key words: resveratrol, gut microbiota, high fat diet.

Correspondencia: Armando R. Tovar-Palacio
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Depto. Fisiología de la Nutrición. Av. Vasco de Quiroga No. 15, Col. Belisario Domínguez Sección XVI, C.P. 14080. CDMX, México.
Correo electrónico: tovar.ar@gmail.com

Recibido: enero 30, 2018.

Aceptado: marzo 9, 2018.

Long-Term Genistein Consumption Modifies Gut Microbiota, Improving Glucose Metabolism, Metabolic Endotoxemia, and Cognitive Function in Mice Fed a High-Fat Diet

Patricia López, Mónica Sánchez, Claudia Perez-Cruz, Laura A. Velázquez-Villegas, Tauqeerunnisa Syeda, Miriam Aguilar-López, Ana K. Rocha-Viggiano, María del Carmen Silva-Lucero, Ivan Torre-Villalvazo, Lilia G. Noriega, Nimbe Torres, and Armando R. Tovar*

Scope: The aim of this study is to assess whether the long-term addition of genistein to a high-fat diet can ameliorate the metabolic and the cognitive alterations and whether the changes can be associated with modifications to the gut microbiota.

Methods and results: C57/BL6 mice were fed either a control (C) diet, a high-fat (HF) diet, or a high-fat diet containing genistein (HFG) for 6 months. During the study, indirect calorimetry, IP glucose tolerance tests, and behavioral analyses were performed. At the end of the study, plasma, liver, brain, and fecal samples were collected. The results showed that mice fed the HFG diet gained less weight, had lower serum triglycerides, and an improvement in glucose tolerance than those fed an HF diet. Mice fed the HFG diet also modified the gut microbiota that was associated with lower circulating levels of lipopolysaccharide (LPS) and reduced expression of pro-inflammatory cytokines in the liver compared to those fed HF diet. The reduction in LPS by the consumption of genistein was accompanied by an improvement of the cognitive function.

Conclusions: Genistein is able to regulate the gut microbiota, reducing metabolic endotoxemia and decreasing the neuroinflammatory response despite the consumption of a HF diet.

1. Introduction

In recent years, the biological effects of dietary bioactive compounds, particularly polyphenols, have been actively investigated.^[1] These molecules present in foods can explain in part the health benefits attributed to the consumption of functional foods.^[2,3] Several studies in vitro and in experimental animals have demonstrated that polyphenols have biological effects, which, in many instances, positively produce health benefits that have been assessed in epidemiological and clinical studies in humans.^[1] The biological mechanisms by which polyphenols can produce these effects are not fully understood, and they are actively investigated in order to use these compounds as part of the strategies aimed at slowing or preventing the comorbidities associated with several chronic degenerative diseases, particularly those associated with obesity.^[4,5]

P. López, M. Sánchez, Dr. L. A. Velázquez-Villegas,^[+]
M. Aguilar-López,^[++] A. K. Rocha-Viggiano, Dr. I. Torre-Villalvazo,
Dr. L. G. Noriega, Dr. N. Torres, Dr. A. R. Tovar
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Av. Vasco de Quiroga No. 15, Belisario Domínguez Sección XVI, 14080
Ciudad de México, México
E-mail: tovar.ar@gmail.com

Dr. C. Perez-Cruz, T. Syeda, Dr. M. del Carmen Silva-Lucero^[+++]
Departamento de Farmacología
Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional
Av. Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360
Ciudad de México, México

[+] Present address: Laura A. Velázquez-Villegas: Laboratory of Metabolic Signalling, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland

[++] Present address: Miriam Aguilar-Lopez: Department Food Science and Human Nutrition, University of Illinois Urbana-Champaign, USA

[+++] Present address: María del Carmen Silva-Lucero: Universidad Politécnica de Huatusco, Veracruz, México

DOI: 10.1002/mnfr.201800313



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

2504 9:35
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO
12 JUL 2019
DMSE
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

Ciudad de México a 11 de julio de 2019.

No. Oficio CICUAL-177-19

M. EN C. PATRICIA LÓPEZ ROMERO
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.



ACUSE

Estimada Mtra. López:

El motivo de este oficio es relacionado a su proyecto con registro CINVA-FNU-1208-14/14-1, intitulado: "EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA", con el fin de cumplir con la normatividad de Transparencia e integrar expedientes completos a la plataforma Sistema de Portales de Obligaciones de Transparencia (SIPOT) a la brevedad, le solicitamos la siguiente información:

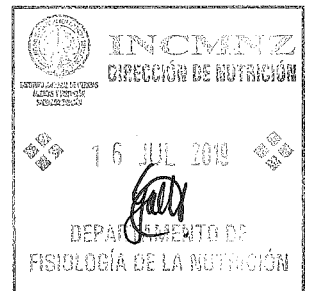
1. Producto derivado del proyecto (artículo científico)

Le pedimos que nos haga entrega de la información a más tardar 31 de julio de 2019, para reportarlo en los avances del mes de agosto.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB
JABP/bdr

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CDMX, a 26 de Marzo del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: **"Efecto del resveratrol y la genisteína sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa"** con registro **CINVA: FNU-1208-14/14-1**, debido a que el protocolo y la prórroga han concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente

M. en C. Patricia López Romero
Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Informe Final

Título del Proyecto: Efecto del resveratrol y la genisteína sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

El objetivo general del proyecto fue estudiar si la genisteína, el resveratrol o la combinación genisteína/resveratrol atenúan la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, debido a un incremento en el proceso del "browning" con respecto a aquellos que solo consumen dieta alta en grasa.

Se estudiaron 64 ratones C57BL6 machos de 9 semanas de edad y 20 g de peso. Los ratones fueron distribuidos en 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

C= control AIN93, CG=control+genisteína, CR=control+resveratrol, CGR=control+genisteína+resveratrol.

HF= dieta alta en grasa, HFG=dieta alta en grasa+genisteína, HFR=dieta alta en grasa+resveratrol, HFGR=dieta alta en grasa+genisteína+resveratrol

Las dietas experimentales contenían 0.2 % de genisteína, 0.1 % de resveratrol o la combinación de 0.2 % de genisteína + 0.1 % de resveratrol.

Los ratones se mantuvieron con libre acceso a la dieta y al agua durante seis meses.

Ganancia de peso. Se determinó la ganancia de peso de todos los ratones a lo largo del estudio. Los animales del grupo HF tuvieron la mayor ganancia de peso (22.7 g) con respecto a todos los grupos, mientras que los ratones del grupo CG fueron los que ganaron menor peso (8.22 g). En todos los grupos con genisteína, resveratrol o la combinación la ganancia de peso fue menor comparado con el grupo HF. Podemos decir que de manera general los compuestos bioactivos atenúan la ganancia de peso.

Prueba de tolerancia a la glucosa.

Durante el periodo de estudio se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de 2 horas. Los animales se mantuvieron en ayuno de 6 horas antes de la prueba y fueron inyectados por vía intraperitoneal con una solución de glucosa al 20 % a una concentración de 2.0 mg/g de peso corporal. Se colectaron aproximadamente 100 µL de sangre de la cola al

inicio, a los 15, 30, 60 y 120 min para determinar la concentración de la glucosa con un estuche de diagnóstico in vitro.

Los ratones alimentados con la dieta HFR tuvieron una menor área bajo la curva (ABC) de glucosa (30505) con respecto a todos los grupo, mientras que en el grupo que tuvo la dieta HF el ABC fue de (44999). Las diferencias no son significativas. El consumo de resveratrol podría inducir una mejor sensibilidad a la insulina.

Determinación de calorimetría indirecta. Para evaluar el gasto de energía los animales fueron colocados de manera individual en una cámara de flujo de aire constante. Todos los ratones fueron aclimatados por 24 h a las cajas del calorímetro, antes de determinar los parámetros fisiológicos. Una consecuencia del browning del tejido adiposo es el incremento en el gasto energético, en el presente estudio observamos que en el grupo CGR el consumo de oxígeno fue mayor tanto en ayuno como es postprandio (3114, 3651) respectivamente con respecto a todos los grupos, sin embargo el RER no disminuyó.

Después de cumplir con el respectivo tiempo de estudio, se llevo a cabo la eutanasia de los animales después de un ayuno de 4 horas. Se obtuvo sangre por punción de la vena hepática, músculo esquelético y tejido adiposo de todos los animales. Los tejidos se mantuvieron a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes.

En el suero se determinó la glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL mediante el equipo COBAS e insulina mediante un kit de ELISA.

Los ratones alimentados con la dieta HFGR tuvieron una menor disminución en la glucosa (227 mg/dl) y triglicéridos (75 mg/dl). Respecto a las concentraciones de colesterol e insulina se observa una disminución en los animales que consumieron la dieta CG (113, 0.38 ng) respectivamente. Los valores máximos en todas las variables bioquímicas fueron observadas en el grupo con la dieta HF.

En el músculo esquelético se evaluó AMPK, AMPK fósforilado, FNDC5, PGC-1 α por western blot. Los resultados más interesantes se obtuvieron en el músculo soleo. Se observó que el consumo de resveratrol en el grupo HFR incrementó la expresión de FNDC5 (2.05 unidades arbitrarias) PGC1- α (0.96 unidades arbitrarias) y la relación pAMPK/AMPK (4.28 unidades arbitrarias) en comparación con el grupo HF. En general podemos decir que el resveratrol podría ayudar a la expresión de FNDC5 en músculo a pesar de consumir un dieta HF.

En el tejido adiposo se evaluó PPAR γ , TBX, PGC-1 α , UCP-1 por western blot. Se observó un incremento en la expresión del gen PGC-1 α en el grupo HFR y HFG comparado con el grupo con dieta HF pero no de UCP-1.

Adicionalmente, se analizó la microbióta intestinal en las heces fecales y se determinó la expresión de algunos genes en cerebro.



M.enC. PATRICIA LÓPEZ ROMERO.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Productos derivados de la Investigación.

Actualmente estamos trabajando los resultados del estudio y preparando el artículo científico para ser enviado a publicación.

Atentamente

M. en C. Patricia López Romero

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 26 de Marzo de 2018

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión
de Investigación en Animales
P r e s e n t e

Estimada Dra. Bobadilla:

En respuesta a su solicitud del **Oficio No. CINVA 040-17**, anexo copias en impreso de los documentos requeridos:

1. Proyecto en extenso.
2. FAEP' modificado
3. Carta de cierre
4. Informe Final
5. Productos de Investigación derivados del Proyecto.

Sin más por el momento, quedo a sus órdenes para cualquier aclaración

Atentamente

M. en C. Patricia López Romero
Inv. Ciencias Médicas "C"
Depto. Fisiología de la Nutrición



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

14 MAR 2018

INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "S.Z."

1737 1115

Auto

México Cd. Mx., a 13 de marzo de 2018.

M. en C. Patricia López Romero
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente.

No. Oficio CINVA 040-17

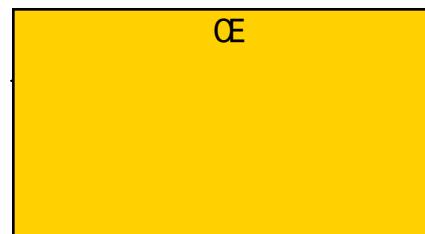
Estimada Dra. López.:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del Protocolo: **"EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA".** con registro CINVA FNU-1208-14/14-1. Debido a que el periodo de realización y la prórroga han concluido, le solicito de la manera más atenta lleve a cabo el cierre del proyecto y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Proyecto en extenso (primera y segunda revisión)
2. Forma Única de registro con firmas
3. FAEP modificado
4. Carta de cierre
5. Informe final
6. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, etc.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

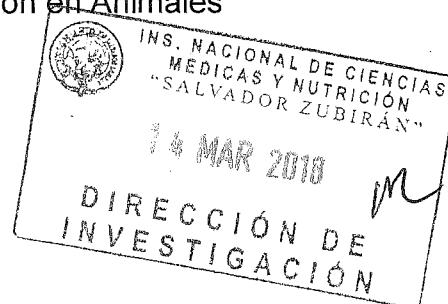


Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Avenida Vasco de Quiroga No. 14
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

Nom





Acuse

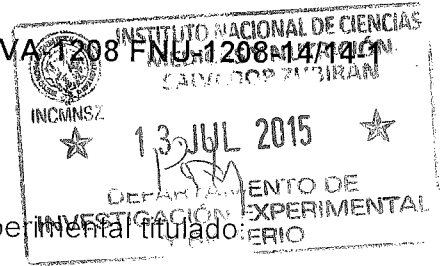
“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 10 de Julio del 2015.

M. en C. Patricia López Romero
Depto. de Fisiología de la Reproducción
Presente.

REF: CINVA-1208-FNU-1208-14/14-15



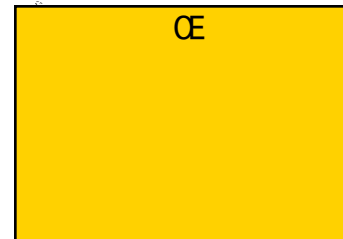
Estimada M. en C. López:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto del resveratrol y la genisteína sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa”

Este comité ha dictaminado **aprobar la prórroga con vigencia de dos años a partir de esta fecha.** En el caso de concluir antes el protocolo, favor de enviar la carta de cierre del mismo.

Sin más por el momento quedo de usted.

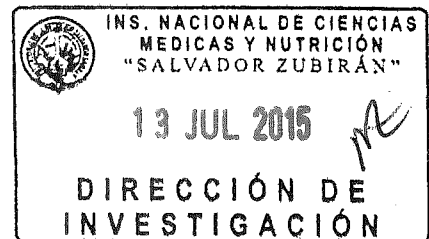


Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XV NAB/nom
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 07 de Julio del 2015.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Por este conducto le informo a usted que la prórroga que se esta solicitando para el proyecto de investigación titulado: **“EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA”** con registro **CINVA 1208**, Clave: FNU-1208-14/14-1 es debido a que los resultados de este primer estudio mostraron que el consumo de los compuestos bioactivos (resveratrol y genisteína) incrementan el proceso del “browning” del tejido adiposo blanco, incrementando particularmente la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), por lo que ahora es importante demostrar que bajo condiciones de un estrés ambiental como es la exposición a 4^o C el incremento en el browning es capaz de incrementar la termogénesis y de ahí prevenir un descenso mayor en la temperatura corporal, por lo que necesitamos evaluar todos los grupos (grupo control C, C+genisteína, C+resveratrol, C+genisteína y resveratrol, grupo con dieta alta en grasa HF, HF+genisteína, HF+resveratrol, HF+genisteína y resveratrol) para estudiar este aspecto fisiológico.

Agradezco la atención prestada a la presente.

Atentamente

M. en C. Patricia López Romero
Depto. De Fisiología de la Nutrición

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

C.C.P. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa de Bioterio





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. 02 de Julio del 2015.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Por este conducto le informo a usted que son 64 los ratones que se están considerando dentro de la prórroga del proyecto de investigación titulado: **"EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA"** con registro **CINVA 1208**, Clave: FNU-1208-14/14-1'. Los ratones se requieren ya que al termino del estudio no vimos diferencias claras en la ganancia de peso. Motivo por el cual se considera necesario incluir un grupo más de ratones los cuales serán sometidos a las siguientes determinaciones: consumo de alimento, ganancia de peso, curva de tolerancia a la glucosa, estudio de gasto calórico y eutanasia para la obtención de diferentes órganos. En cuanto requiera los animales los solicitaré por escrito.

Agradezco la atención prestada a la presente.

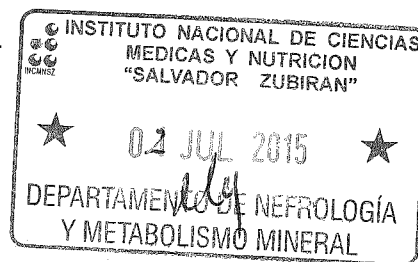
Atentamente

M. en C. Patricia López Romero
Depto. De Fisiología de la Nutrición

C.C.P. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.

MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa de Bioterio.

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN


ause

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F. a 23 de Junio del 2015

M. en C. Patricia López Romero
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente

 **INCMNSZ**
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

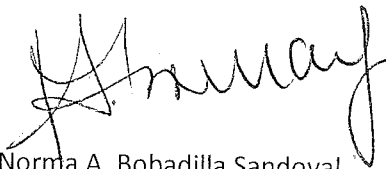
 23 JUN 2015 
DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

Estimada M. en C. López.:

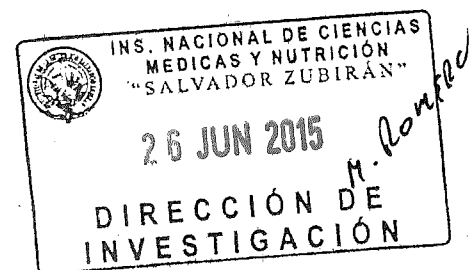
El 10 de Abril de este año le enviamos una carta donde le solicitamos que justificará el uso de los animales para la prórroga que solicitó de su protocolo "EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA", con registro CINVA: FNU-1208-14/14-1, sin embargo, no hemos tenido respuesta de usted, por lo que, le solicito de la manera más atenta nos indique si justificará el número de animales para la prórroga que solicitó, de no ser así, su proyecto será cerrado por este comité. Favor de llenar el formato de cierre que se anexa a la presente.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

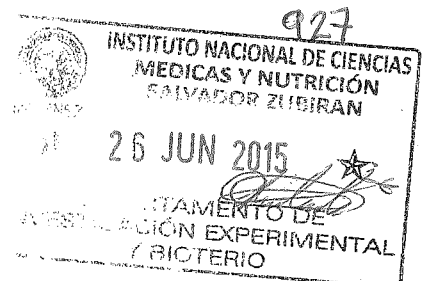
Atentamente,



Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



Avenida Vasco de Quiroga No. 15 c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
Colonia Belisario MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio.
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

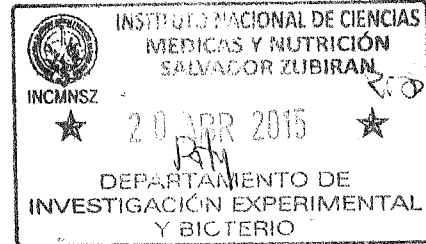




INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 20 de Abril del 2015.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

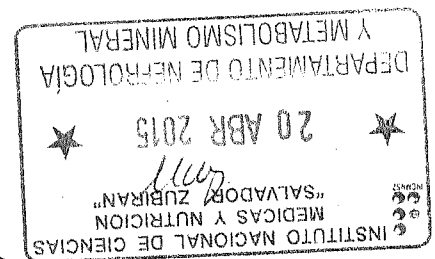


Por este conducto le informo a usted que los animales que se están considerando dentro de la prórroga del proyecto de investigación titulado: **“EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINÁ SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA”** con registro **CINVA 1208**, Clave: FNU-1208-14/14-1 se requerirán ya que al termino del estudio no vimos diferencias claras en la ganancia de peso de los ratones. Motivo por el cual se considera necesario incluir un grupo más de ratones los cuales serán sometidos a los mismos términos que se describen en el protocolo. En cuanto requiera los animales los solicitaré por escrito.

Agradezco la atención prestada a la presente.

Atentamente

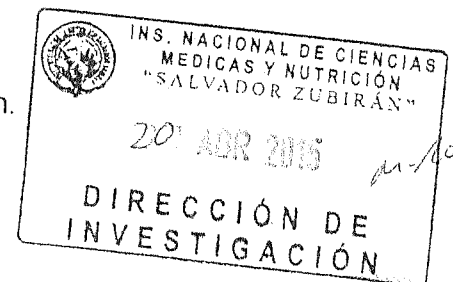
M. en C. Patricia López Romero
Depto. De Fisiología de la Nutrición



C.C.P. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

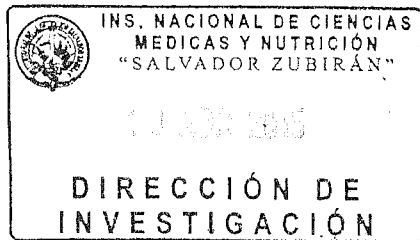
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa de Bioterio.





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"



México, D. F., a 10 de Abril del 2015.

M. en C. PATRICIA LÓPEZ ROMERO
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente.

REF: CINVA 1208, CLAVE FNU-1208-14/14-1

Estimada Dra. Bautista:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

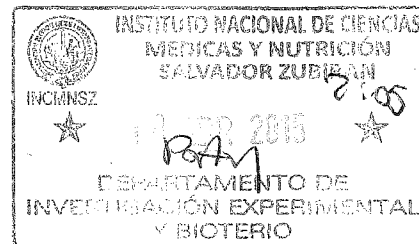
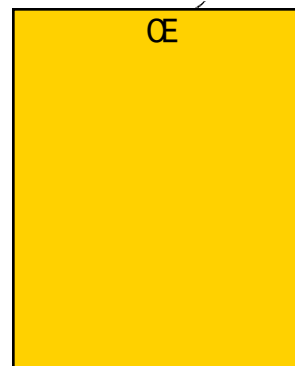
**"EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE
TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA."**

Este comité ha dictaminado no **aprobar la prórroga** hasta que no se justifique el uso de los animales.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

NAB/nom



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 19 de Marzo del 2015.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
P r e s e n t e

Por este conducto solicito a usted de la manera más atenta una prórroga para el proyecto de investigación titulado: "EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA" con registro CINVA 1208, Clave: FNU-1208-14/14-1. El periodo de extensión que solicito es por ocho meses. El número aproximado de animales que se requerirán es de 32, los cuales serán sometidos a los mismos términos que se describen en el protocolo. En cuanto requiera los animales los solicitaré por escrito.

Agradezco la atención prestada a la presente.

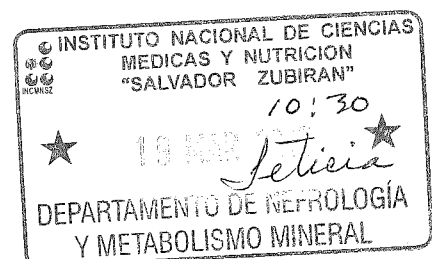
Atentamente

M. en C. Patricia López Romero
Depto. De Fisiología de la Nutrición

C.C.P. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.

MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa de Bioterio.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Acourse

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 4 de Marzo del 2015.

Dra. Patricia López Romero
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente

Estimada Dra. López:

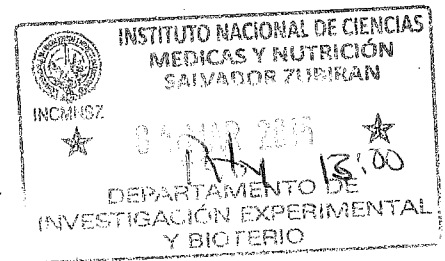
Por este conducto le informo que su proyecto: "EFECTO DEL RESVERATROL Y LA GENISTEINA SOBRE LA GENERACIÓN DE TEJIDO BEIGE EN RATONES ALIMENTADOS CON DIETA ALTA EN GRASA", con registro CINVA 1208 finalizó en el mes de febrero del año en curso. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de solicitar el cierre del protocolo.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten signature]

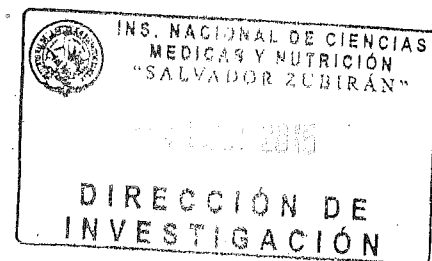
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



INCMNSZ
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

4 MAR 2015
DEPARTAMENTO DE
FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

[Handwritten signature]
Gerardo P.A.



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioerio.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Junio 26, 2014

Dr. Rafael Hernández González
Vocal de la Comisión de Investigación en Animales
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: "Efecto del resveratrol y la genistéina sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa".

Registro CINVA:1208
Clave: FNU-1208-14/14-1

Le envío la información faltante en el protocolo:

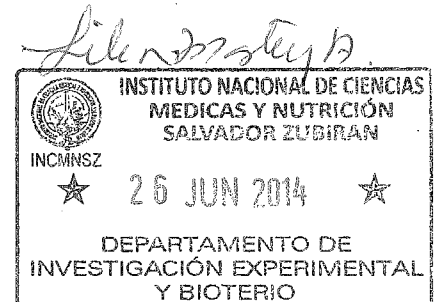
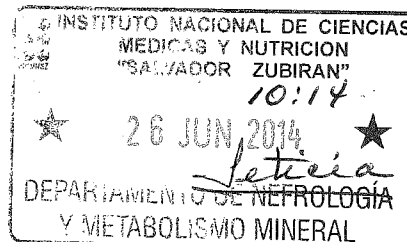
1. Descripción de la toma de muestra de sangre de la vena de la cola.
Curva de tolerancia a la glucosa: Con un bisturí se realizará una incisión de 2-3 milímetros en la parte terminal de la cola del ratón. Se obtendrán aproximadamente 20 μ L de sangre, los cuales se colocarán en una tira reactiva para glucómetro portátil. Se realiza la lectura de glucosa y se registra el valor.
2. Disposición de cadáveres
La disposición de cadáveres se realizará en bolsa amarilla de acuerdo a la NOM 087-ECOL-1995, publicada por la SEMARNAP en el diario oficial el martes 7 de Nov. De 1995.
3. Criterios de selección.
Se seleccionaran ratones de la cepa C57BL/6 macho, de 20-30 g, aproximadamente de 9-10 semanas.

Agradezco la atención prestada a la presente.

Atentamente
Lic. en Nut. Patricia López Romero

C.C.P. Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinador de la Comisión de Investigación en animales

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

INCMNSZ
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

Mayo 09, 2014

DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

Laura Zúñiga

Dra. Patricia López Romero,
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: **"Efecto del resveratrol y la genistéina sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa"**.

Registro CINVA: **1208**

Clave: 'FNU-1208-14/14-1'

Me permito informar a usted que la CINVA, determinó que se **APRUEBA** el protocolo condicionado a que se complete la siguiente información:

1. Descripción de la toma de muestra de sangre de la vena de la cola.
2. Disposición de cadáveres.
3. Los criterios de selección parecen criterios de exclusión.

Atentamente

Dr. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales






ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ. M.en C. Octavio Villanueva Sánchez. Secretario CINVA
MVZ.M.C. Ma. de la Luz Streber J. CINVA
Dra. Nimbe Torres y Torres.- CINVA
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval. CINVA
Dr. Gonzalo M. Torres Villalobos. CINVA
Dr. Emiliano Tesoro Cruz. CINVA
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán. CINVA

Nota: La presente carta sustituye a la anterior de Mayo 06, 2014.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

02/2015 J

Observaciones al protocolo FNU-1208-14/14-1. Efecto del resveratrol y de la genisteína sobre la generación de tejido Beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa

Dictámen / Resultado	Fecha comentario
<p>1  Con Observaciones (Revisor (Comisión de Investigación en Animales))</p>	<u>06/06/2014 1:43 pm</u>
<p>Alojamiento: dice que utilizarán cama de viruta de madera Hay que especificar si utilizaran cama tipo aspen o betachip para programar los pedidos de cama. Alojamiento: en un parrafo dice que serán 5 por microaislador y en otro que 4 ratones. Para la prueba de tolerancia a la glucosa los animales serán inyectados vía IP con una solución de glucosa al 20%. Falta indicar el sito anatómico preciso y de que lado. Se colectará aproximadamente 100µl de sangre de la cola en cada punto para determinar la concentración de glucosa En que parte de la cola van a colectar la sangre si van a tomar varios tiempos (15, 30, 60 y 120 minutos), se colocará algún catéter? Será una sola punción o varias? No se indica si se pesara a los animales diariamente, pero recordar que esto les genera estrés y evita la ganancia de peso corporal. NO se indica disposición de cadáveres.</p>	
<p>2  Con Observaciones (Revisor (Comisión de Investigación en Animales))</p>	<u>07/05/2014 1:07 pm</u>
<p>Falta especificar la disposición de cadáveres Es necesario corroborar la disponibilidad de los micro-aisladores para el mantenimiento de los ratones.</p>	
<p>3  Con Observaciones (Revisor (Comisión de Investigación en Animales))</p>	<u>29/04/2014 11:32 am</u>
<p>Deterimar el tamaño de muestra. Mencionar criterios de selección y realmente son de eliminación. Falta incluir los criterios para el punto final de experimentación. No menciona la disposición de los cadáveres.</p>	
<p>4  Aceptado (Revisor (Comisión de Investigación en Animales))</p>	<u>23/04/2014 8:48 am</u>
<p>Observaciones: - Describir el procedimiento para tomar la muestra de sangre de la cola para la prueba de tolerancia a la glucosa.- Describir cual será el procedimiento para el desecho de los cadáveres. Sugerencia: - En criterios de selección, la descripción que hacen de los parámetros parecen mas criterios de exclusión que de selección, se sugiere corregir selección por exclusión.</p>	
<p>5  Aprobado (Jefe Depto. Investigación)</p>	<u>26/03/2014 2:12 pm</u>



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN
DE PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH:

FNU-1208-14/14-1

1. Título del proyecto

Efecto del resveratrol y la genistéina sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
LOPEZ ROMERO PATRICIA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador responsable		
TORRE VILLALVÁZO IVAN	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

En la actualidad se han desarrollado en la población múltiples alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. Dentro de éstas, se encuentran la resistencia a la insulina, las dislipidemias y la lipotoxicidad entre otras. Se ha establecido recientemente que el tejido adiposo juega un papel central en el establecimiento de éstas anomalías metabólicas. Por lo que se han buscado nuevas estrategias para modificar la funcionalidad del tejido adiposo y de esta

manera corregir las alteraciones metabólicas que se presentan frecuentemente asociadas a lo que se denomina el síndrome metabólico. Dentro de estas estrategias, la dieta juega un papel fundamental, y en la actualidad se están utilizando alimentos funcionales que puedan tener efectos benéficos para la salud. Una característica de algunos alimentos funcionales es la presencia de compuestos bioactivos, los cuales tienen la capacidad de regular vías de transducción de señales, las cuales modifican la actividad de factores de transcripción que controlan las vías metabólicas.

Recientes estudios en el laboratorio mostraron inicialmente que el consumo de proteína de soya en la dieta, tanto en ratas como ratones atenúa la ganancia de peso a pesar de consumir dietas altas en grasa. Este efecto también fue observado en ratas sucker fa/fa, las cuales desarrollan obesidad debido a la carencia del receptor largo de leptina. Estudios posteriores mostraron que este efecto podía ser reproducido a través del consumo de las isoflavonas presentes en la proteína de soya, especialmente de la genisteína. La genisteína es un polifenol, y es la isoflavona más abundante en la proteína de soya. En todos estos estudios se demostró que la menor ganancia de peso en los animales que consumen proteína de soya o isoflavonas estaba dado por una disminución en la cantidad de grasa corporal.

Para entender el mecanismo a través del cual particularmente la genisteína podía lograr este efecto, se analizó si esta isoflavona era capaz de modificar la expresión del precursor de la miosina irisina, denominada FNDC5. Estudios en ratones alimentados con dieta adecuada en grasa mostraron que la genisteína era capaz de incrementar la expresión de FNDC5 y de irisina. Estudios previos por el grupo de Spiegelman y cols. Mostraron que la irisina es capaz de diferenciar los precursores de adipocitos en el tejido adiposo a una clase de adipocitos que forman lo que se conoce como grasa beige. Esta grasa beige posee características semejantes a las del tejido adiposo pardo debido a que en ambas se sobreexpresa la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual se encarga de generar termogénesis. Sin embargo, el perfil de expresión global entre el tejido adiposo beige y el tejido adiposo pardo muestran diferencias importantes, indicando que no son el mismo tejido. De hecho, el tejido adiposo pardo deriva del linaje que produce músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo beige proviene de células adiposas. Uno de los marcadores exclusivos del tejido adiposo beige es la proteína TBX1. Interesantemente hemos demostrado que el consumo de genisteína estimula la expresión de TBX1 en el tejido adiposo, lo que indica que esta isoflavona es capaz de estimular el proceso de "browning" del tejido adiposo, es decir estimular la formación de tejido adiposo beige.

Hemos estudiado si otros polifenoles tienen la capacidad de estimular este proceso de manera semejante a la genisteína, y hemos demostrado que el resveratrol, el cual se obtiene de la uva es capaz de generar este proceso.

Sin embargo en la actualidad no hemos conducido un estudio para demostrar que el consumo de genisteína, de resveratrol, o de la combinación de ambos sea capaz de disminuir la ganancia de peso en un modelo de obesidad inducida por dieta.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

El presente estudio pretende observar el efecto del consumo de una dieta alta en grasa con genisteína y/o resveratrol en la generación de "browning" en el tejido adiposo en ratones con obesidad inducida.

JUSTIFICACION :

Uno de los puntos de estudio sobre la obesidad que mayor importancia han cobrado en los últimos años es el estudio del tejido adiposo y sus funciones. Esto debido a la cantidad de implicaciones que se han descubierto entre la actividad de los adipocitos y las sustancias que los mismos producen, así como su relación con el síndrome metabólico y la lipotoxicidad.

Algunos estudios se han realizado sobre la capacidad del tejido adiposo blanco de convertirse en un tejido conocido como beige a través del proceso de "browning", el cual tiene la capacidad de aumentar la termogénesis y por ende el gasto calórico.

Uno de los mecanismos para generar esta producción es la práctica de actividad física, sin embargo, estudios recientes demuestran que el consumo de sustancias bioactivas tales como la genisteína y el resveratrol pueden tener el mismo efecto en modelos animales. No se han realizado estudios sobre modelos animales de obesidad, por lo que este estudio pretende dar respuesta de dichos efectos en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Todo esto con la finalidad de generar nuevos tratamientos para obesidad, síndrome metabólico, diabetes.

6a. Hipótesis

El consumo de genisteína, resveratrol, o la combinación de ambos en ratones que ingieren una dieta alta en grasa ganaran menor peso que las que solo consumen dieta alta en grasa. Estos cambios estarán dados por un incremento en las

concentraciones de FNDC5 en músculo, irisina en el suero, TBX1 en tejido adiposo y un incremento en el gasto calórico de estos animales.

6b. Objetivos.

General:

OBJETIVO.

Estudiar si la genisteína, el resveratrol o la combinación genisteína/resveratrol atenúan la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 3 meses, debido a un incremento en el proceso de "browning" con respecto a aquellas que solo consumen dieta alta en grasa.

Específicos:

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- a) Determinar la ganancia de peso de los ratones a lo largo del estudio.
- b) Determinar el consumo de alimento de los ratones a lo largo del estudio.
- c) Realizar el estudio de gasto calórico al inicio y al final del estudio, para determinar VO₂ y RER.
- d) Realizar la curva de tolerancia a la glucosa.
- e) AL final del estudio se obtendrá suero para determinar glucosa, perfil de lípidos, insulina, irisina.
- f) Se obtendrá el músculo esquelético para la cuantificación por Western Blot de AMPK y AMPK fosforilado, así como FNDC5.
- g) Se obtendrá tejido adiposo y se medirá la expresión de UCP1, TBX1, PDRM16.

7. Metodología: Diseño general.

Diseño general del estudio.

a) Estudio: Controlado

b) Descripción de la maniobra o intervención

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Modelo animal.

Se utilizarán a un total de 64 ratones C57BL6 macho de 20-30 gramos, los cuales serán mantenidos en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 será de 40 a 70 %. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de no mas de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua.

Los ratones se dividirán en 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno.

Las dietas experimentales contendrán 0.2% de genisteína, 0.1% de resveratrol o la combinación de 0.2% de genisteína + 0.1% de resveratrol. La composición de las dietas se muestra a continuación:

%	Control	C + Genisteína	C + Resveratrol	C+Genisteína y Resveratrol
Cistina	0.14	0.14	0.14	0.14
Colina	0.19	0.19	0.19	0.19
Vitaminas	1.89	1.89	1.89	1.89
Celulosa	2.84	2.84	2.84	2.84
Minerales	4.73	4.73	4.73	4.73
Inulina	-----			
Aceite de soya	5.16	5.16	5.16	5.16
Almidón	32.59	32.39	32.49	32.29
Dextrina	16.60	16.60	16.60	16.60
Sacarosa	16.00	16.00	16.00	16.00
Caseína	19.87	19.87	19.87	19.87
Manteca				
G		0.2		
R			0.1	
G + R				0.3

%	Dieta alta en grasa (HF)	HF + Genisteína	HF+ Resveratrol	HF + Genisteína y
---	--------------------------	-----------------	-----------------	-------------------

				Resveratrol
Cistina	0.17	0.17	0.17	0.17
Colina	0.23	0.23	0.23	0.23
Vitaminas	2.99	2.99	2.99	2.99
Celulosa	1.72	1.72	1.72	1.72
Minerales	5.75	5.75	5.75	5.75
Aceite de soya	5.75	5.75	5.75	5.75
Almidón				
Dextrina	29.46	29.46	29.46	29.46
Sacarosa	10.35	10.35	10.35	10.35
Caseína	24.14	24.14	24.14	24.14
Manteca	17.72	17.72	17.72	17.72
G		0.2		
R			0.1	
G + R				0.3

Los animales se mantendrán en grupos de 4 en los microcontenedores. El alimento cumplirá con las siguientes características: estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. Estará dentro de su periodo de caducidad. Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: se utilizará agua potable, en bebederos individuales de cristal con capacidad de 500 ml para administrarse las 24 horas. La cantidad a mantener en cada bebedero será de 250 ml diariamente.

Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción de la vena hepática previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre con una jeringa de insulina heparinizada, la sangre se colocará en criotubos de 2.5 ml para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, perfil de lípidos, irisina). Posteriormente se obtendrá el músculo esquelético y tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante una excisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C . En las muestras obtenidas de tejido muscular se realizaran los estudios siguientes: AMPK, AMPK fosforilado, FND5 y en las muestras de tejido adiposo se medirá la expresión de: UCP1, TBX1 y PDRM16.

Determinación de parámetros bioquímicos:

C= Control CG= Control+genisteína CR= Control+resveratrol CGR= Control+genisteína+resveratrol

HF=Dieta alta en grasa HFG=Dieta alta en grasa+genisteína HFR=Dieta alta en grasa+resveratrol HFGR=Dieta alta en grasa+genisteína y resveratrol.

G) 3 meses.

8. Metodología: Criterios de selección

Criterios de selección.

Se eliminarán del estudio los animales que presentan pérdida rápida de peso (20% del peso en un periodo de 2 a 10 días), así como aquellos que presenten diarrea o letargia y recumbencia persistentes.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Metodología y desenlace de las variables.

Estos parámetros fueron descritos en el diseño general.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Por medio de este estudio, se podrá iniciar el uso de una terapéutica novedosa para incrementar el gasto energético a través de la generación de tejido adiposo beige, lo que contribuiría a mejorar la sensibilidad a la insulina así como atenuar otras variables bioquímicas anormales que ocurren en personas obesas que desarrollan síndrome metabólico.

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : No aplica

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : No aplica

EFFECTOS ADVERSOS : No aplica

EFFECTOS PSICOLOGICOS : No aplica

METODOS DE SEGURIDAD : No aplica

PROCEDIMIENTOS : No aplica

OTRO TIPO DE RIESGO : No aplica

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN

Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

1. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-E452.
2. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, D. van Marken Lichtenbelt W, Hoeks J, Enerba S, Schrauwen P, M. Spiegelman B. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* July 20, 2012; 150: 366-376.
3. D. van Marken Lichtenbelt W, W. Vanhomerig J, M. Smulders N, M.A.F.L. Drossaerts J, J. Kemerink G, D. Bouvy N, Schrauwen P, Jaap Teule G. J. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*, april 9, 2009; 360;15.
4. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes*, July 2009; Vol. 58.
5. Young Huha J, Panagiotou G, Mougiosb V, Brinkoetter MT, Vamvinia M, E. Schneider B, S. Mantzoros C. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism Clinical and Experimental* 2012; 1725 - 1738.
6. A. Virtanen K, E. Lidell M, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N, Enerback S, Nuutila P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med* April, 2009; 360;15.
7. M. Cypess A, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, B. Goldfine A, C. Kuo F, L. Palmer E, Tseng Y, Doria A, M. Kolodny G, Kahn R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*; 360;15.
8. Boström P, Wu J, P. Jedrychowski M, Korde A, Ye L, C. Lo J, A. Rasbach K, Almer E, Hyun Choi J, Z. Long J, Kajimura S, Zingaretti M, F. Vind B, Tu H, Cinti S, Højlund K, P. Gygi P, M. Spiegelman B. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463-468.
9. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*. September 2009. Vol. 23
10. W. Dolinsky V, F. Rueda-Clausen C, S. Morton J, T. Davidge S, R.B. Dyck J. Continued Postnatal Administration of Resveratrol Prevents Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rat Offspring Born Growth Restricted. *Diabetes*, September 2011; Vol. 60: 2274-2284.
11. Ørgaard A, Jensen L. The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. *Experimental Biology and Medicine* June 22, 2013; 1066 :1080.
12. Zhong L, Mostoslavsky R. Fine Tuning Our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology. *Cell Metabolism*, June 8, 2011; 13: 621-626.

13. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011; 21: B1eB15.
14. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* June 2013, Vol. 34, No. 6: 347-355.
15. Jimenez-Gomez Y, A. Mattison J, J. Pearson K, Martin-Montalvo A, H. Palacios A, M. Sossong A, M. Ward T, M. Younts C, Lewis K, S. Allard J, L. Longo D, P. Belman J, M. Malagon M, Navas P, Sanghvi M, Moaddel R, M. Tilmont E, L. Herbert R, H. Morrell C, M. Egan J, A. Baur J, Ferrucci L, S. Bogan J, Bernier M, De Cabo R. Resveratrol Improves Adipose Insulin Signaling and Reduces the Inflammatory Response in Adipose Tissue of Rhesus Monkeys on High-Fat, High-Sugar Diet. *Cell Metabolism* 18 October 1, 2013. 533–545.
16. Palacios-Gonzalez B, Zarain-Herzberg A, Flores-Galicia I, G. Noriega L, Alemán-Escondrillas G, Zariñan T, Ulloa-Aguirre A, Torres N, Tovar A. 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* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2013.08.018>

PROYECTO EN EXTENSO

Efecto del resveratrol y la genisteína sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

INVESTIGADORES PARTICIPANTES.

Patricia López Romero	ICM-C	Investigador responsable
Ivan Torre Villalvazo	ICM-C	Investigador asociado
Nimbe Torres y Torres	ICM-F	Investigador asociado
Armando R. Tovar Palacio	Jefe de departamento	Investigador asociado

ANTECEDENTES.

En la actualidad se han desarrollado en la población múltiples alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. Dentro de éstas, se encuentran la resistencia a la insulina, las dislipidemias y la lipotoxicidad entre otras. Se ha establecido recientemente que el tejido adiposo juega un papel central en el establecimiento de estas anomalías metabólicas. Por lo que se han buscado nuevas estrategias para modificar la funcionalidad del tejido adiposo, y de esta manera corregir las alteraciones metabólicas que se presentan frecuentemente asociadas a lo que se denomina síndrome metabólico. Dentro de estas estrategias, la dieta juega un papel fundamental, y en la actualidad se están utilizando alimentos funcionales que pueden tener efectos benéficos para la salud. Una característica de algunos alimentos funcionales es la presencia de compuestos bioactivos, los cuales tienen la capacidad de regular vías de transducción de señales, las cuales modifican la actividad de factores de transcripción que controlan las vías metabólicas.

Recientes estudios en el laboratorio mostraron inicialmente que el consumo de proteína de soya en la dieta, tanto en ratas como en ratones atenúa la ganancia de peso a pesar de consumir dietas altas en grasa. Este efecto también fue observado en ratas Zucker fa/fa, las cuales desarrollan obesidad debido a la carencia del

receptor largo de leptina. Estudios posteriores mostraron que este efecto podía ser reproducido a través del consumo de las isoflavonas presentes en la proteína de soya, especialmente de la genisteína. La genisteína es un polifenol, y es la isoflavona más abundante en la proteína de soya. En todos estos estudios se demostró que la menor ganancia de peso en los animales que consumen proteína de soya o isoflavonas estaba dado por una disminución en la cantidad de grasa corporal.

Para entender el mecanismo a través del cual particularmente la genisteína podía lograr este efecto, se analizó si esta isoflavona era capaz de modificar la expresión del precursor de la miosina irisina denominada FNDC5. Estudios en ratones alimentados con dieta adecuada en grasa mostraron que la genisteína era capaz de incrementar la expresión de FNDC5 y de irisina. Estudios previos por el grupo de Spiegelman y cols. mostraron que la irisina es capaz de diferenciar los precursores de adipocitos en el tejido adiposo a una clase de adipocitos que forman lo que se conoce como grasa beige. Esta grasa beige posee características semejantes a las del tejido adiposo pardo debido a que en ambas se sobre expresa la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual se encarga de generar termogénesis. Sin embargo, el perfil de expresión global entre el tejido adiposo beige y el tejido adiposo pardo muestran diferencias importantes, indicando que no son el mismo tejido. De hecho, el tejido adiposo pardo deriva del linaje que produce músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo beige proviene de células adiposas. Uno de los marcadores exclusivos del tejido adiposo beige es la proteína TBX1. Interesantemente hemos demostrado que el consumo de genisteína estimula la expresión de TBX1 en el tejido adiposo, lo que indica que esta isoflavona es capaz de estimular el proceso de "browning" del tejido adiposo, es decir estimular la formación de tejido adiposo beige.

Hemos estudiado si otros polifenoles tienen la capacidad de estimular este proceso de manera semejante a la genisteína, y hemos demostrado que el resveratrol, el cual se obtiene de la uva es capaz de generar este proceso.

Sin embargo en la actualidad no hemos conducido un estudio para demostrar que el consumo de genisteína, de resveratrol, o de la combinación de ambos sea capaz de disminuir la ganancia de peso en un modelo de obesidad inducida por dieta.

DEFINICION DEL PROBLEMA

El presente estudio pretende observar el efecto del consumo de una dieta alta en grasa con genisteína y/o resveratrol en la generación del "browning" en el tejido adiposo en ratones con obesidad inducida.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los puntos de estudio sobre la obesidad que mayor importancia ha cobrado en los últimos años es el estudio del tejido adiposo y sus funciones. Esto debido a la cantidad de implicaciones que se han descubierto entre la actividad de los adipocitos y las sustancias que los mismos producen, así como su relación con el síndrome metabólico y la lipotoxicidad.

Algunos estudios se han realizado sobre la capacidad del tejido adiposo blanco de convertirse en un tejido conocido como beige a través del proceso de "browning", el cual tiene a capacidad de aumentar la termogénesis y por ende el gasto calórico.

Uno de los mecanismos para generar esta producción es la práctica de actividad física, sin embargo, estudios recientes demuestran que el consumo de sustancias bioactivas tales como la genisteína y el resveratrol pueden tener el mismo efecto en modelos animales. No se han realizado estudios sobre modelos animales de obesidad, por lo que este estudio pretende dar respuesta de dichos efectos en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Todo esto con la finalidad de generar nuevos tratamientos para la obesidad, síndrome metabólico y diabetes.

HIPÓTESIS.

El consumo de genisteína, resveratrol, o la combinación de ambos en ratones que ingieren una dieta alta en grasa ganarán menor peso que las que solo consumen

dieta alta en grasa. Estos cambios estarán dados por un incremento en las concentraciones de FNDC5 en músculo, irisina en el suero, TBX1 en tejido adiposo, y un incremento en el gasto calórico de estos animales.

OBJETIVO.

Estudiar si la genisteína, el resveratrol o la combinación genisteína/resveratrol atenúan la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 3 meses, debido a un incremento en el proceso de "browning" con respecto a aquellas que solo consumen dieta alta en grasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la ganancia de peso de los ratones a lo largo del estudio.
2. Determinar el consumo de alimento a lo largo del estudio.
3. Realizar el estudio de gasto calórico al inicio y al final del estudio, para determinar VO_2 y RER.
4. Realizar la curva de tolerancia a la glucosa.
5. Al final del estudio se obtendrá suero para determinar glucosa, perfil de lípidos, insulina, irisina.
6. Se obtendrá el músculo esquelético para la cuantificación por Western Blot de AMPK y AMPK fosforilado, así como FNDC5.
7. Se obtendrá tejido adiposo y se medirá la expresión de UCP1, TBX1, PDRM16.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Modelo animal

Se utilizarán a un total de 64 ratones C57BL6 machos de 20-30 gramos, los cuales serán mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 será de 40 a 70 %. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de no más de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua. Las dietas experimentales contendrán 0.2% de genisteína, 0.1% de resveratrol o la combinación de 0.2% de

genisteína + 0.1% de resveratrol. La composición de las dietas se muestra a continuación:

Dietas

%	C	CG	CR	CGR
Cistina	0.14	0.14	0.14	0.14
Colina	0.19	0.19	0.19	0.19
Vitaminas	1.89	1.89	1.89	1.89
Celulosa	2.84	2.84	2.84	2.84
Minerales	4.73	4.73	4.73	4.73
Inulina	-	-	-	-
Aceite de soya	5.16	5.16	5.16	5.16
Almidón	32.59	32.39	32.49	32.29
Dextrina	16.60	16.60	16.60	16.60
Sacarosa	16.00	16.00	16.00	16.00
Caseína	19.87	19.87	19.87	19.87
Manteca	-	-	-	-
Genisteína		0.2		
Resveratrol			0.1	
G + R				0.3

%	HF	HFG	HFR	HFGR
Cistina	0.17	0.17	0.17	0.17
Colina	0.23	0.23	0.23	0.23
Vitaminas	2.99	2.99	2.99	2.99
Celulosa	1.72	1.72	1.72	1.72
Minerales	5.75	5.75	5.75	5.75
Aceite de soya	5.75	5.75	5.75	5.75
Almidón	23.9	23.9	23.9	23.9
Dextrina	29.46	29.46	29.46	29.46
Sacarosa	10.35	10.35	10.35	10.35
Caseína	24.14	24.14	24.14	24.14
Manteca	17.72	17.72	17.72	17.72
Genisteína		0.2		
Resveratrol			0.1	
G + R				0.3

Grupos de tratamiento: Los ratones se dividirán en 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno.

	C	CG	CR	CGR	HF	HFG	HFR	HFGR
Control	+	+	+	+	-	-	-	-
Alta en grasa	-	-	-	-	+	+	+	+
Genisteína	-	+	-	+	-	+	-	+
Resveratrol	-	-	+	+	-	-	+	+
n (ratones)	8	8	8	8	8	8	8	8

C=control, CG=control+genisteína, CR=control+resveratrol, CGR=control+genisteína+resveratrol.
 HF= dieta alta en grasa, HFG=dieta alta en grasa+genisteína, HFR=dieta alta en grasa+resveratrol,
 HFGR=dieta alta en grasa+genisteína+resveratrol.

Determinación parámetros bioquímicos.

Para la prueba de tolerancia a la glucosa los animales serán inyectados vía intraperitoneal con una solución de glucosa al 20 % a una concentración de 2.0 mg/g de peso corporal, la glucosa sanguínea será evaluada a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Se colectarán aproximadamente 100 µL de sangre de la cola en cada punto para determinar la concentración de glucosa. La concentración de glucosa se analizará por el método de glucosa oxidasa con un estuche de diagnóstico in vitro.

Se evaluará la concentración de insulina por radioinmunoensayo, la concentración del perfil lipídico en suero se realizará por medio de un kit colorimétrico. La concentración de irisina se medirá por medio de un kit de ELISA.

Determinación de pAMPK, UCP1, AMPK, FNDC5, TBX1 y PDRM16 por medio de la técnica de inmunoblot.

Determinación de calorimetría. El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta (Oxymax, Columbus Instruments). Los animales serán colocados en una cámara con flujo de aire constante que será monitoreado por flujometro sensible a masas. Las concentraciones de O₂ y CO₂ serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de O₂ y el coeficiente de respiración (RQ).

Tamaño de muestra: 64 ratones de la cepa C57BL6.

Mecanismos de asignación al tratamiento: Abierto

Criterios de selección: Se eliminarán del estudio los animales que presenten pérdida rápida de peso (20 % del peso en un periodo de 2 a 10 días) así como aquellos que presenten diarrea o letargia persistentes.

Riesgos y beneficios del estudio. Por medio de este estudio, se podrá iniciar el uso de una terapia novedosa para incrementar el gasto energético a través de la generación de tejido adiposo beige, lo que contribuiría a mejorar la sensibilidad a la insulina, así como para atenuar otras variables bioquímicas anormales que ocurren en personas obesas que desarrollan síndrome metabólico.

Bibliográfia.

1. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444–E452.
2. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, D. van Marken Lichtenbelt W, Hoeks J, Enerba S, Schrauwen P, Spiegelman B. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* July 20, 2012; 150: 366–376.
3. D. van Marken Lichtenbelt W, W. Vanhomerig J, M. Smulders N, M.A.F.L. Drossaerts J, J. Kemerink G, D. Bouvy N, Schrauwen P, Jaap Teule G. J. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*, april 9, 2009; 360;15.
4. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes*, July 2009; Vol. 58.
5. Young Huha J, Panagiotou G, Mougiosb V, Brinkoetter MT, Vamvinia M, E. Schneider B, S. Mantzoros C. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism Clinical and Experimental* 2012; 1725 – 1738.
6. A. Virtanen K, E. Lidell M, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N, Enerbäck S, Nuutila P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med* April, 2009; 360;15.
7. M. Cypess A, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, B. Goldfine A, C. Kuo F, L. Palmer E, Tseng Y, Doria A, M. Kolodny G, Kahn R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*; 360;15.
8. Boström P, Wu J, P. Jedrychowski M, Korde A, Ye L, C. Lo J, A. Rasbach K, Almer E, Hyun Choi J, Z. Long J, Kajimura S, Zingaretti M, F. Vind B, Tu H, Cinti S, Højlund K, P. Gygi P, M. Spiegelman B. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463–468.
9. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*. September 2009. Vol. 23.

10. W. Dolinsky V, F. Rueda-Clausen C, S. Morton J, T. Davidge S, R.B. Dyck J. Continued Postnatal Administration of Resveratrol Prevents Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rat Offspring Born Growth Restricted. *Diabetes*, September 2011; Vol. 60: 2274-2284.
11. Ørsgaard A, Jensen L. The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. *Experimental Biology and Medicine* June 22, 2013; 1066 :1080.
12. Zhong L, Mostoslavsky R. Fine Tuning Our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology. *Cell Metabolism*, June 8, 2011; 13: 621-626.
13. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011; 21: B1eB15.
14. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* June 2013, Vol. 34, No. 6: 347-355.
15. Jimenez-Gomez Y, A. Mattison J, J. Pearson K, Martin-Montalvo A, H. Palacios A, M. Sossong A, M. Ward T, M. Younts C, Lewis K, S. Allard J, L. Longo D, P. Belman J, M. Malagon M, Navas P, Sanghvi M, Moaddel R, M. Tilmont E, L. Herbert R, H. Morrell C, M. Egan J, A. Baur J, Ferrucci L, S. Bogan J, Bernier M, De Cabo R. Resveratrol Improves Adipose Insulin Signaling and Reduces the Inflammatory Response in Adipose Tissue of Rhesus Monkeys on High-Fat, High-Sugar Diet. *Cell Metabolism* 18 October 1, 2013. 533-545.
16. Palacios-Gonzalez B, Zarain-Herzberg A, Flores-Galicia I, G. Noriega L, Alemán-Escondrillas G, Zariñan T, Ulloa-Aguirre A, Torres N, Tovar A. 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* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2013.08.018>



Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

Folio del registro: FNU-1208-14/14-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto: Efecto del resveratrol y la genisteína sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

Tipo de proyecto: Investigación Experimental

Antecedentes: En la actualidad se han desarrollado en la población múltiples alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. Dentro de éstas, se encuentran la resistencia a la insulina, las dislipidemias y la lipotoxicidad entre otras. Se ha establecido recientemente que el tejido adiposo juega un papel central en el establecimiento de éstas anomalías metabólicas. Por lo que se han buscado nuevas estrategias para modificar la funcionalidad del tejido adiposo y de esta manera corregir las alteraciones metabólicas que se presentan frecuentemente asociadas a lo que se denomina el síndrome metabólico. Dentro de estas estrategias, la dieta juega un papel fundamental, y en la actualidad se están utilizando alimentos funcionales que puedan tener efectos benéficos para la salud. Una característica de algunos alimentos funcionales es la presencia de compuestos bioactivos, los cuales tienen la capacidad de regular vías de transducción de señales, las cuales modifican la actividad de factores de transcripción que controlan las vías metabólicas.

Recientes estudios en el laboratorio mostraron inicialmente que el consumo de proteína de soya en la dieta, tanto en ratas como ratones atenúa la ganancia de peso a pesar de consumir dietas altas en grasa. Este efecto también fue observado en ratas sucker fa/fa, las cuales desarrollan obesidad debido a la carencia del receptor largo de leptina. Estudios posteriores mostraron que este efecto podía ser reproducido a través del consumo de las isoflavonas presentes en la proteína de soya, especialmente de la genisteína. La genisteína es un polifenol, y es la isoflavona más abundante en la proteína de soya. En todos estos estudios se demostró que la menor ganancia de peso en los animales que consumen proteína de soya o isoflavonas estaba dado por una disminución en la cantidad de grasa corporal.

Para entender el mecanismo a través del cual particularmente la genisteína podía lograr este efecto, se analizó si esta isoflavona era capaz de modificar la expresión del precursor de la miosina irisina denominada FNDC5. Estudios en

ratones alimentados con dieta adecuada en grasa mostraron que la genisteína era capaz de incrementar la expresión de FNDC5 y de irisina. Estudios previos por el grupo de Spiegelman y cols. Mostraron que la irisina es capaz de diferenciar los precursores de adipocitos en el tejido adiposo a una clase de adipocitos que forman lo que se conoce como grasa beige. Esta grasa beige posee características semejantes a las del tejido adiposo pardo debido a que en ambas se sobreexpresa la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual se encarga de generar termogénesis. Sin embargo, el perfil de expresión global entre el tejido adiposo beige y el tejido adiposo pardo muestran diferencias importantes, indicando que no son el mismo tejido. De hecho, el tejido adiposo pardo deriva del linaje que produce músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo beige proviene de células adiposas. Uno de los marcadores exclusivos del tejido adiposo beige es la proteína TBX1. Interesantemente hemos demostrado que el consumo de genisteína estimula la expresión de TBX1 en el tejido adiposo, lo que indica que esta isoflavona es capaz de estimular el proceso de "browning" del tejido adiposo, es decir estimular la formación de tejido adiposo beige. Hemos estudiado si otros polifenoles tienen la capacidad de estimular este proceso de manera semejante a la genisteína, y hemos demostrado que el resveratrol, el cual se obtiene de la uva es capaz de generar este proceso. Sin embargo en la actualidad no hemos conducido un estudio para demostrar que el consumo de genisteína, de resveratrol, o de la combinación de ambos sea capaz de disminuir la ganancia de peso en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Definición del problema:

[if !supportLists]-->• El presente estudio pretende observar el efecto del consumo de una dieta alta en grasa con genisteína y/o resveratrol en la generación de "browning" en el tejido adiposo en ratones con obesidad inducida.
[if !supportLists]-->•

Justificación:

Uno de los puntos de estudio sobre la obesidad que mayor importancia han cobrado en los últimos años es el estudio del tejido adiposo y sus funciones. Esto debido a la cantidad de implicaciones que se han descubierto entre la actividad de los adipocitos y las sustancias que los mismos producen, así como su relación con el síndrome metabólico y la lipotoxicidad.

Algunos estudios se han realizado sobre la capacidad del tejido adiposo blanco de convertirse en un tejido conocido como beige a través del proceso de "browning", el cual tiene la capacidad de aumentar la termogénesis y por ende el gasto calórico.

Uno de los mecanismos para generar esta producción es la práctica de actividad física, sin embargo, estudios recientes demuestran que el consumo de sustancias bioactivas tales como la genisteína y el resveratrol pueden tener el mismo efecto en modelos animales. No se han realizado estudios sobre modelos animales de obesidad, por lo que este estudio pretende dar respuesta de dichos efectos en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Todo esto con la finalidad de generar nuevos tratamientos para obesidad, síndrome metabólico, diabetes.

Hipótesis:

El consumo de genisteína, resveratrol, o la combinación de ambos en ratones que ingieren una dieta alta en grasa ganaran menor peso que las que solo consumen dieta alta en grasa. Estos cambios estarán dados por un incremento en las concentraciones de FNDC5 en músculo, irisina en el suero, TBX1 en tejido adiposo y un incremento en el gasto calórico de estos animales.

Fecha estimada de inicio:

01/04/2014

Fecha estimada de término:

01/12/2014

Comisión a la que somete**¿Incluye documentos anexos?:**

No

Investigadores participantes**(0) Comentarios**

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Lopez Romero, Patricia	Investigador responsable	1	Si
Tovar Palacio, Armando Roberto	Investigador asociado	2	No
TORRES Y TORRES, NIMBE	Investigador asociado	3	No
Torre Villalvazo, Ivan	Investigador asociado	4	No

Población vulnerable**(0) Comentarios**

Población vulnerable vinculado al protocolo

Ninguna de las anteriores

Otra población::

El estudio se llevará a cabo con ratones de la cepa C57BL6

Objetivos**(0) Comentarios**

Objetivo:

OBJETIVO.

Estudiar si la genisteína, el resveratrol o la combinación genisteína/resveratrol atenúan la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 3 meses, debido a un incremento en el proceso de "browning" con respecto a aquellas que solo consumen dieta alta en grasa.

Tipo de objetivo:

General

Objetivo:

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

[if !supportLists]-->1. a) Determinar la ganancia de peso de los ratones a lo largo del estudio.
-[if !supportLists]-->2. b) Determinar el consumo de alimento de los ratones a lo largo del estudio.

- [if !supportLists]-->E3.c) Realizar el estudio de gasto calórico al inicio y al final del estudio, para determinar VO2 y RER.
- [if !supportLists]-->4. d) Realizar la curva de tolerancia a la glucosa.
- [if !supportLists]-->5. e) AL final del estudio se obtendrá suero para determinar glucosa, perfil de lípidos, insulina, irisina.
- [if !supportLists]-->6. f) Se obtendrá el músculo esquelético para la cuantificación por Western Blot de AMPK y AMPK fosforilado, así como FNDC5.
- [if !supportLists]-->7. Se obtendrá tejido adiposo y se medirá la expresión de UCPI, TBX1, PDRM16.

Tipo de objetivo:

Específico (s)

Metodología: Diseño general

(0) Comentarios

Metodología gral:

Diseño general del estudio.

a) Estudio: Controlado

b) Descripción de la maniobra o intervención

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Modelo animal.

Se utilizarán a un total de 64 ratones C57BL6 macho de 20-30 gramos, los cuales serán mantenidos en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 será de 40 a 70 %. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de no mas de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua.

Los ratones se dividirán en 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno.

Las dietas experimentales contendrán 0.2% de genisteína, 0.1% de resveratrol o la combinación de 0.2% de genisteína + 0.1% de resveratrol. La composición de las dietas se muestra a continuación:

%	Control	C + Genisteína	C + Resveratrol	C+Genisteína y Resveratrol
Cistina	0.14	0.14	0.14	0.14
Colina	0.19	0.19	0.19	0.19
Vitaminas	1.89	1.89	1.89	1.89
Celulosa	2.84	2.84	2.84	2.84
Minerales	4.73	4.73	4.73	4.73
Inulina	-----			
Aceite de soya	5.16	5.16	5.16	5.16
Almidón	32.59	32.39	32.49	32.29
Dextrina	16.60	16.60	16.60	16.60
Sacarosa	16.00	16.00	16.00	16.00
Caseína	19.87	19.87	19.87	19.87
Manteca				
G		0.2		

R			0.1	
G + R				0.3

%	Dieta alta en grasa (HF)	HF + Genisteína	HF+ Resveratrol	HF + Genisteína y Resveratrol
Cistina	0.17	0.17	0.17	0.17
Colina	0.23	0.23	0.23	0.23
Vitaminas	2.99	2.99	2.99	2.99
Celulosa	1.72	1.72	1.72	1.72
Minerales	5.75	5.75	5.75	5.75
Aceite de soya	5.75	5.75	5.75	5.75
Almidón				
Dextrina	29.46	29.46	29.46	29.46
Sacarosa	10.35	10.35	10.35	10.35
Caseína	24.14	24.14	24.14	24.14
Manteca	17.72	17.72	17.72	17.72
G		0.2		
R			0.1	
G + R				0.3

Los animales se mantendrán en grupos de 4 en los microcontenedores. El alimento cumplirá con las siguientes características: estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. Estará dentro de su periodo de caducidad. Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: se utilizará agua potable, en bebederos individuales de cristal con capacidad de 500 ml para administrarse las 24 horas. La cantidad a mantener en cada bebedero será de 250 ml diariamente.

Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción de la vena hepática previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre con una jeringa de insulina heparinizada, la sangre se colocará en criotubos de 2.5 ml para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, perfil de lípidos, irisina). Posteriormente se obtendrá el músculo esquelético y tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante una excisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C. En las muestras obtenidas de tejido muscular se realizaran los estudios siguientes: AMPK, AMPK fosforilado, FND5 y en las muestras de tejido adiposo se medirá la expresión de: UCP1, TBX1 y PDRM16.

Determinación de parámetros bioquímicos:

Para la prueba de tolerancia a la glucosa los animales serán inyectados vía IP con una solución de glucosa al 20% a una concentración de 2.0 mg/g del peso corporal, la glucosa sanguínea será evaluada a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección. Se colectará aproximadamente 100µl de sangre de la cola en cada punto para determinar la concentración de glucosa se analizará por el método glucosa oxidasa con un estuche de diagnóstico in vitro.

Se evaluará la concentración de insulina por radioinmunoensayo, la concentración del perfil lipídico en suero se realizará por medio de un kit colorimétrico. La concentración de irisina se medirá por kit de ELISA.

Determinación de pAMPK, UCPI, AMPK, FNDC5, TBX1 y PDRM16 por medio de a técnica de inmunoblot.

Determinación de Calorimetría.

El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta (Oxymax, Columbus Instruments). Los animales serán colocados en una cámara con flujo de aire constante que será monitoreado por flujometro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO₂ serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de O₂ y el coeficiente de respiración (RQ).

c) Tamaño de la muestra: 64 ratones de la cepa C57BL6.

d) No aplica

e) Mecanismos de asignación del tratamiento. Abierto

f) Grupos de tratamiento.

	C	CG	CR	CGR	HF	HFG	HFR	HFGR
Control	+	+	+	+	-	-	-	-
Alta en grasa	-	-	-	-	+	+	+	+
Genisteína	-	+	-	+	-	+	-	+
Resveratrol	-	-	+	+	-	-	+	+
N (ratones)	8	8	8	8	8	8	8	8

C= Control CG= Control+genisteína CR= Control+resveratrol CGR= Control+genisteína+resveratrol

HF=Dieta alta en grasa HFG=Dieta alta en grasa+genisteína HFR=Dieta alta en grasa+resveratrol HFGR=Dieta alta en grasa+genisteína y resveratrol.

G) 3 meses.

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo:

Criterios de selección.

Se eliminarán del estudio los animales que presentan pérdida rápida de peso (20% del peso en un periodo de 2 a 10 días), así como aquellos que presenten diarrea o letargia y recumbencia persistentes.

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

para incrementar el gasto energético a través de la generación de tejido adiposo beige, lo que contribuiría a mejorar la sensibilidad a la insulina así como atenuar otras variables bioquímicas anormales que ocurren en personas obesas que desarrollan síndrome metabólico.

Tipo de beneficio: Beneficios directos esperados

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables: Metodología y desenlace de las variables.
Estos parámetros fueron descritos en el diseño general.

Manejo de confidencialidad

(0) Comentarios

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.: No aplica.

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

(0) Comentarios

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: No aplica.

Riesgo (s) del estudio

(0) Comentarios

Complicaciones del procedimiento: No aplica

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas: No aplica

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: No aplica

Procedimientos a seguir para resolver los

riesgos en caso de que se presenten: No aplica

Otro tipo de riesgo: No aplica

Consentimiento informado

(0) Comentarios

Hoja de informe al paciente: [HOJA DE INFORME AL PACIENTE.pdf](#)

Carta de consentimiento informado: [CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.pdf](#)

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de investigadores: [Declaración de los investigadores.pdf](#)

© 2009 Portal INNSZ Instituto
Nacional de Ciencias Medicas y
Nutricion Salvador Zubiran Vasco
de Quiroga 15, Colonia Seccion
XVI, Tlalpan C.P.14000, Mexico
D.F., MEXICO Telefono: (52 55)
5487 0900

© 2009 LATIS. All rights
Reserved.
LATIS development, The power of
the information



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

CÓMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN
DE PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

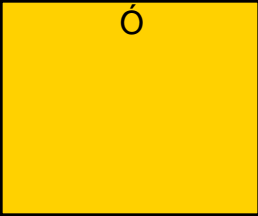
No. de registro CIIBH: FNU-1208-14/14-1

1. Título del proyecto

Efecto del resveratrol y la genistéina sobre la generación de tejido beige en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
LOPEZ ROMERO PATRICIA	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador responsable		
TORRE VILLALVAZO IVAN	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED C	Investigador asociado		
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador asociado		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

En la actualidad se han desarrollado en la población múltiples alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. Dentro de éstas, se encuentran la resistencia a la insulina, las dislipidemias y la lipotoxicidad entre otras. Se ha establecido recientemente que el tejido adiposo juega un papel central en el establecimiento de éstas anomalías metabólicas. Por lo que se han buscado nuevas estrategias para modificar la funcionalidad del tejido adiposo y de esta

manera corregir las alteraciones metabólicas que se presentan frecuentemente asociadas a lo que se denomina el síndrome metabólico. Dentro de estas estrategias, la dieta juega un papel fundamental, y en la actualidad se están utilizando alimentos funcionales que puedan tener efectos benéficos para la salud. Una característica de algunos alimentos funcionales es la presencia de compuestos bioactivos, los cuales tienen la capacidad de regular vías de transducción de señales, las cuales modifican la actividad de factores de transcripción que controlan las vías metabólicas.

Recientes estudios en el laboratorio mostraron inicialmente que el consumo de proteína de soya en la dieta, tanto en ratas como ratones atenúa la ganancia de peso a pesar de consumir dietas altas en grasa. Este efecto también fue observado en ratas sucker *fa/fa*, las cuales desarrollan obesidad debido a la carencia del receptor largo de leptina. Estudios posteriores mostraron que este efecto podía ser reproducido a través del consumo de las isoflavonas presentes en la proteína de soya, especialmente de la genisteína. La genisteína es un polifenol, y es la isoflavona más abundante en la proteína de soya. En todos estos estudios se demostró que la menor ganancia de peso en los animales que consumen proteína de soya o isoflavonas estaba dado por una disminución en la cantidad de grasa corporal.

Para entender el mecanismo a través del cual particularmente la genisteína podía lograr este efecto, se analizó si esta isoflavona era capaz de modificar la expresión del precursor de la miosina irisina denominada FNDC5. Estudios en ratones alimentados con dieta adecuada en grasa mostraron que la genisteína era capaz de incrementar la expresión de FNDC5 y de irisina. Estudios previos por el grupo de Spiegelman y cols. Mostraron que la irisina es capaz de diferenciar los precursores de adipocitos en el tejido adiposo a una clase de adipocitos que forman lo que se conoce como grasa beige. Esta grasa beige posee características semejantes a las del tejido adiposo pardo debido a que en ambas se sobreexpresa la proteína desacoplante 1 (UCP1), la cual se encarga de generar termogénesis. Sin embargo, el perfil de expresión global entre el tejido adiposo beige y el tejido adiposo pardo muestran diferencias importantes, indicando que no son el mismo tejido. De hecho, el tejido adiposo pardo deriva del linaje que produce músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo beige proviene de células adiposas. Uno de los marcadores exclusivos del tejido adiposo beige es la proteína TBX1. Interesantemente hemos demostrado que el consumo de genisteína estimula la expresión de TBX1 en el tejido adiposo, lo que indica que esta isoflavona es capaz de estimular el proceso de "browning" del tejido adiposo, es decir estimular la formación de tejido adiposo beige.

Hemos estudiado si otros polifenoles tienen la capacidad de estimular este proceso de manera semejante a la genisteína, y hemos demostrado que el resveratrol, el cual se obtiene de la uva es capaz de generar este proceso.

Sin embargo en la actualidad no hemos conducido un estudio para demostrar que

el consumo de genisteína, de resveratrol, o de la combinación de ambos sea capaz de disminuir la ganancia de peso en un modelo de obesidad inducida por dieta.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

El presente estudio pretende observar el efecto del consumo de una dieta alta en grasa con genisteína y/o resveratrol en la generación de "browning" en el tejido adiposo en ratones con obesidad inducida.

JUSTIFICACION :

Uno de los puntos de estudio sobre la obesidad que mayor importancia han cobrado en los últimos años es el estudio del tejido adiposo y sus funciones. Esto debido a la cantidad de implicaciones que se han descubierto entre la actividad de los adipocitos y las sustancias que los mismos producen, así como su relación con el síndrome metabólico y la lipotoxicidad.

Algunos estudios se han realizado sobre la capacidad del tejido adiposo blanco de convertirse en un tejido conocido como beige a través del proceso de "browning", el cual tiene la capacidad de aumentar la termogénesis y por ende el gasto calórico.

Uno de los mecanismos para generar esta producción es la práctica de actividad física, sin embargo, estudios recientes demuestran que el consumo de sustancias bioactivas tales como la genisteína y el resveratrol pueden tener el mismo efecto en modelos animales. No se han realizado estudios sobre modelos animales de obesidad, por lo que este estudio pretende dar respuesta de dichos efectos en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Todo esto con la finalidad de generar nuevos tratamientos para obesidad, síndrome metabólico, diabetes.

6a. Hipótesis

El consumo de genisteína, resveratrol, o la combinación de ambos en ratones que ingieren una dieta alta en grasa ganaran menor peso que las que solo consumen dieta alta en grasa. Estos cambios estarán dados por un incremento en las concentraciones de FNDC5 en músculo, irisina en el suero, TBX1 en tejido

adiposo y un incremento en el gasto calórico de estos animales.

6b. Objetivos.

General:

OBJETIVO.

Estudiar si la genisteína, el resveratrol o la combinación genisteína/resveratrol atenúan la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 3 meses, debido a un incremento en el proceso de "browning" con respecto a aquellas que solo consumen dieta alta en grasa.

Específicos:

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- a) Determinar la ganancia de peso de los ratones a lo largo del estudio.
 - b) Determinar el consumo de alimento de los ratones a lo largo del estudio.
 - c) Realizar el estudio de gasto calórico al inicio y al final del estudio, para determinar VO₂ y RER.
 - d) Realizar la curva de tolerancia a la glucosa.
 - e) AL final del estudio se obtendrá suero para determinar glucosa, perfil de lípidos, insulina, irisina.
 - f) Se obtendrá el músculo esquelético para la cuantificación por Western Blot de AMPK y AMPK fosforilado, así como FNDC5.
- Se obtendrá tejido adiposo y se medirá la expresión de UCP1, TBX1, PDRM16.

7. Metodología: Diseño general.

Diseño general del estudio.

a) Estudio: Controlado

b) Descripción de la maniobra o intervención

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Modelo animal.

Se utilizarán a un total de 64 ratones C57BL/6 macho de 20-30 gramos, los cuales serán mantenidos en el bioterio del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMNSZ) a una temperatura de 22 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 será de 40 a 70 %. Los animales se mantendrán en microaisladores con cama de viruta de madera a una densidad de no mas de 5 ratones por caja con libre acceso a la dieta y al agua.

Los ratones se dividirán en 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno.

Las dietas experimentales contendrán 0.2% de genisteína, 0.1% de resveratrol o la combinación de 0.2% de genisteína + 0.1% de resveratrol. La composición de las dietas se muestra a continuación:

%	Control	C + Genisteína	C + Resveratrol	C+Genisteína y Resveratrol
Cistina	0.14	0.14	0.14	0.14
Colina	0.19	0.19	0.19	0.19
Vitaminas	1.89	1.89	1.89	1.89
Celulosa	2.84	2.84	2.84	2.84
Minerales	4.73	4.73	4.73	4.73
Inulina	-----			
Aceite de soya	5.16	5.16	5.16	5.16
Almidón	32.59	32.39	32.49	32.29
Dextrina	16.60	16.60	16.60	16.60
Sacarosa	16.00	16.00	16.00	16.00
Caseína	19.87	19.87	19.87	19.87
Manteca				
G		0.2		
R			0.1	
G + R				0.3

%	Dieta alta en grasa (HF)	HF + Genisteína	HF+ Resveratrol	HF Genisteína y Resveratrol
Cistina	0.17	0.17	0.17	0.17

Colina	0.23	0.23	0.23	0.23
Vitaminas	2.99	2.99	2.99	2.99
Celulosa	1.72	1.72	1.72	1.72
Minerales	5.75	5.75	5.75	5.75
Aceite de soya	5.75	5.75	5.75	5.75
Almidón				
Dextrina	29.46	29.46	29.46	29.46
Sacarosa	10.35	10.35	10.35	10.35
Caseína	24.14	24.14	24.14	24.14
Manteca	17.72	17.72	17.72	17.72
G		0.2		
R			0.1	
G + R				0.3

Los animales se mantendrán en grupos de 4 en los microcontenedores. El alimento cumplirá con las siguientes características: estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. Estará dentro de su periodo de caducidad. Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: se utilizará agua potable, en bebederos individuales de cristal con capacidad de 500 ml para administrarse las 24 horas. La cantidad a mantener en cada bebedero será de 250 ml diariamente.

Para la obtención de muestras y tejidos después de las 12 semanas del estudio, los animales se desangrarán por punción de la vena hepática previa eutanasia por saturación con dióxido de carbono por ser un método rápido y sin sufrimiento, el cual permite obtener el máximo volumen de sangre. Se recolectará la sangre con una jeringa de insulina heparinizada, la sangre se colocara en criotubos de 2.5 ml para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales (glucosa, insulina, perfil de lípidos, irisina). Posteriormente se obtendrá el músculo esquelético y tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante una excisión quirúrgica. Las muestras de estos tejidos se colocaran en criotubos, se congelaran inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaran a -70°C. En las muestras obtenidas de tejido muscular se realizaran los estudios siguientes: AMPK, AMPK fosforilado, FND5 y en las muestras de tejido adiposo se medirá la expresión de: UCP1, TBX1 y PDRM16.

Determinación de parámetros bioquímicos:

Para la prueba de tolerancia a la glucosa los animales serán inyectados vía IP con una solución de glucosa al 20% a una concentración de 2.0 mg/g del peso corporal, la glucosa sanguínea será evaluada a los 15, 30, 60 y 120 minutos

posteriores a la inyección. Se colectará aproximadamente 100µl de sangre de la cola en cada punto para determinar la concentración de glucosa se analizará por el método glucosa oxidasa con un estuche de diagnóstico in vitro.

Se evaluará la concentración de insulina por radioinmunoensayo, la concentración del perfil lipídico en suero se realizará por medio de un kit colorimétrico. La concentración de irisina se medirá por kit de ELISA.

Determinación de pAMPK, UCP1, AMPK, FNDC5, TBX1 y PDRM16 por medio de a técnica de inmunoblot.

• Determinación de Calorimetría.

El gasto de energía será evaluado utilizando calorimetría indirecta (Oxymax, Columbus Instruments). Los animales serán colocados en una cámara con flujo de aire constante que será monitoreado por flujómetro sensible a masas. Las concentraciones de oxígeno y CO₂ serán evaluadas a la entrada y a la salida de la cámara para calcular el consumo de O₂ y el coeficiente de respiración (RQ).

c) Tamaño de la muestra: 64 ratones de la cepa C57BL6.

d) No aplica

e) Mecanismos de asignación del tratamiento. Abierto

f) Grupos de tratamiento.

	C	CG	CR	CGR	HF	HFG	HFR	HFGR
Control	+	+	+	+	-	-	-	-
Alta en grasa	-	-	-	-	+	+	+	+
Genisteína	-	+	-	+	-	+	-	+
Resveratrol	-	-	+	+	-	-	+	+
N (ratones)	8	8	8	8	8	8	8	8

C= Control CG= Control+genisteína CR= Control+resveratrol CGR= Control+genisteína+resveratrol

HF=Dieta alta en grasa HFG=Dieta alta en grasa+genisteína HFR=Dieta alta en grasa+resveratrol HFGR=Dieta alta en grasa+genisteína y resveratrol.

G) 3 meses.

8. Metodología: Criterios de selección

Criterios de selección.

Se eliminarán del estudio los animales que presentan pérdida rápida de peso (20% del peso en un periodo de 2 a 10 días), así como aquellos que presenten diarrea o letargia y recumbencia persistentes.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Metodología y desenlace de las variables.

Estos parámetros fueron descritos en el diseño general.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Por medio de este estudio, se podrá iniciar el uso de una terapéutica novedosa para incrementar el gasto energético a través de la generación de tejido adiposo beige, lo que contribuiría a mejorar la sensibilidad a la insulina así como atenuar otras variables bioquímicas anormales que ocurren en personas obesas que desarrollan síndrome metabólico.

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : No aplica

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : No aplica

EFFECTOS ADVERSOS : No aplica

EFFECTOS PSICOLOGICOS : No aplica

METODOS DE SEGURIDAD : No aplica

PROCEDIMIENTOS : No aplica

OTRO TIPO DE RIESGO : No aplica

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00

Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

1. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E444-E452.
2. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, D. van Marken Lichtenbelt W, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman B. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* July 20, 2012; 150: 366-376.
3. D. van Marken Lichtenbelt W, W. Vanhomerig J, M. Smulders N, M.A.F.L. Drossaerts J, J. Kemerink G, D. Bouvy N, Schrauwen P, Jaap Teule G. J. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*, april 9, 2009; 360;15.
4. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes*, July 2009; Vol. 58.
5. Young Huha J, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter MT, Vamvina M, E. Schneider B, S. Mantzoros C. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism Clinical and Experimental* 2012; 1725-1738.
6. A. Virtanen K, E. Lidell M, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N, Enerbäck S, Nuutila P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N Engl J Med* April, 2009; 360;15.
7. M. Cypess A, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, B. Goldfine A, C. Kuo F, L. Palmer E, Tseng Y, Doria A, M. Kolodny G, Kahn R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*; 360;15.
8. Boström P, Wu J, P. Jedrychowski M, Korde A, Ye L, C. Lo J, A. Rasbach K, Almer E, Hyun Choi J, Z. Long J, Kajimura S, Zingaretti M, F. Vind B, Tu H, Cinti S, Højlund K, P. Gygi P, M. Spiegelman B. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463-468.
9. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S. The presence of UCPI demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*. September 2009. Vol. 23
10. W. Dolinsky V, F. Rueda-Clausen C, S. Morton J, T. Davidge S, R.B. Dyck J. Continued Postnatal Administration of Resveratrol Prevents Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rat Offspring Born Growth Restricted. *Diabetes*, September 2011; Vol. 60: 2274-2284.
11. Ørgaard A, Jensen L. The Effects of Soy Isoflavones on Obesity. *Experimental Biology and Medicine* June 22, 2013; 1066 :1080.
12. Zhong L, Mostoslavsky R. Fine Tuning Our Cellular Factories: Sirtuins in Mitochondrial Biology. *Cell Metabolism*, June 8, 2011; 13: 621-626.
13. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011; 21: B1eB15.
14. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* June 2013, Vol. 34, No. 6: 347-355.
15. Jimenez-Gomez Y, A. Mattison J, J. Pearson K, Martin-Montalvo A, H. Palacios A, M. Sossong A, M. Ward T, M. Younts C, Lewis K, S. Allard J, L. Longo D, P. Belman J, M. Malagon M, Navas P, Sanghvi M, Moaddel R, M. Tilmont E, L. Herbert R, H. Morrell C, M. Egan J, A. Baur J, Ferrucci L, S. Bogan J, Bernier M, De Cabo R. Resveratrol Improves Adipose Insulin Signaling and Reduces the Inflammatory Response in

Adipose Tissue of Rhesus Monkeys on High-Fat, High-Sugar Diet. *Cell Metabolism* 18 October 1, 2013. 533–545.

16. Palacios-Gonzalez B, Zarain-Herzberg A, Flores-Galicia I, G. Noriega L, Alemán-Escondrillas G, Zariñan T, Ulloa-Aguirre A, Torres N, Tovar A. 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* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.08.018>

- A) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**