

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Programa de Doctorado en Fisiología**



ACTIVACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DEL RATÓN MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON RESVERATROL O GENISTEÍNA.

TESIS DOCTORAL presentada por:
LUCIA GIMENO MALLECH

Y dirigida por:

Dr. José Viña Ribes

Dr. Juan Gambini Buchón

Dra. Consuelo Borrás Blasco

Valencia. 2018

Prof. D. José Viña Ribes, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Prof. D. Juan Gambini Buchón, Profesor Contratado Doctor del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que Dña. Lucia Gimeno Mallench, Licenciada en Bioquímica por la Universidad de València y Máster en Investigación Biomédica por la misma Universidad, ha realizado bajo su dirección para la obtención del título de Doctor la presente Tesis Doctoral titulada:

**ACTIVACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DEL RATÓN
MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON RESVERATROL O
GENISTEÍNA.**

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Valencia en el año 2018.

D. José Viña Ribes

D. Juan Gambini Buchón

Dña. Consuelo Borrás Blasco

AGRADECIMIENTOS

Y llegados a este punto pienso en todos estos años, no recuerdo el momento en el que inicie este largo camino. Pero ahora que finalmente llegó el día, soy consciente más que nunca que sin vuestra ayuda este momento hubiera sido inalcanzable, por eso quiero dar las gracias a todas las personas que lo habéis hecho posible.

A mis directores, al Dr. José Viña, Pepe gracias por hacerme partícipe de la familia científica que lideras, por confiar en mí y haber guiado mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

Al Dr. Juan Gambini, Juan, gracias por enseñarme a trabajar en una bancada, porque nunca olvidaré mis primeros días y tu maravillosa frase “pregúntate el por qué” que tanto me han ayudado en el día a día en el laboratorio. Pero sobre todo, por no cerrar nunca la puerta de tu despacho y estar dispuesto a escucharme, guiarme, aconsejarme y darme fuerzas para seguir, incluso cuando ni yo misma creía que las cosas iban a salir.

A la Dra. Consuelo Borrás, Chelo nunca olvidaré aquel día en el que contestaste un “sí, por supuesto que venga cuando quiera” a esa llamada, gracias a eso estoy aquí. Pero sobre todo gracias por tu cariño y comprensión durante estos años, por estar siempre dispuesta a tenderme una mano y mantener viva la ilusión por la ciencia.

A mis chicas del labo que han estado a lo largo de toda esta etapa. Mar, gracias por guiarme y cuidarme en estos años y por convertirte en mi mami de Valencia. Marta, gracias por cogerme de la mano en mis primeros pasos por el laboratorio, porque tu corazón vale millones y contigo sobran las

palabras, sabes que sin ti este día no hubiera llegado. Cris, que te voy a decir, con tu dulzura haces que cada día sea único y maravilloso. Esther, tus curiosos consejos, nuestros maravillosos ratos “a la babala” y las largas conversaciones, han sido una parte muy importante de estos años. Andrea, siempre atenta y cercana capaz de entenderme incluso cuando ni yo misma lo hacía. Chicas gracias porque en poco tiempo habéis pasado de ser mis compañeras a algo más que mis amigas, como yo os digo mi familia en Valencia.

A los compañeros del laboratorio que estaban cuando llegué, Kheira, Bea, Helena, Vicent, Tanja, por acogerme en mis primeros pasos por el laboratorio. A los que se han ido sumando durante este tiempo y con los cuales he ido compartiendo grandes momentos no solo dentro sino también fuera del laboratorio: Paloma, Raquel, Adrian, Aitor, Coralie, Jorge. A las últimas incorporaciones, Dani, Marta, Fer, Aurora, por vuestro interés en nuestro trabajo, vuestra alegría y ganas de aprender. Y en general a los estudiantes y a los que habéis pasado una estancia con nosotros: Frederic, Miriam, Ruben, Victor, Riccardo, Tina, Elisabetta, Piero, Luana, Helen, Carla, Rita... por aportar vuestro granito de arena.

A Ana, Mari Carmen, Gloria y Eva, gracias por estar ahí siempre que os he necesitado, por vuestras conversaciones en los pasillos y esas sonrisas de ánimo que nunca faltan.

A los técnicos, secretarias, veterinarias y personal, tanto del departamento de Fisiología como de la UCIM gracias por su imprescindible ayuda en la burocracia y en el trabajo del día a día. Agradecer al servicio de imagen molecular y metabolómica, en especial a María por su paciencia y buen trato.

No me puedo olvidar de “mis bioquímicas”: Silvia, Susana, Paloma y Cris, gracias por estar ahí en todo momento, por cada cerveza, merienda y aventura que hemos vivido juntas y que tan necesarias han sido en los buenos y no tan buenos momentos. Gracias a mis princesas: Noe, Lidia, Sonia y Laura, que pese a la distancia siempre estáis para apoyarme y ayudarme en todas las decisiones, os quiero.

A mis amigas, Maria, Monica y Raquel gràcies perquè no sé que seria de mi sense els moments de desconexió i per fer-me veure la vida des d'un món no científic, sobretot a tu Raquel que et recorde sempre al meu costat en aquest llarg camí, desde el primer dia de cole, tot i que moltes voltes et parle chino (que si DNA, proteïnes, PCR, western) sempre estàs per escoltar-me i ajudar-me. A Luci, Jesús, Sandra, Jaime, Zina, Javi, Carlos, Cris, María y vuestros peques, gracias por hacerme ver en todo momento el verdadero sentido de la vida.

Ya por último a mi familia: A mis ti@s y prim@s, gràcies en especial a Maijo, Abe's e Israel perquè les vostres locures i aventures em fan sentir viva i especial. També a tu Sari, perquè mai et falta el somriure i les paraules d'ànim, saps que eres una més de la família. Al mes avis, Carmen i Pepe, per cuidar-me i amar-me dia a dia, Pepe saps que si tu no hagueses passat tantes hores ensenya'n-me a sumar la meua vida no hauria arribat a aquest punt. Teta, tu eres un pilar en la meua vida, sempre m'has donat suport en tot allò que he decidit i estàs ahí en tot moment, sense tu jo no soc ningú. Abel gràcies, per ajudar-me sempre, i perquè junts heu dut al món l'alegria que m'ha permès oblidar-me de qualsevol angoixa en aquesta última etapa. Gràcies peque per el teu somriure incondicional.

Per últim als mes importants, els meus pares, Mari Carmen i Jose Luis, sé el gran esforç que heu fet al llarg de la vida perquè jo poguera estudiar i complir el meu somni de ser bioquímica i investigar, gràcies per estar sempre al meu costat recolzant totes les decisions, gràcies a vosaltres sóc qui sóc. Aquesta tesi també es vostra, ja que és el fruit del vostre esforç.

A MI FAMILIA

ÍNDICE

ÍNDICE	11
1 INTRODUCCIÓN	29
1.1 Metabolismo energético	31
1.1.1 Gasto energético	31
1.1.2 Calculo del gasto energético	32
1.1.2.1 Cociente respiratorio.....	34
1.1.3 Metabolismo glucídico	36
1.1.4 Metabolismo lipídico	41
1.1.4.1 Entrada y transporte de ácidos grasos en la célula.....	42
1.1.4.2 Oxidación de ácidos grasos	45
1.1.4.3 Síntesis de ácidos grasos	47
1.1.4.4 Regulación del metabolismo lipídico	48
1.1.5 Implicación de las hormonas en el metabolismo.....	53
1.2 Metabolómica.....	56
1.2.1 Espectroscopia RMN.....	57
1.3 Polifenoles	59
1.3.1 Definición.....	59
1.3.2 Clasificación	60
1.3.2.1 Ácidos fenólicos.....	61
1.3.2.2 Estilbenos	61
1.3.2.3 Alcoholes fenólicos.....	62

1.3.2.4 Lignanos.....	62
1.3.2.5 Flavonoides.....	62
1.3.3 Resveratrol	65
1.3.3.1 Historia	65
1.3.3.2 Propiedades físicas y químicas	66
1.3.3.3 Metabolismo y biodisponibilidad	68
1.3.3.4 Potenciales efectos del resveratrol sobre la salud.....	69
1.3.4 Genisteína.....	69
1.3.4.1 Historia	70
1.3.4.2 Epidemiología	71
1.3.4.3 Mecanismo de acción.....	72
1.3.4.4 Farmacocinética	73
1.3.4.5 Potenciales efectos de la genisteína sobre la salud	75
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	77
2.1 Hipótesis	79
2.2 Objetivos.....	79
2.2.1 Objetivo general	79
2.2.2 Objetivos específicos	79
3 MATERIAL Y MÉTODOS	81
3.1 Materiales.....	83
3.1.1 Animales de experimentación.....	83

3.1.2 Aparatos	83
3.1.3 Reactivos.....	87
3.2 Métodos.....	89
3.2.1 Tratamiento	89
3.2.1.1.1 Tratamiento con genisteína	89
3.2.1.1.2 Tratamiento con resveratrol	89
3.2.1.1.3 Tratamiento con vehículo	89
3.2.2 Gasto metabólico en reposo	90
3.2.3 Sacrificio de los animales.....	91
3.2.4 Extracción y conservación de muestras	91
3.2.5 Determinación de proteínas por <i>western blotting</i>	92
3.2.5.1.1 Extracción de proteínas.....	92
3.2.5.1.2 Determinación de proteínas: método de Lowry.	92
3.2.5.1.3 Western blotting	96
3.2.6 Determinación de la expresión génica	101
3.2.6.1.1 Aislamiento de RNA.....	101
3.2.6.1.2 Determinación de pureza e integridad del RNA total ..	103
3.2.6.1.3 Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR) en tiempo real.....	103
3.2.6.1.4 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)	104

3.2.6.1.5	Amplificación cuantitativa del RNA (RT-PCR) a tiempo real.....	106
3.2.7	Determinación de la actividad fosfofructokinasa.	113
3.2.8	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	116
3.2.8.1.1	Determinación de los niveles de Insulina.....	117
3.2.8.1.2	Determinación de los niveles de malonil-CoA	119
3.2.8.1.3	Determinación de los niveles de carnitina-acilcarnitina translocasa	122
3.2.9	Determinación del perfil metabolómico en plasma mediante resonancia magnética nuclear	123
3.2.10	Análisis estadístico de los resultados.....	126
4	RESULTADOS	129
4.1	Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el gasto energético en ratones macho de 18 meses de edad	131
4.1.1	Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el cociente respiratorio.....	131
4.1.2	Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el peso de los ratones.....	135
4.2	Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el metabolismo glucídico.....	136
4.2.1	Papel de Akt en el metabolismo glucídico	136
4.2.2	Papel de PFK en el metabolismo glucídico	138

4.2.3 Análisis de los niveles de insulina en ratones tratados con resveratrol o genisteína	141
4.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el metabolismo lipídico	142
4.3.1.1 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína, sobre el metabolismo	142
4.3.2 Papel de ACC1, tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína, sobre el metabolismo.....	146
4.3.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre malonil-CoA.....	150
4.3.4 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la activación de los ácidos grasos de cadena larga.....	153
4.3.5 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el sistema carnitina palmitoil transferasa	155
4.3.6 Estudio de CPT1 tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína.....	155
4.3.7 Estudio de CACT tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína.....	157
4.3.8 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la degradación oxidativa de los ácidos grasos.....	162
4.4 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la biogénesis mitocondrial.....	165

4.5 Determinación del perfil metabolómico del plasma tras la administración de resveratrol o genisteína.....	167
5 DISCUSIÓN.....	173
5.1 Justificación del estudio	175
5.2 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el gasto energético.....	177
5.3 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el metabolismo glucídico	180
5.3.1 Papel de Akt en el metabolismo glucídico	180
5.3.2 Papel de PFK en el metabolismo glucídico.....	182
5.3.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre los niveles de insulina.....	184
5.4 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el metabolismo lipídico..	186
5.4.1 Papel de la proteína quinasa activada por AMP sobre el metabolismo	186
5.4.2 Papel de ACC1 sobre el metabolismo	187
5.4.3 Efecto del resveratrol o genisteína sobre malonil-CoA.....	189
5.4.4 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la activación de los ácidos grasos de cadena larga	190
5.4.5 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el sistema carnitina palmitoil transferasa.....	191
5.4.5.1 Papel de la cantina palmitoiltransferasa-1 (CPT1) en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial.....	191

5.4.5.2 Papel de carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial.....	192
5.4.6 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la degradación oxidativa de los ácidos grasos	194
5.5 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la biogénesis mitocondrial.....	196
5.6 Estudio del perfil metabolómico tras el tratamiento con resveratrol o genisteína.....	198
5.7 Consideraciones finales sobre el tratamiento con resveratrol o genisteína en el metabolismo energético	200
6 CONCLUSIONES	203
7 BIBLIOGRAFÍA	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de las diferentes etapas de la glucólisis.	38
Figura 1.2: transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria a través del sistema carnitina palmitoil transferasa.....	45
Figura 1.3: Esquema de la β -oxidación de los ácidos grasos	46
Figura 1.4: Estructura química de los polifenoles.....	60
Figura 1.5: Estructura química de los flavonoides.	63
Figura 1.6: Estructura química del <i>trans</i> -resveratrol y <i>cis</i> -resveratrol.	67
Figura 1.7: Similitud estructural entre el 17β -estradiol y la isoflavona genisteína.....	70
Figura 3.1 Esquema electroforesis SDS-PAGE.....	99
Tabla 3.1: Descripción de los anticuerpos utilizados para Western blotting.	100
Tabla 3.2: Componentes de la <i>mix</i> de retrotranscripción.	105
Figura 3.2: Cinética de amplificación de PCR a tiempo real (Ct).	108
Tabla 3.3: Secuencia de los cebadores utilizados en las PCR.	109
Tabla 3.4: qPCR componentes de la mezcla.	110
Tabla 3.5: Condiciones del termociclador para RT-PCR.....	111
Figura 3.3: Unión específica antígeno anticuerpo en el método ELISA.....	117
Figura 4.1: Producción de CO ₂ , consumo de O ₂ de los ratones antes y después del tratamiento.....	132
Figura 4.2: Media del cociente respiratorio, antes del tratamiento y durante 24 horas tras la administración del tratamiento.	133
Figura 4.3: Cociente respiratorio antes del tratamiento y durante 24 horas tras la administración del tratamiento.	134

Figura 4.4: Peso de los ratones antes y después del tratamiento.	135
Figura 4.5: Niveles del mRNA de Akt en hígado de ratones.	137
Figura 4.6: Niveles del mRNA de Akt en gastrocnemio de ratones.	137
Figura 4.7: Niveles del mRNA de Akt en tejido adiposo inguinal de ratones.	138
Figura 4.8: Niveles del mRNA de PFK1, actividad PFK en hígado de ratones.	139
Figura 4.9: Niveles del mRNA de PFK, actividad de PFK en gastrocnemio de ratones.	140
Figura 4.10: Niveles del mRNA de PFK1 en tejido adiposo inguinal de ratones.	140
Figura 4.11: Concentración de Insulina en plasma de ratones tras el tratamiento.	141
Figura 4.12: Niveles del mRNA de AMPK α en hígado de ratones.	143
Figura 4.13: Niveles de proteína p-AMPK α , AMPK α y p-AMPK α /AMPK en hígado de ratones.	144
Figura 4.14: Niveles del mRNA de AMPK α en gastrocnemio de ratones. .	145
Figura 4.15: Niveles del mRNA de AMPK α en tejido adiposo inguinal de ratones.	145
Figura 4.16: Niveles del mRNA de ACC1 en hígado de ratones.	147
Figura 4.17: Niveles de la proteína ACC1 en hígado de ratones.....	148
Figura 4.18: Niveles del mRNA de ACC1 en gastrocnemio de ratones.....	149
Figura 4.19: Niveles del mRNA de ACC1 en tejido adiposo inguinal de ratones.	149
Figura 4.20: Niveles de malonil-CoA en hígado de ratones.....	150

Figura 4.21: Niveles de malonil-CoA en gastrocnemio de ratones.....	151
Figura 4.22: Niveles de malonil-CoA en tejido adiposo inguinal de ratones.	152
Figura 4.23: Niveles del mRNA de ACSL en gastrocnemio de ratones.	154
Figura 4.24: Niveles del mRNA de ACSL en tejido adiposo inguinal de ratones.	154
Figura 4.25: Niveles del mRNA de CPT1 en hígado de ratones.	155
Figura 4.26: Niveles del mRNA de CPT1 en gastrocnemio de ratones.	156
Figura 4.27: Niveles del mRNA de CPT1 en tejido adiposo inguinal de ratones.	157
Figura 4.28: Niveles de la proteína CACT en hígado de ratones.....	158
Figura 4.29: Niveles del mRNA de CACT en gastrocnemio de ratones.	158
Figura 4.30: Niveles de la proteína CACT en gastrocnemio de ratones. ...	159
Figura 4.31: Niveles del mRNA de CACT en tejido adiposo inguinal de ratones.	160
Figura 4.32: Niveles de la proteína CACT en tejido adiposo inguinal de ratones.	161
Figura 4.33: Niveles del mRNA de Echs en hígado de ratones.	162
Figura 4.34: Niveles del mRNA de Echs en gastrocnemio de ratones.	163
Figura 4.35: Niveles del mRNA de Echs en tejido adiposo inguinal de ratones.	164
Figura 4.36: Niveles del mRNA de PGC1 α en hígado de ratones.....	165
Figura 4.37: Niveles del mRNA de PGC1 α en gastrocnemio de ratones. ..	166
Figura 4.38: PLSDA de muestras de plasma de ratones tratados con genisteína o como control.	168
Tabla 4.1: VIP score de los metabolitos.	169

Figura 4.39: PLSDA de muestras de plasma de ratones tratados con resveratrol o con vehículo.	170
Tabla 4.2: VIP score de los metabolitos.	171

ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintasa
ACSL	Acil-CoA sintasa de cadena larga
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
APS	Persulfato aminio
ATP	Adenosín trifosfato
CACT	Carnitina-acilcarnitina translocasa
cDNA	DNA complementario
CI	Calorimetría indirecta
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CR	Cociente respiratorio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxiribonucleico
Echs	Enoil-CoA hidratasa

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática
FAT	Ácido graso translocasa
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
GE	Gasto energético
GET	Gasto energético total
HIF	Factor inducible por hipoxia
HK	Hexoquinasa
LCFA	Long chain fatty acid
LCFA-CoA	Long-chain fatty acyl-CoA
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
mRNA	RNA mensajero
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFK	Fosfofructoquinasa
PLS DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales

PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNS	Sistema nervioso central
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TEMET	N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamine dihidrocloride
VCO₂	Producción de dióxido de carbono
VO₂	Consumo de oxígeno

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo energético

El metabolismo es la suma de todas las reacciones químicas del cuerpo. Estas constituyen las vías que extraen energía de los nutrientes, utilizan la energía para el trabajo y almacenan el exceso de energía para que pueda ser utilizado más tarde. Las vías metabólicas que sintetizan grandes moléculas a partir de otras más pequeñas se denominan vías anabólicas, mientras que las que degradan moléculas grandes en otras más pequeñas se denominan vías catabólicas.

Una parte de la energía generada por el metabolismo se libera en forma de calor, contribuyendo a la conservación de la temperatura corporal. El resto se transforma en trabajo o se almacena temporalmente en moléculas de alta energía que serán liberadas y utilizadas en diversos procesos.

1.1.1 Gasto energético

El gasto energético total (GET) representa la energía que el organismo consume. La Organización Mundial de la Salud, define el GET como “el nivel de energía necesario para mantener el equilibrio entre el consumo y el gasto energético, cuando el individuo presenta peso, composición corporal y actividad física compatibles con un buen estado de salud, debiéndose hacer ajustes para individuos con diferentes estados fisiológicos como crecimiento, gestación, lactancia y envejecimiento” (1).

Está constituido por la suma de:

- Tasa metabólica basal o gasto metabólico basal.
- Termogénesis endógena.
- Actividad física.

La tasa metabólica basal es la cantidad de energía mínima diaria requerida para mantener las funciones vitales del organismo en reposo, es el mayor componente del GET, constituyendo entre el 60 y el 80% de la producción total de energía.

La termogénesis endógena, es el gasto energético derivado de la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes energéticos. También denominado efecto térmico de los alimentos, el cual representa sobre un 10% del GET.

La actividad física corresponde al consumo calórico originado por actividades diarias como comer, escribir, lavar platos, caminar, etc. y representa entre el 15 y el 30% del GET (2-3).

1.1.2 Cálculo del gasto energético

Magnus-Levy en 1899 introdujo el término metabolismo basal y estableció que su medición debería efectuarse en las siguientes condiciones: sujeto totalmente descansado antes y durante las mediciones, acostado, en estado de vigilia, en ayuno de 10-12 horas, en condiciones controladas de temperatura (22-26°C), en ausencia de infección y libre de estrés emocional.

El gasto energético en reposo se obtiene cuando la determinación se hace en reposo y en las condiciones descritas para la tasa metabólica basal pero no en ayuno, incluyendo por tanto la energía utilizada para el aprovechamiento biológico de los alimentos. Estas mediciones, difieren en menos del 10% y aunque no es exactamente lo mismo ambos términos se

tienden a utilizar indistintamente, en la actualidad se utiliza más la denominación de gasto energético en reposo (3).

Los componentes del gasto energético (GE), es decir el metabolismo basal y el gasto que requiere cualquier actividad física, se pueden determinar por calorimetría, la cual puede ser directa o indirecta. Además, de la calorimetría existen otros métodos para determinar el gasto energético basal y el requerimiento de energía como: las ecuaciones predictivas, la impedancia bioeléctrica y el agua doblemente marcada (4).

En la calorimetría directa se puede determinar el GET por la medición de la cantidad de calor producida por el organismo. Este procedimiento se realiza en cámaras herméticas con paredes aislantes, en donde se confina al sujeto y se registra el calor almacenado y el perdido por radiación, convección y evaporación; se precisa un mínimo de seis horas para estabilizar el sistema. El método más conocido es la cámara de Atwater, en la cual el calor producido es absorbido por el agua que pasa a través de ésta y cuantificado mediante termosensores o termómetros que registran la temperatura a la entrada y a la salida en un tiempo determinado. Como se puede deducir este es un método complejo y difícil de realizar en la práctica, por tanto su uso ha sido de carácter investigativo o para valorar métodos indirectos (5).

La calorimetría indirecta (CI) es un método no invasivo que permite estimar la producción de energía equivalente a la tasa metabólica basal y la tasa de oxidación de los sustratos energéticos. La denominación de indirecta señala que el gasto metabólico se determina por medio de los equivalentes calóricos del oxígeno consumido y del dióxido de carbono producido, cuyas

cantidades difieren según el sustrato energético que esté siendo utilizado. Si se admite que todo el O_2 consumido se utiliza para oxidar los sustratos energéticos (proteínas, carbohidratos y lípidos) y, que todo el CO_2 producido se elimina por la respiración, es posible calcular la energía total producida por los nutrientes (6).

La CI se basa en el principio del intercambio de gases; la respiración en un calorímetro produce depleción de O_2 y acumulación de CO_2 en la cámara de aire. La cantidad de O_2 consumido y de CO_2 producido se determina multiplicando la frecuencia de ventilación, típicamente de 1 L/segundo, por el cambio en la concentración del gas. El GE se calcula usando el consumo de O_2 , la producción de CO_2 y la producción de nitrógeno urinario con la ecuación de Weir. Esta relación también provee información acerca del sustrato nutricional utilizado para la energía metabólica (7).

1.1.2.1 Cociente respiratorio

El cociente respiratorio (CR) es un componente importante en la determinación de la CI y se define como la relación que existe entre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 . Tiene un valor de 1,0 para la oxidación de carbohidratos, de 0,8 para la proteína y de 0,7 para la grasa (8).

Los métodos usados pueden ser de circuito cerrado o abierto. En los de circuito cerrado el CO_2 producido es absorbido dentro del sistema, se adiciona O_2 para mantener constante el volumen del gas. En el sistema abierto el gas se extraerá de una fuente atmosférica mediante una bomba y luego se seca usando gel de sílice. El flujo de gas será medido y regulado antes de ingresar a la cámara donde se coloca el animal (9).

Es por ello que la calorimetría indirecta se usa comúnmente en estudios de balance energético de pequeños animales, ya que los sistemas modernos pueden medir simultáneamente diferentes parámetros como el consumo de oxígeno (VO_2), la producción de dióxido de carbono (VCO_2), la ingesta de alimentos y actividad (10).

La relación de VCO_2 y VO_2 , también conocida como cociente respiratorio CR, se puede utilizar para estimar la utilización de combustible y calcular el gasto de energía. Lo que a menudo falta en los informes del estudio de calorimetría es el cambio en la masa corporal durante el período de medición por lo que el balance de energía se supone tácitamente (9, 11).

Con esto en mente, en la presente tesis determinamos por calorimetría indirecta el CR en ratones C57BL/6, para determinar el efecto de la administración de polifenoles (genisteína o resveratrol) en dicho parámetro.

1.1.3 Metabolismo glucídico

Los glúcidos constituyen una fuente importante de energía en el organismo, la mayor parte de ellos se almacenan y consumen en músculos, hígado y tejido adiposo.

El continuo crecimiento del organismo, y particularmente la división y proliferación de las células, requiere una reprogramación constante del metabolismo. Estos cambios a nivel metabólico son esenciales para que se mantenga la correcta homeostasis entre la producción y degradación lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Así pues, el metabolismo intermedio de los glúcidos es el conjunto de reacciones que se producen en los distintos tejidos para la utilización de esas sustancias nutritivas, sea para su depósito en forma de glucógeno, para su oxidación o para la formación de ácidos grasos y polisacáridos. Es por ello, que en los últimos años el estudio del metabolismo ha permitido obtener resultados muy interesantes que han abierto nuevas líneas de investigación.

La oxidación de la glucosa constituye una ruta metabólica vital para la obtención de adenosín trifosfato (ATP), esta se inicia con la entrada de glucosa en las células mediante transportadores específicos. Una vez la glucosa entra en las células se fosforila en glucosa-6-fosfato, tomando una molécula de ATP, en presencia de la hexoquinasa (HK), quedando así inmovilizada en el interior celular. Una vez fosforilada puede seguir tres rutas metabólicas: glucólisis, ruta de las pentosas fosfato o glucogénesis.

Dada su importancia en las adaptaciones del metabolismo destacamos a continuación la glucólisis y la regulación del metabolismo de la glucosa por Akt.

- **Glucólisis**

La glucólisis constituye un proceso complejo en el cual una molécula de glucosa es oxidada a dos moléculas de piruvato. El piruvato constituye el punto clave en el cual convergen los metabolismos intermedios de los glúcidos, lípidos y proteínas.

La glucólisis es un proceso anaerobio que se realiza en todos los tejidos, aunque en el cerebro, músculo, hígado y en eritrocitos tiene mayor intensidad e importancia. El ácido pirúvico en el músculo se oxida mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs. Mientras que en el hígado y en el tejido adiposo, el piruvato se usa mayoritariamente para la formación de ácidos grasos y su oxidación es menor. La glucólisis anaerobia también es importante en los eritrocitos, ya que al carecer de mitocondrias dependen por completo de la glucosa como combustible metabólico (12).

La glucólisis que consiste de diez reacciones, como se muestra en la figura 1.1. Estas diez reacciones ocurren en dos etapas, en la primera la glucosa se fosforila dos veces y se divide para formar dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, en la segunda etapa el gliceraldehído-3-fosfato se convierte en piruvato (13).

La tercera reacción de la glucólisis, es crítica para el metabolismo glucolítico, en ella la fosfofructoquinasa (PFK) cataliza la transferencia de un fosfato de ATP a fructosa-6-fosfato para producir fructosa-1,6-bisfosfato

y adenosín difosfato (ADP) de forma irreversible. Esta enzima se caracteriza por estar regulada mediante mecanismos complejos, entre ellos la regulación alostérica, la oligomerización, la interacción con otras proteínas y las modificaciones covalentes (14).

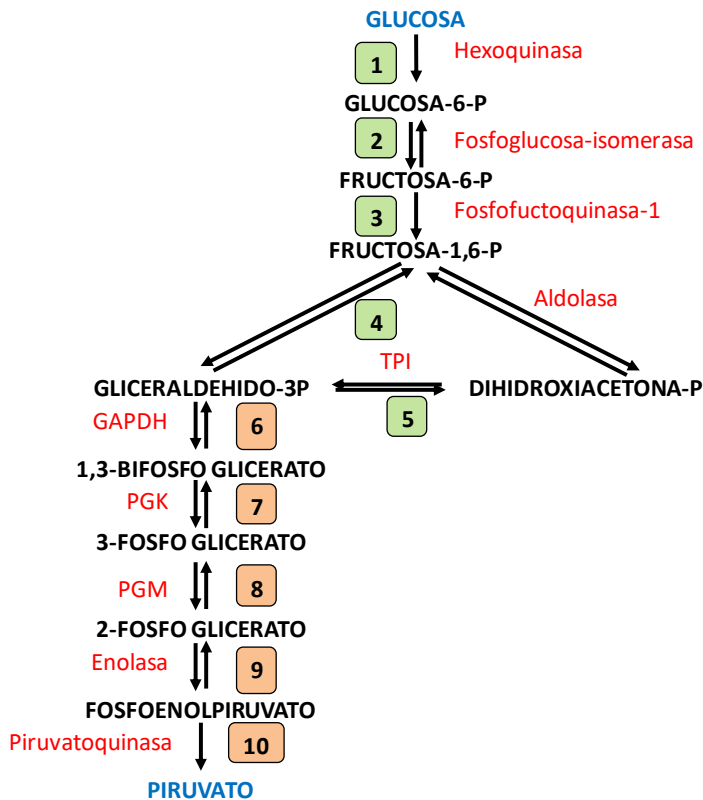


Figura 1.1: Esquema de las diferentes etapas de la glucólisis.

Varios estudios asocian las alteraciones metabólicas de las células cancerosas con cambios en el patrón de expresión y actividad de PFK. La inhibición de este enzima puede conducir a la muerte celular en líneas de carcinoma (15). Además, hay evidencia que el resveratrol, uno de los polifenoles estudiados en la presente tesis, inhibe directamente la

actividad de la PFK, alterando el metabolismo de la glucosa y reduciendo la viabilidad en las células cancerosas (14). Por lo tanto, la acción que los polifenoles ejercen sobre la PFK parece ser un objetivo prometedor para el estudio de nuevas dianas para las modificaciones del metabolismo glucídico.

- **Regulación del metabolismo de la glucosa**

En la glucólisis existen tres pasos importantes de regulación, correspondientes con los tres pasos irreversibles y que están catalizados, respectivamente, por la HK, la PFK1 y la piruvato quinasa. Estas enzimas están reguladas principalmente a través de una regulación alostérica, la HK está regulada por su producto, la glucosa-6-fosfato y por ATP. La PKF-1 es activada por fructosa-2,6-bisfosfato y AMP e inhibida por citrato, ATP y H^+ . Finalmente, la piruvato quinasa es inhibida por ATP, acetil-CoA o alanina y activada por la presencia de AMP y fructosa-1,6-bisfosfato.

Se ha descrito que el oncogén Ras activa tanto la entrada de glucosa a la célula como la glucólisis. Los efectos de activación de Ras, como la inactivación de factores tumorales tales como PTEN se han relacionado con la inducción del factor inducible por hipoxia (HIF del inglés “hipoxia inducible factor”). Una vez activo HIF puede incrementar los niveles de transcripción de distintos genes, entre ellas la lactato deshidrogenasa y la PFK, así como los transportadores Glut (16-18). También está descrito que la sobreexpresión de otro oncogén, c-myc, incrementa los niveles de ARNm de GLUT1, fosfoglucosa isomerasa, PFK, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa y enolasa aumentando la captación de glucosa por las células (19).

Por otra parte, la activación de Akt incrementa la entrada de glucosa en la célula y desencadena un fenotipo glucolítico (20). De esta forma la activación de Akt se ha relacionado ampliamente con la translocación a la membrana de las proteínas transportadoras Glut, que son las encargadas de la difusión facilitada de la glucosa a través de la membrana celular (21). A nivel de la glucólisis se ha podido observar que la activación de la ruta de Akt actúa incrementando los niveles de PFK (22).

Por lo tanto, la acción que los polifenoles ejercen sobre la Akt, y la relación de esta proteína con la actividad de la PFK, parece ser un objetivo prometedor para el estudio de nuevas dianas que induzcan modificaciones del metabolismo glucídico.

1.1.4 Metabolismo lipídico

Los lípidos son uno de los principales sustratos para la obtención de energía, mediante la oxidación de los mismos. También están implicados en la formación de las membranas celulares y la modificación de proteínas y actúan como moléculas señalizadoras.

Las variaciones en el estado nutricional desencadenan cambios en el metabolismo de los lípidos. Cuando el aporte de nutrientes es equilibrado los ácidos grasos provienen de ellos, y la síntesis *de novo* de ácidos grasos ocurre en todos los tipos de celulares del organismo en niveles muy bajos. Por el contrario, cuando se ingieren dietas con grandes cantidades de hidratos de carbono y bajo porcentaje de grasa se induce la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Los tejidos especializados en realizar el proceso de síntesis de ácidos grasos son principalmente el hígado y el tejido adiposo en los que la regulación de la ruta de síntesis es mediada por hormonas y factores de crecimiento.

En los mamíferos, cuando aumentan las necesidades energéticas de la célula, se utilizan los ácidos grasos de cadena larga (LCFA del inglés “long chain fatty acid”) como fuente de energía. Por lo que la oxidación mitocondrial de los LCFA juega un papel importante en la conservación de la homeostasis energética, ya que constituye una fuente principal de energía para muchos órganos sobre todo el músculo y el hígado (23).

Dada la importancia de las adaptaciones que ocurren en las células cuando se inducen cambios en el metabolismo energético se destacan a continuación los diferentes aspectos del metabolismo lipídico como son: el

transporte y activación de los ácidos grasos, la síntesis de lípidos y su oxidación, así como los enzimas de regular las diferentes etapas.

1.1.4.1 Entrada y transporte de ácidos grasos en la célula

Los ácidos grasos de cadena corta y media pueden entrar en las células a través de las membranas por difusión simple debido a su pequeño tamaño y sus características hidrosolubles. En cambio, se han propuesto dos modelos para la entrada de los LCFA en las células de diferentes tejidos: un transporte pasivo, no saturable y un transporte facilitado, saturable y llevado a cabo por diferente proteínas (24-26).

Cuando la concentración extracelular de los LCFA es elevada, del orden de micromolar, éstos son capaces de difundir libremente a través de las membranas plasmáticas por difusión pasiva, mecanismo similar al de entrada de los ácidos grasos de cadena corta y media. En cambio, cuando la concentración plasmática de los LCFA es baja, del orden de nanomolar, su transporte es saturable y se efectúa por transporte facilitado (24).

La albumina, primera proteína descrita por su implicación en la captación de los ácidos grasos, forma un complejo ácidos grasos de cadena larga/albumina que permite su interacción con la membrana plasmática y facilita su disociación (27). A continuación diferentes proteínas como la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABP), la ácido graso translocasa (FAT) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), se hacen cargo de los ácidos grasos libres para asegurar su paso a través de la membrana plasmática. Hay una considerable expresión de FABP y FAT en los tejidos que tienen un metabolismo elevado de ácidos grasos de cadena larga (25, 28).

Una vez captados por la célula, los ácidos grasos son tomados por las FATP, las cuales los transportan hacia las mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas para su utilización o almacenamiento (29).

Hay que tener en cuenta que, independientemente del mecanismo de entrada de los ácidos grasos a la célula, este paso es bidireccional. Sin embargo, cuando la transferencia está acoplada a la activación de los ácidos grasos en acil-CoA, ésta se hace unidireccional, lo cual conlleva a un acumulo de acil-CoA en el citosol (25).

- **Activación de ácidos grasos de cadena larga a acil-CoA**

Una vez los ácidos grasos han entrado a la célula necesitan ser activados para permanecer en el interior de la célula. Los ácidos grasos de cadena corta y media son activados directamente en la matriz mitocondrial por la acción de la acil-CoA sintetasa (ACS) de cadena corta y media respectivamente. En cambio los LCFA son activados en el citosol por la ACS de cadena larga (ACSL), una proteína transmembrana que se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa (MME), superficie de peroxisomas y retículo endoplasmático (30-31).

La activación a acil-CoA se produce mediante una reacción catalizada por la ACS que utiliza ATP y constituye la única etapa del catabolismo de los ácidos grasos que requiere gasto de energía. Existen diferentes tipos de acil-CoA sintetasa en función de su especificidad por la longitud de la cadena de átomos de carbono. Es por ello que la ACSL juega un papel importante en el metabolismo de los ácidos grasos.

- **Transporte intramitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga: el sistema carnitina palmitoiltransferasa**

Los acil-CoA de cadena larga (LCFA-CoA del inglés “long-chain fatty acyl-CoA”) activados deben entrar en la mitocondria donde serán oxidados. Al ser la membrana mitocondrial interna (MMI) impermeable a estos acil-CoA, es necesario un sistema de transporte que tiene lugar mediante translocación. Está se lleva a cabo por el sistema carnitina palmitoil transferasa, el cual está formado por tres proteínas diferentes: carnitina palmitoil transferasa (CPT)-1, carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT) una proteína integral de la MMI y CPT2 (32-33).

Los acil-CoA activados se unen a CPT1 localizada en la MME. Esta enzima cataliza el traslado del grupo acil de la coenzima A sobre el grupo hidroxilo de la carnitina dando lugar a la formación de acil-carnitina a partir de acil-CoA y de L-carnitina. Los productos de la reacción son translocados a la matriz mitocondrial en un intercambio catalizado por una proteína integral de membrana interna, la CACT, permitiendo a los residuos de cadena larga atravesar la MMI (34).

Una vez dentro de la matriz mitocondrial CPT2 cataliza el intercambio del grupo carnitina por el grupo CoA en el acil, obteniéndose el acil-CoA (figura 1.2) (35).

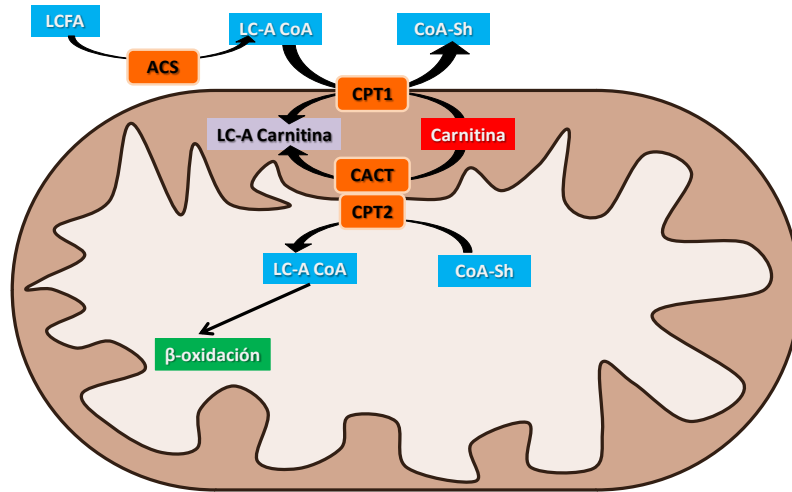


Figura 1.2: Transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria a través del sistema carnitina palmitoil transferasa.

Este sistema permite la entrada de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) a la mitocondria, tras ser activados por la ácido graso sintasa (ACS). Dicho transporte está mediado por las carnitina palmitoil transferasa (CPT) 1 y 2 y por la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT).

1.1.4.2 Oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos pueden ser oxidados para obtener energía en la mitocondria o en los peroxisomas. La β -oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en la matriz mitocondrial y es la principal productora de energía, aunque también existen otros tipos de oxidación como la α -oxidación, la ω -oxidación y la oxidación peroxisómica.

- **β -oxidación**

Los acil-CoA en la matriz mitocondrial son degradados por las enzimas de la β -oxidación. Este proceso se basa en cuatro pasos que se repiten consecutivamente hasta que toda la molécula de acil-CoA se degrada en moléculas de acetil-CoA (figura 1.3), los cuales son:

1. Deshidrogenación: mediante la actuación de la enzima acil-CoA deshidrogenasa se obtiene una molécula con poder reductor, $FADH_2$, y se origina una molécula de enoíl-CoA.
2. Hidratación: el enoíl-CoA se transforma en hidroxiacil-CoA, mediante la incorporación de una molécula de agua por acción de la enoíl-CoA hidratasa (Echs) (36).
3. Deshidrogenación: la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa oxida la molécula hasta un cetoacil-CoA y se obtiene $NADH_2$.
4. Ruptura tiólica: por último la tiolasa con la intervención de una molécula de CoA libre genera una molécula de acetil-CoA y un acil-CoA que tiene dos carbonos menos en su cadena.

El acetil-CoA se incorporará al ciclo de Krebs, mientras que el acil-CoA acortado en dos carbonos, inicia un nuevo ciclo de la β -oxidación.

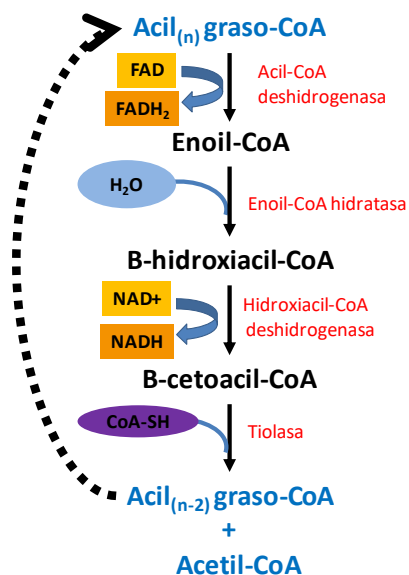


Figura 1.3: Esquema de la β -oxidación de los ácidos grasos

1.1.4.3 Síntesis de ácidos grasos

En los mamíferos la síntesis de *novo* de ácidos grasos se lleva a cabo a partir de acetil coenzima A (CoA), mediante la enzima ácido graso sintasa. La cual utiliza como sustrato acetil-CoA y malonil-CoA para generar el palmitato (C16:0) (37), precursor de los demás ácidos grasos. El sistema enzimático para la biosíntesis de ácidos grasos está presente en muchos tejidos, aunque se encuentra principalmente operativo en hígado, y en menor grado en tejido adiposo (38).

El acetil-CoA proviene del piruvato o del catabolismo de algunos aminoácidos. El acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs para generar compuestos reducidos que se utilizan para la fosforilación oxidativa. También puede ser transportado al exterior de la mitocondria en forma de citrato, el cual en el citosol se reconvierte a acetil-CoA. Por la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) el acetil-CoA se transforma en malonil-CoA, metabolito que tiene un importante papel regulador en el mantenimiento del balance entre la síntesis y la oxidación de ácidos grasos.

Las enzimas de esta ruta, se regulan en función del estado nutricional (39), se ha visto que uno de los principales reguladores de la síntesis de ácidos grasos es la AMPK. La actividad de esta enzima está modulada por una gran variedad de estímulos y una vez activada, fosforila e inhibe a ACC, deteniendo así la síntesis de malonil-CoA (40).

1.1.4.4 Regulación del metabolismo lipídico

- **Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)**

AMPK es una proteína altamente conservada durante la evolución pudiendo encontrarse en la gran mayoría de los eucariotas con la única excepción conocida de *Endeophalitozoon cuniculi*, el cual es un parásito intracelular obligado. Esto puede ser debido a que *E.cuniculi* tiene una capacidad limitada para generar su propio ATP y recluta mitocondrias del hospedador cerca de su membrana plasmática. Por lo tanto, se basa en la regulación del metabolismo de la célula huésped por la AMPK para asegurar su propio suministro de energía (41).

Esta proteína es un punto de control de la homeostasis energética en la célula ya que se ha descrito como un sensor del metabolismo celular. AMPK se activa en respuesta a depresión energética, y actúa regulando genes, y proteínas implicadas en el metabolismo, proliferación y apoptosis (42).

AMPK aparece en las células formando un complejo heterotrimérico, con una subunidad catalítica α y dos reguladoras β y γ . Existen dos isoformas conocidas de las subunidades α y β mientras que de la γ se han descrito tres. A causa de las distintas combinaciones de las isoformas se han descrito doce complejos heterotriméricos distintos los cuales presentan diferencias en la regulación actividad y localización celular (43). Está proteína se regula por fosforilación, siendo su forma fosforilada, en la Thr172 de la subunidad catalítica α (p-AMPK α), hasta 100 veces más activa (44).

AMPK a nivel metabólico actúa sobre el metabolismo de ácidos grasos, de la glucosa, y de la síntesis de proteínas, entre otros. En el metabolismo de ácidos grasos interviene incrementando la oxidación de lípidos e inhibiendo la síntesis *de novo* de estos. El incremento en la oxidación de lípidos tiene lugar debido a que AMPK incrementa los niveles de PPAR- α implicando en la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la β -oxidación tales como: flavoproteína de transferencia de electrones, proteína de transferencia de fosfatidilcolina, lipasa endotelial, lipasa hormona sensitiva, monoglicerido lipasa (45).

También puede actuar directamente sobre algunas enzimas de la síntesis de ácidos grasos, fosforila a ACC1 en la Ser77 y Ser79 y a ACC2 en la Ser219 y Ser221 inhibiéndolas. De esta forma tiene lugar una disminución en la lipogénesis, así como un incremento de la β -oxidación (46).

Asimismo, AMPK regula el metabolismo mitocondrial siendo su mayor efector el factor de transcripción, coactivador 1 α del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PGC1 α , del inglés "*Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α* "). AMPK directamente fosforila y activa el factor de transcripción que conlleva la transcripción de genes implicados en la fosforilación oxidativa y biogénesis mitocondrial.

- **Acetil-CoA carboxilasa**

En los mamíferos existen dos isoformas de ACC, la ACC1 se localiza en el citoplasma y es la forma mayoritaria en tejidos lipogénicos. Mientras que la ACC2 se encuentra asociada a la MME y se expresa principalmente en

tejidos no lipogénicos donde tiene funciones más reguladoras. Su localización se relaciona con la inhibición, mediada por malonil-CoA, que ejerce sobre CPT1, lo que conlleva una inhibición de la β -oxidación (32, 47).

La ACC cataliza la reacción de síntesis de malonil-CoA en dos pasos, de forma reversible y el enzima malonil-CoA decarboxilasa cataliza la formación de acetil-CoA a partir de malonil-CoA (48-49). Dicho mecanismo enzimático permite modular los niveles de malonil-CoA, es por ello que ACC es un enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, también se ha relacionado con la síntesis de cuerpos cetónicos. Hay estudios que sugieren que la inhibición farmacológica de ACC1 y ACC2 puede ser un enfoque novedoso en el tratamiento del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina hepática (50-51).

Por otra parte, estudios realizados en roedores alimentadas con dieta alta en grasa y polifenoles, como el resveratrol o los derivados del té verde, han demostrado que los polifenoles inhiben la actividad de la ACC y disminuyen parcialmente el aumento de grasa hepática ya que activan la oxidación de los ácidos grasos y reducen la lipogénesis (52-53).

- **Regulación del transporte intramitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga**

CPT1 representa un sitio regulador clave que controla el flujo a través de la β -oxidación por lo que desempeña un papel central en la oxidación de ácidos grasos mitocondriales. Por el contrario, se considera que CACT y CPT2 no desempeñen un papel regulador en la absorción de ácidos grasos mitocondriales. CPT2 no muestra sensibilidad a malonil-CoA en su entorno

nativo ni cuando está aislada, por lo que ni CACT ni CPT2 parecen limitar la tasa de captación de ácidos grasos mitocondriales (54).

- Regulación de la actividad de CPT1.

CPT1 está fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico, malonil-CoA y representa el principal punto de control de la β -oxidación. El malonil-CoA, derivado de la glucosa es el primer intermediario de la lipogénesis y su efecto sobre CPT1 permite mantener un equilibrio entre los procesos de síntesis y oxidación de ácidos grasos, y señalar la disponibilidad relativa de nutrientes en la célula. Por ello, los mecanismos que modulan la concentración citoplasmática de este metabolito son cruciales en la regulación de su actividad.

CPT1 no solo está regulada por su inhibidor fisiológico, hay otros mecanismos independientes de malonil-CoA, que regulan su función. En el hígado, se ha descrito que variaciones en la relación insulina/glucagón conllevan cambios en los niveles de RNA mensajero (mRNA) de CPT1. Dichos cambios se asocian a una baja biodisponibilidad de glucosas y a unas concentraciones elevadas de ácidos grasos. Así mismo, hay estudios en los que se describe que las ratas diabéticas o en ayuno tienen una mayor expresión y actividad CPT1 en hígado (55). Las variaciones a nivel transcripcional de este enzima son ligeras en relación a la regulación derivada de las concentraciones de sus sustratos o inhibidores.

Además, existen modificaciones post-traduccionales que conllevan variaciones en la actividad catalítica de CPT1. Se conocen diferentes sitios de fosforilación en la isoforma CPT1A y su modificación produce cambios

de sensibilidad a malonil-CoA. También se ha observado que al exponer células en cultivo a activadores de AMPK se produce una activación del enzima CPT1 sin cambios en su sensibilidad a malonil-CoA (56).

Estudios recientes han demostrado el papel de los polifenoles dietéticos (las catequinas, el resveratrol y la curcumina) en la prevención de la obesidad. Los estudios celulares demostraron que estos polifenoles reducen la viabilidad de los adipocitos y la proliferación de preadipocitos, suprimen la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de triglicéridos, estimulan la lipólisis y la β -oxidación de los ácidos grasos, con un aumento concomitante en la expresión de CPT1 (57-59).

- Regulación de la actividad de CACT.

CACT está regulado positivamente por PPAR α y PPAR δ , dicha regulación, es importante para la regulación de la oxidación de ácidos grasos en los tejidos durante el ayuno, ya que permite que la importación de acilcarnitina en la matriz mitocondrial durante el ayuno pueda aumentar (60). También se ha descrito que la regulación positiva que ejerce PPAR α sobre CACT en humanos está mediada por el *peroxisome proliferator response element* (PPRE) (61).

1.1.5 Implicación de las hormonas en el metabolismo

Para hacer un uso más eficiente de los recursos disponibles, el metabolismo debe estar regulado en todo el organismo. Esta regulación se lleva a cabo a través de mecanismos hormonales.

A continuación, se detalla las acciones específicas de varias hormonas involucradas en la regulación del metabolismo: la insulina, el glucagón, la epinefrina, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.

La **insulina** es una hormona peptídica secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans. El tejido adiposo y el músculo esquelético requieren insulina para el transporte de glucosa en reposo. Los efectos de la insulina se refieren principalmente a la regulación de la glucosa sanguínea, orientándose a disminuir los estados de hiperglucemia.

La insulina controla directamente las actividades de un conjunto de enzimas metabólicas por fosforilación o desfosforilación y también regula la expresión de genes que codifican las enzimas hepáticas de la gluconeogénesis y la glucólisis. Inhibe la transcripción del gen que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa, el paso limitante de la gluconeogénesis. Esta hormona también disminuye la transcripción de los genes que codifican fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa, y aumenta la transcripción de enzimas glucolíticas tales como glucoquinasa y piruvato quinasa, y enzimas lipogénicas tales como ácido graso sintasa y ACC (62-63).

La insulina promueve la síntesis de lípidos e inhibe su degradación, muchos de estos cambios requieren un aumento en el factor de transcripción de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1). La

insulina también inhibe profundamente la lipólisis en los adipocitos, principalmente a través de la inhibición de la enzima lipasa sensible a las hormonas (63-64). El efecto antilipolítico también está mediado por una disminución en la tasa intracelular del AMP cíclico, inhibiendo la actividad de la lipasa hormono sensible, entre otros efectos (63, 65-66).

El glucagón es una hormona peptídica secretada por las células α de los islotes pancreáticos de Langerhans. El objetivo principal para la acción del glucagón es el hepatocito. El glucagón regula la producción de glucosa hepática activando la Proteína quinasa A, lo que conduce a cambios en la glucogenólisis, la glucoogénesis, la gluconeogénesis y la glucólisis (67).

El glucagón estimula la actividad de la lipasa sensible a hormonas en los adipocitos, lo que produce un aumento de los ácidos grasos no esterificados en la circulación. Estos ácidos grasos, generalmente unidos a la albúmina, se transportan al corazón, músculo esquelético, riñón e hígado, donde son catabolizados o, en el caso del hígado, alternativamente convertidos en cuerpos cetónicos (68).

Los glucocorticoides de la corteza de la glándula suprarrenal son responsables de parte de la respuesta al estrés. El término estrés hace referencia a situaciones como el ayuno, la hipoglucemia, las lesiones físicas, la ansiedad o el miedo. Frente a estas situaciones la glucosa debe mobilizarse rápidamente desde el hígado hacia las células musculares mientras los ácidos grasos se liberan de los adipocitos. Los glucocorticoides, especialmente el cortisol, se secretan con muchas formas de estrés que incluyen el ejercicio, el frío y el estrés emocional (69).

Las catecolaminas son secretadas por la médula suprarrenal e incluyen a la adrenalina y noradrenalina. Las catecolaminas aumentan la actividad de la glucógeno fosforilasa hepática y muscular, promoviendo la glucogenólisis, lo cual aumenta la producción de glucosa por el hígado y el músculo esquelético (70). Las catecolaminas actúan sobre el tejido adiposo para aumentar la lipólisis al aumentar la actividad de la lipasa sensible a las hormonas.

Los esteroides son lípidos de estructura policíclica secretados por las glándulas endocrinas y se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Entre sus funciones destaca la regulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, también son las encargadas de regular el equilibrio de los electrolitos y los niveles de agua en las diferentes células del organismo. Sobre el metabolismo de los ácidos grasos los progestágenos tienen como efecto más notorio el originar, a nivel de los tejidos grasos periféricos y muscular, una resistencia a la acción de la insulina y por ende una menor captación de glucosa, a lo que se agrega una acción moduladora en la captación de ácidos grasos libres por un efecto sobre la lipasa lipoprotéica (71-72).

Los andrógenos por su parte inducen no sólo una movilización del tejido graso, sino que también disminuyen la síntesis de *novo* (73).

En el caso de los estrógenos reducen la absorción de los ácidos grasos mediante una regulación negativa de la lipoproteína lipasa y la lipogenesis mediante la inhibición de la ACC y la ácido graso sintasa, así como PPAR- γ (74-75).

1.2 Metabolómica

Para poder entender el concepto de metabolómica, es preciso introducir algunos elementos como son los metabolitos y el metaboloma.

En el caso de los metabolitos, estamos hablando de uno de los elementos fundamentales de los sistemas biológicos, que constituyen la base de los mismos. Fundamentalmente, los sistemas biológicos se pueden dividir en 4 componentes bioquímicos principales, que son: los genes, transcripciones, proteínas y metabolitos.

Los metabolitos podrían llegar a definirse como productos químicos, orgánicos o inorgánicos, de bajo peso molecular que son intermediarios o productos de reacciones bioquímicas mediadas por enzimas. En su detección hemos utilizado herramientas de última generación como la resonancia magnética nuclear (RMN), que se explicará con más detalle más adelante.

El metaboloma es el conjunto cuantitativo de metabolitos que se encuentran en un sistema biológico. En el caso de los humanos, por ejemplo, se ha realizado una aproximación (probablemente subestimada) de que se contienen miles de metabolitos diferentes. El metaboloma se puede subclasificar a su vez en endometaboloma (aquellos metabolitos que son el resultado del metabolismo intracelular) y en exometaboloma (aquellos que presentan un origen extracelular). Muchos de los metabolitos, y por tanto el metaboloma, son el resultado de los procesos metabólicos de los organismos (76-77).

Por ello, entendemos la metabolómica como el estudio de los metabolitos involucrados en el metabolismo y como estos son modificados a través de la interacción con enzimas u otros cofactores. Un ejemplo de la importancia de la metabolómica es que nos ha permitido entender procesos tan complicados como la homeostasis interna de los seres vivos, pues en ella se mantiene un ambiente químico estable mediante el control del metabolismo. Por tanto, se podría concluir que la metabolómica es el estudio comprensivo de los metabolitos presentes en los sistemas biológicos (76).

La metabolómica es un apartado de la ciencia relativamente nuevo, pues la primera referencia que se hizo a ella fue alrededor de 1970 (78-79). No obstante, quedó bastante estancada hasta que se desarrollaron nuevas herramientas para su estudio, como fue el caso de la RMN. Es ya en la década de los 90 y principios del siglo XX cuando se produce un crecimiento exponencial de los estudios en este campo, desarrollándose mucho el estudio sobre las complejas interacciones entre los distintos elementos y componentes biológicos.

1.2.1 Espectroscopia RMN

En nuestro caso, nos hemos decantado por su estudio y detección mediante la RMN, pues es una herramienta que nos otorga múltiples datos de la información estructural y permite la identificación de constituyentes individuales de los tejidos o materiales estudiados. A todo ello hay que añadir que se trata de un mecanismo de análisis que no altera la muestra y

es fácilmente reproducible, además de que permite múltiples análisis de la misma muestra al no lesionarla.

1.3 Polifenoles

1.3.1 Definición

Los polifenoles se caracterizan estructuralmente por poseer uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a uno o más anillos bencénicos. Son un grupo de sustancias químicas que se sintetizan principalmente en las plantas, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas de los vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.).

Estos compuestos son bio-sintetizados por las diferentes partes de las plantas y se pueden encontrar en sus frutos, hojas, tallos, raíces, semillas, etc. Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta ya que son componentes ampliamente distribuidos en frutas, verduras, cereales, aceitunas, legumbres secas, chocolate y bebidas como el té, el café y el vino.

A pesar de su amplia distribución, los efectos saludables de los polifenoles presentes en nuestra dieta han llamado la atención de los investigadores solo en los últimos años (80). El principal factor responsable de su tardía investigación es la variedad y complejidad de su estructura química.

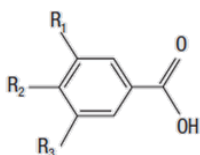
Los polifenoles pueden ejercer múltiples efectos biológicos tales como: proteger los componentes celulares contra el daño oxidativo, activar o inhibir diferentes enzimas, entre las que se encuentran la telomerasa (81), ciclooxigenasa (82) y lipoxigenasa (83), y actuar en la interacción con vías de transducción de señales y receptores celulares (84). Además, los

polifenoles reciben cada vez más atención como posibles agentes terapéuticos contra varias enfermedades como las enfermedades cardiovasculares (85), el cáncer (86) e incluso las enfermedades neurodegenerativas (87).

1.3.2 Clasificación

Los polifenoles son muy abundantes en la naturaleza y extremadamente diversos, hay más de 8000 diferentes identificados hasta la fecha (88). Es por eso que la terminología y clasificación de los polifenoles es compleja y confusa. Los polifenoles tienen estructuras químicas muy similares, aunque se pueden subdividir en bases a algunas diferencias en: ácidos fenólicos, estilbenos, alcoholes fenólicos, lignanos y flavonoides (80) (figura 1.4), las características principales de las cuales se detallan a continuación.

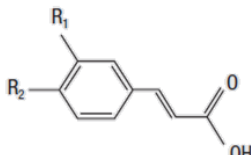
Ácido hidroxibenzoico



$R_1=R_2=R_3=OH$: Ácido gálico

$R_1=R_2=OH$ $R_3=H$: Ácido protocatecuico

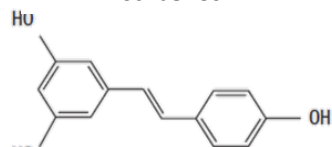
Ácido hidroxicinámico



$R_1=OH$: Ácido cumárico

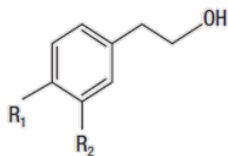
$R_1=R_2=OH$: Ácido cafeico

Estilbenos



Resveratrol

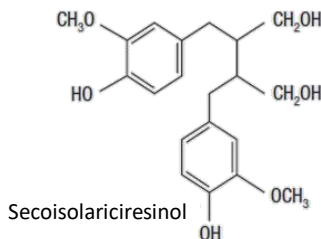
Alcoholes fenólicos



$R_1=OH$, $R_2=H$: Tiroso

$R_1=R_2=OH$: Hidroxitiroso

Lignanos



Secoisolariciresinol

Flavonoides

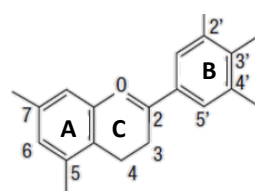


Figura 1.4: Estructura química de los polifenoles.

1.3.2.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son una larga familia de metabolitos secundarios que contienen un anillo fenólico y un ácido carboxílico (esqueleto C6-C1) (Figura 1.4). Se pueden dividir en dos clases: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Su principal función se relaciona con el color y las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza) de las plantas, así como con las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (frutas, vegetales, granos, té, especias) (89).

Los ácidos hidroxibenzoicos están ampliamente distribuidos en las plantas, el ácido gálico se encuentra en las hojas del té y el ácido protocatecúico en las frambuesas y en menor cantidad en el aceite de oliva (90).

Los ácidos hidroxicinámicos consisten principalmente en ácido cumárico, cafeico y ferúlico, que raramente se encuentran en forma libre. El ácido cafeico y el ácido quínico se combinan para formar ácido clorogénico y está presente en muchos tipos de fruta, también se encuentra en altas concentraciones en el café (91). El ácido ferúlico es el ácido fenólico más abundante que se encuentra en los cereales (92).

1.3.2.2 Estilbenos

Los estilbenos están presentes en bajas cantidades en la dieta humana, se caracterizan por poseer una estructura C6-C2-C6 (Figura 1.4), siendo el resveratrol uno de los más conocidos de esta familia, el cual se describirá más detalladamente en el siguiente apartado. Los estilbenos se producen por las plantas en respuesta a la infección por patógenos o a una variedad de condiciones de estrés (93). Estos compuestos se han detectado en más

de 70 especies de plantas, entre las que se incluye las bayas, cacahuets y uvas (94).

1.3.2.3 Alcoholes fenólicos

Los principales alcoholes fenólicos son el tirosol e hidroxitirosol (Figura 1.4) y se encuentran principalmente en aceite de oliva virgen extra (95). El tirosol también está presente en los vinos tintos y blancos y en la cerveza, mientras que el hidroxitirosol también se encuentra en el vino tinto (96).

1.3.2.4 Lignanos

Los lignanos tienen una estructura básica de dos unidades C₆-C₃ unidas por enlaces β (Figura 1.4). Se encuentran ampliamente distribuidas en las semillas de lino y de calabaza, en el centeno, la soja, el brócoli, los frijoles y algunas bayas, aunque sus cantidades son muy reducidas. Los lignanos son uno de los dos grupos principales de fitoestrógenos, el interés por ellos y sus derivados sintéticos está creciendo debido a las posibles aplicaciones en la quimioterapia del cáncer y varios otros efectos farmacológicos (97).

1.3.2.5 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C₆-C₃-C_{6'}). Existen varios subgrupos de flavonoides y se clasifican en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos).

Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (figura 1.5).

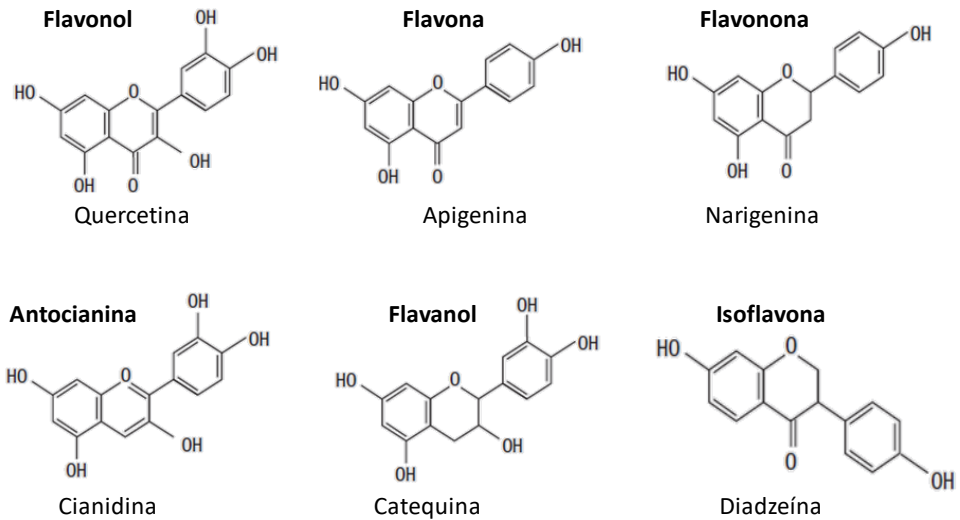


Figura 1.5: Estructura química de los flavonoides.

- **Flavonoles**

Los flavonoles se caracterizan por poseer un doble enlace entre C2 y C3 y un grupo hidroxilo en la posición C3 (figura 1.5). Representan los flavonoides más presentes en los alimentos, la quercitina es el compuesto más representativo de este grupo. Las principales fuentes de flavonoles son las cebollas, la col rizada, los puerros, el brócoli, los arándanos, el té y el vino tinto (98).

- **Flavonas**

Las flavonas tienen un doble enlace entre C2 y C3 (figura 1.5) y son los flavonoides menos comunes. Las fuentes comestibles más importantes de

flavonas son el ajo y el perejil, aunque también las encontramos en la piel de las frutas, especialmente en la de las mandarinas (80).

- **Flavanona**

Se caracterizan por la presencia de una cadena saturada de tres carbonos y un átomo de oxígeno en el C4. En general, están glucosilados por un disacárido en C7 (figura 1.5). Las flavanonas las podemos encontrar en los tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta, aunque están presentes en altas concentraciones solo en los cítricos. Los compuestos principales que podemos encontrar en los alimentos son la naringenina en pomelo, la hesperetina en naranjas y eriodictiol en limones (99).

- **Isoflavonas**

Las isoflavonas poseen dos grupos hidroxilo en las posiciones C7 y C4 (figura 1.5), por lo que tienen similitudes estructurales con los estrógenos y pueden unir a receptores estrogénicos. Es por ello, que se clasifican como fitoestrógenos. Las isoflavonas están contenidas casi exclusivamente en plantas leguminosas. La soja y sus productos procesados representan la principal fuente de isoflavonas y contienen las tres moléculas principales la daidzeína, la gliciteína y la genisteína (100), la cual se describirá detalladamente más adelante.

- **Antocianinas**

La estructura química básica de este grupo es el 2-feni-benzopirilio (figura 1.5), son pigmentos solubles en agua, responsables de la mayoría de los colores rojo, azul y morado de frutas, verduras, flores y otros tejidos o productos vegetales. Las antocianinas se distribuyen ampliamente en la

dieta humana: se encuentran en el vino tinto, ciertas variedades de cereales y ciertas verduras (col, frijoles, cebollas, rábanos), pero son especialmente abundantes en la fruta (101-102).

- **Flavanoles**

Los flavonoides contienen una cadena saturada de tres carbonos con un grupo hidroxilo en el C3 (figura 1.5). Existen tanto en el monómero como en la forma del polímero (catequinas y proantocianidinas, respectivamente). Los principales flavanoles representativos en la fruta, el vino y el chocolate, son la catequina y la epicatequina (103).

1.3.3 Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural, con estructura de estilbeno. Está presente en numerosas plantas y frutos como cacahuetes, moras, arándanos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto, el cual es, el que aporta un mayor contenido de este a nuestro tipo concreto de dieta (dieta mediterránea). Se sintetiza en más de 70 plantas en respuesta a situaciones estresantes, tales como la contaminación fúngica o la radiación ultravioleta. En las plantas actúa como fitoalexina, es decir, posee la capacidad de inhibir el progreso de ciertas infecciones.

1.3.3.1 Historia

El resveratrol fue mencionado por primera vez en un artículo de Japón en 1939 por Michio Takaoka, quien un año más tarde caracterizó su estructura química, tras aislarlo de las raíces, de la venenosa pero medicinal, *Veratrum grandiflorum*, una variedad de *glandiflorum* (104-105). No

obstante, hacía más de 2.000 años, que estaba presente en preparados medicinales, como el *Darakchasava* o el *Manakka* (106).

En la década de los 60, Nonomura descubrió que el resveratrol era el principal principio activo del *Ko-jo-kon* (107), un preparado de uso común en la medicina tradicional oriental a base de raíces secas de *polygomun cuspidatum*. Fue en 1976 cuando se describió la presencia del resveratrol en la piel de la uva (108).

Ya a finales de los ochenta, los doctores Renaud y Ellison, en base a diferentes estudios epidemiológicos, manifestaron la baja tasa de mortalidad por enfermedades coronarias en regiones mediterráneas, especialmente en la población gala, en comparación con la población norteamericana. A pesar del consumo relativamente elevado de aporte lipídico en ambos grupos. Dicho fenómeno fue bautizado con el nombre de “Paradoja Francesa”(109).

Fue en noviembre de 1991, cuando se difundió la conocida “Paradoja Francesa”, la cual tuvo una importante repercusión mediática. Un año más tarde, se descubrió que el vino tinto contenía una cantidad relativamente elevada de resveratrol y se planteó que este compuesto podría ser el responsable del efecto cardioprotector asociado al consumo moderado de vino (109-110).

1.3.3.2 Propiedades físicas y químicas

Su estructura base consiste en la unión de 2 anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (peso molecular:

228,25 g/mol). Este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del resveratrol (fig. 1.6) (111).

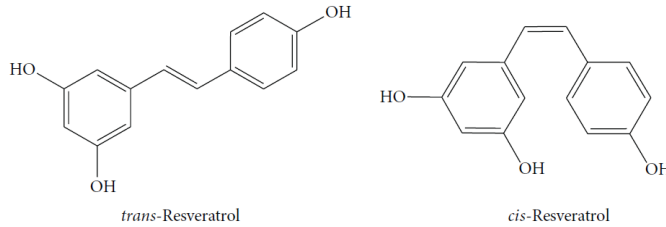


Figura 1.6: Estructura química del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol.

Trela y Waterhouse estudiaron la estabilidad del resveratrol bajo diferentes condiciones y demostraron que, el *trans*-resveratrol es estable durante meses cuando se protege de la luz y no se somete a pHs alcalinos. Por otra parte, el *cis*-resveratrol es extremadamente fotosensible, pero permanece estable en la oscuridad a temperatura ambiente durante más de un mes cuando se prepara en una solución de etanol al 50% en concentraciones comprendidas entre 5.3-52.8 μM (111).

El *trans*-resveratrol es un sólido blanco con punto de fusión de 253°C, mientras que el *cis*-resveratrol es un aceite. Ambos isómeros presentan una baja solubilidad en agua (<0.05 mg/mL), pero su solubilidad aumenta con etanol (50 mg/mL) o con disolventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (16 mg/mL). Otra forma de mejorar la solubilidad del resveratrol en agua es utilizando vectores para formar un complejo con el resveratrol, como puede ser el uso de ciclodextrinas.

Se conocen multitud de análogos sintéticos o naturales del resveratrol, así como los isómeros, aductos, derivados y conjugados de estos (112).

Además, en la naturaleza es frecuente encontrar el resveratrol unido a azúcares simples, formando glucósidos.

1.3.3.3 Metabolismo y biodisponibilidad

Debido a que la eficacia del resveratrol depende de su absorción y metabolismo, estos han sido ampliamente estudiados tanto en roedores como en humanos. Tras una administración oral se detectaron cantidades elevadas de resveratrol en heces, orina y bilis, pero también en plasma, riñones, hígado, estómago e intestino que son los órganos donde la biodisponibilidad es mayor (113-116).

El resveratrol, al igual que sucede con otros polifenoles de la dieta, está sujeto a reacciones de metabolización de Fase II (conjugación) en el hígado, que principalmente dan lugar a las formación de los metabolitos sulfatados (*trans*-resveratrol-3-sulfato, *trans*-resveratrol-4'-sulfato, *trans*-resveratrol-3,5-disulfato, *trans*-resveratrol-3,4'-disulfato, *trans*-resveratrol-3,4',5-trisulfato) y glucurónicos (*trans*-resveratrol-3-Oglucurónico) (114-115). La estructura del resveratrol se ha localizado intacta en ciertos órganos lo que indicaría que el resveratrol no sufre reacciones de metabolización de fase I (117). La mayoría de los investigadores coinciden en la baja biodisponibilidad del resveratrol en plasma y tejido, sin embargo, Abd El-Mohsen y colaboradores. demostraron que el ³H-*trans*-resveratrol fue la forma mayoritaria en hígado, pulmones, corazón y cerebro tras una administración oral (118).

Debido a las reacciones de metabolización que sufre el resveratrol, se espera que una dieta rica en grasas favoreciese la absorción y la biodisponibilidad del mismo, ya que se trata de un compuesto lipofílico. Sin

embargo, Vitaglione y colaboradores, demostraron que la absorción del resveratrol contenido en el vino administrado por vía oral en humanos es independiente del contenido de lípidos en la dieta (119).

1.3.3.4 Potenciales efectos del resveratrol sobre la salud

Actualmente, la ciencia muestra un gran interés por el resveratrol dado que presenta una amplia variedad de actividades biológicas como antioxidante, antialérgica, antiinflamatoria, vaso relajante, antiagregante plaquetaria, estrogénica, reguladora de la lipólisis, osteogénicas, anticancerígena y neuroprotectora, entre otras (120-122).

1.3.4 Genisteína

Como se ha comentado anteriormente la genisteína (4',5,7-Trihidroxi Isoflavona) es una isoflavona con un esqueleto de 15 carbonos, que se clasifica como fitoestrógeno por su similitud estructural con el estradiol (figura 1.7) (123). Está presente mayoritariamente en la soja aunque otras legumbres como los garbanzos y guisantes verdes también la contienen (124).

Fue aislado por primera vez de *Genista tinctoria* L. en 1899 y recibió el nombre del género de esta planta. Desde entonces, se ha encontrado que es el principal metabolito secundario de la especie *Trifolium* y *Glycine max* L. (sinónimo Soja hispida) (125). Posee una alta solubilidad en solventes polares que incluyen dimetilsulfóxido, acetona y etanol, aunque su solubilidad es mucho menor en agua.

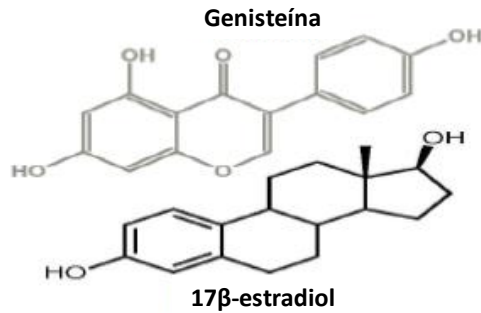


Figura 1.7: Similitud estructural entre el 17β-estradiol y la isoflavona genisteína.

1.3.4.1 Historia

La historia de los fitoestrógenos y con ella la de la genisteína se remonta hasta el 1927 año en el que se conoce que los extractos de algunas plantas muestran actividad estrogénica. Más tarde fue Walz, en 1931 quien descubrió que los alimentos ricos en soja tienen un alto contenido en sustancias con acción estrogénica, especialmente isoflavonas (126).

Pero no fue hasta 1946 cuando se identificó por primera vez que los compuestos vegetales con acción estrogénica (fitoestrógenos) pueden tener actividad biológica. Pronto se identificó una isoflavona, el equol, como factor etiológico de la infertilidad que sufría un grupo de ovejas de Australia Occidental. El origen del equol estaba en el forraje que consumían, constituido básicamente por un trébol llamado *Trifolium subterraneum* (127).

Sin embargo, el conocimiento profundo y actual que tenemos de los fitoestrógenos arranca de 1982, cuando Axelson y posteriormente, en 1984, Setchell y colaboradores, identificaron isoflavonas (fitoestrógenos de la soja) en la orina de humanos (128). Es a partir de aquí cuando realmente

se inician estudios epidemiológicos y de laboratorio para aclarar la importancia de la acción de estos compuestos de la dieta sobre la salud humana.

1.3.4.2 Epidemiología

Existen varios estudios epidemiológicos y experimentales que demuestran que el alto contenido de soja en la dieta está asociado a una menor incidencia de ciertas patologías, como son la enfermedad cardiovascular, algunos cánceres hormono dependientes, como el de mama, endometrio, próstata y colon, la osteoporosis, y las alteraciones del ciclo menstrual (129-133).

Estos estudios han comparado la dieta occidental con la dieta oriental, encontrando que el consumo de productos derivados de la soja, y en especial de isoflavonas, varía ampliamente (134). De hecho, la concentración típica de genisteína en alimentos derivado de la soja es de 1 a 2 mg por g de proteína, y los asiáticos consumen 20 a 80 mg de genisteína por día en la dieta habitual, por el contrario, el promedio americano ingiere sólo de 1 a 3 mg por día (135).

Ello se ve reforzado aún más cuando descubren que inmigrantes japoneses en los Estados Unidos, que cambian sus hábitos dietéticos (136), al cabo del tiempo igualan su riesgo con respecto a la población general; esto sugiere que no solamente los factores raciales y genéticos están implicados en el desarrollo de estas enfermedades (137).

Por su parte, la experiencia común en Japón muestra que cuando se administra una dieta muy rica en fitoestrógenos no aparecen fenómenos de feminización en la población masculina (138).

Cabe destacar el interés que ha despertado últimamente el uso de estos compuestos en varios aspectos relacionados con la salud de la población. Ello nos permite intuir que la genisteína pueda ser utilizada de un modo beneficioso para estudios encaminados a mejorar la calidad de vida de la población.

1.3.4.3 Mecanismo de acción

Debido a su similar estructura química al 17β -estradiol, la genisteína tiene la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos, siendo mayor su afinidad por el ER- β que por el ER- α (139-140). Dado que pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos, han sido agrupados dentro de los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (141). Sin embargo, este no es el único mecanismo por el cual los fitoestrógenos ejercen sus efectos; muchos de ellos no están relacionados con sus propiedades estrogénicas.

Así pues, los mecanismos de acción de estos compuestos se pueden dividir en dos, dependiendo de si son hormono-dependientes (mediados por receptor estrogénico) o no hormonales (independientes de receptor estrogénico) (142).

1.3.4.4 Farmacocinética

La base para entender los beneficios de las isoflavonas requiere un conocimiento detallado sobre la absorción, distribución, metabolismo, eliminación y biodisponibilidad de estos fitoestrógenos.

Parece que los principales compuestos fitoestrogénicos y sus metabolitos difieren en su actividad biológica, debido al papel crucial que desempeña la microflora intestinal en su metabolismo (143). Así, todos los estudios de metabolismo tras la ingesta de preparados de soja e isoflavonas muestran grandes variaciones interindividuales de los parámetros de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de las mismas (144-145).

La mayoría de los fitoestrógenos dietéticos se encuentran como glucósidos, en la soja encontramos principalmente daidzina, genistina y glicitina. Estos compuestos conjugados de glucosa son biológicamente inactivos (146), pero después de su consumo, dichos glucósidos son probablemente hidrolizados, en parte por el ácido gástrico, y ampliamente biotransformados en el intestino por la acción de las β -glucosidasas que separan el resto glucídico y las convierten en agliconas, que son biológicamente activas; las principales de la soja son la genisteína, la daidzeína y la gliciteína (147).

Las formas activas (agliconas) genisteína, daidzeína y gliciteína, que son absorbidas por la mucosa intestinal y transportadas por la vena porta al hígado donde, por acción de las enzimas glucuroniltransferasas y sulfottransferasas, forman conjugados de glucurónidos y sulfatos, siendo la

glucuronización la principal vía de biotransformación de las isoflavonas (148).

Tras este primer paso hepático las formas activas pueden pasar a la circulación general o seguir la vía enterohepática por la que vuelven al intestino donde la microflora colónica vuelve a actuar sobre ellas produciendo metabolitos como equol y O-desmetilangolesina, derivados de la daidzeína, o p-etilfenol, derivado de la genisteína (149). Esta vía de metabolización es clínicamente relevante para la eficacia de las isoflavonas de la soja, debido a que la potencia estrogénica del equol es un orden de magnitud más alta que la de su precursor la daidzeína (150).

La vida media de las isoflavonas y sus metabolitos en plasma está entre las 7 y 9 horas en adultos, con un pico máximo dentro de las 4 y 8 horas después de su ingestión (139). Mientras que su excreción, a través de la orina (mayoritaria) o las heces, empieza durante las 24 horas posteriores a su ingesta. De ahí que se suele recomendar su consumo en varias y menores tomas a lo largo del día y no en única, aunque alta dosis diaria (151-152).

Por lo tanto, para el estudio de la farmacocinética de las isoflavonas hay que considerar factores que influyen en la absorción y metabolismo de los fitoestrógenos, y que incluyen la dieta y la microflora intestinal, entre otros (153), ya que precisamente de ello depende sus posibles efectos sobre el organismo.

1.3.4.5 Potenciales efectos de la genisteína sobre la salud

De los posibles mecanismos de acción de la genisteína, tenemos por una parte los asociados a su actividad estrogénica que se cree que son los responsables de la mayoría de sus efectos beneficiosos sobre los procesos hormono-dependientes. Procesos como la reducción de la pérdida de la masa ósea asociada a la osteoporosis, la mejoría de los síntomas menopáusicos y la reducción de los niveles de LDL en plasma (154).

Por otro lado, también se han descrito algunos de sus efectos no relacionados con los receptores estrogénicos. Estos efectos incluyen su actividad antiproliferativa, inhibición de la tirosin kinasa C, ADN topoisomerasa II, actividad antioxidante, inhibición de la angiogénesis y la inhibición de la prostaglandina sintasa (155-157), las cuales están relacionadas con su potencial anticancerígeno.

Es por ello que diversos estudios han demostrado que el consumo de genisteína está asociado a una menor incidencia de ciertas patologías, como son la enfermedad cardiovascular, alzhéimer, algunos cánceres hormonodependientes, como el de mama, endometrio, próstata y colon, la sintomatología climatérica, la osteoporosis, y las alteraciones del ciclo menstrual (87, 125, 129, 132, 158).

Son varios los mecanismos por los que los fitoestrógenos pueden prevenir o reducir las enfermedades cardiovasculares. Éstos incluyen: Su actividad antioxidante sea sobre-expresando enzimas antioxidantes o inhibiendo la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno, y aniones superóxido (157, 159). Así como la mejora del perfil lipídico, ya que disminuía el

colesterol total en un 9.3%, el colesterol LDL en 12.9%, y los triglicéridos en 10.5% (160). También son varios los estudios clínicos que demuestran que las isoflavonas reducen la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación (161). En modelos animales de obesidad, la ingesta de proteína de soja limita o reduce la acumulación de grasa corporal y mejora la resistencia a la insulina, que es un marcador de la obesidad humana (162-163).

Aunque se ha visto que los fitoestrógenos pueden mejorar las capacidades cognitivas son pocos los estudios que se han hecho al respecto (164). Algunas investigaciones han puesto de manifiesto los beneficiosos efectos de la suplementación con soja mejorando las tareas de memoria y aprendizaje (165). Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que los fitoestrógenos, en concreto la genisteína, podrían prevenir la aparición de la enfermedad de Alzheimer al prevenir la formación de oxidantes por la mitocondria y protegerla del citotóxico β -amiloide (87, 166).

Como hemos comentado anteriormente a la genisteína se le atribuyen múltiples propiedades, entre ellas algunas antioxidantes como: responsable de la disminución de los niveles de anión superóxido y de LDL oxidadas (159). Ya que tiene la capacidad de frenar la producción de radicales libres además de sobre-expresar enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa (157, 167). Además reciente, en nuestro laboratorio hemos visto que la genisteína imita el efecto protector del estradiol, por un lado, disminuyendo la producción de oxidantes y por otro, evitando la liberación de citocromo C desde la mitocondria (168).

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El tratamiento con resveratrol o genisteína puede inducir variaciones en el metabolismo energético de los ratones, debido a modificaciones en el metabolismo glucídico o lipídico.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el metabolismo energético en ratones macho C57BL/6, *in vivo*.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar por calorimetría indirecta el gasto energético, antes y después de la administración de resveratrol o genisteína.
2. Determinar si la administración de resveratrol o genisteína, induce variaciones en la vía glucolítica.
3. Determinar si la administración de resveratrol o genisteína, induce variaciones en el metabolismo lipídico.
4. Determinar el perfil metabolómico en plasma de los ratones tras el tratamiento con resveratrol o genisteína.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Animales de experimentación

Para la presente tesis empleamos ratones C57BL/6J, machos de 18 ± 1.2 meses de edad, que se mantuvieron en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina, bajo condiciones de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12 h) constantes. Los ratones dispusieron de agua y comida *ad libitum*.

El procedimiento experimental ha sido aprobado por “El Comité d’Ética en Investigació de la Universitat de València” (A1480605135061) y por la “Conselleria de agricultura pesca i alimentacio”.

3.1.2 Aparatos

- **Balanzas:**
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de ± 0.0001 g.
 - Balanza de precisión Sartorius, modelo Aculab, sensibilidad ± 0.0001 g.
 - Balanza Gram Precision, modelo AHZ, sensibilidad 0.01 g.
- **Centrífugas:**
 - Centrífuga Sorvall, modelo GLC-1.
 - Centrífuga Sigma, modelo 1-14.
 - Centrífuga Hettich, rotor 35 R para tubos eppendorfs.
 - Centrífuga de placas, marca Eppendorf, modelo Centrifuge.
- **Espectrofotómetro.**
 - Espectrofotómetro Jenway 7315.

- Espectrofotómetro Nanodrop 2000.
- Espectrofotómetro Molecular Devices, espectralmax plus 384.
- **pH metro**
 - Marca Crison, modelo GLP21.
- **Homogeneizador**
 - Marca IKA-WERK, modelo Janke y Kunkel RW 20 DZH.
- **Sistema de purificación de agua:**
 - Marca Millipore, modelos Milli-Q y Milli-R.
- **Autoclave**
 - Marca Selecta, modelo Autester-G.
- **Equipo de ultrasonidos**
 - Marca Sonics, modelo Vibra-cell.
- **Fuentes de alimentación de electroforesis**
 - Marca Bio-Rad, modelo PowerPac Basic.
- **Cubetas de electroforesis**
 - Marca Bio-Rad, modelo Mini-Protean 3 Cell.
- **Cubetas de electrotransferencia**
 - Marca Bio-Rad, modelo mini Trans-Blot Cell.
- **Material adicional para electroforesis**
 - Peines, cristales... Marca Bio-Rad.
- **Sistema de digitalización y análisis de imágenes**
 - Image quant LAS 4000, GE-Healthcare Bio-Sciences.

- **Agitador magnético**
 - Marca Selecta, modelo Agimatic-S.
- **Agitador orbital**
 - Marca Heidolph Instruments, modelo Polymax 1040.
- **Baño seco**
 - Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D.
- **Baño termostatzado**
 - Marca SBS modelo BT, de agitación automática regulable.
- **Termocicladores**
 - Marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp® PCR System 9700.
 - Marca Applied Biosystems, modelo 7900HT Fast Real-Time PCR System.
 - QuantStudio® 5 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).
- **Campanas de flujo laminar**
 - Marca Burdinola, modelo OR-ST 1200.
 - Marca Crumair.
- **Analizador de gases**
 - Jaula metabólica, Oxylet-Physiocage de Panlab y analizador de gases, LE405 oxygen sensor, de Panlab, Harvard Apparatus Barcelona, España.

- **Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de 14.1 Teslas**
 - Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH) equipado con sondas de 5mm (500 µL de muestra) y de 1mm (20 µL de muestra) con capacidad de detección de $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$.
- **Robot SampleJet**
 - (Bruker Biospin GmbH) con capacidad para muestreo automático de 480 tubos.
- **Congeladores**
 - -80°C marca Froilabo, modelo BMT690.
 - -20 °C marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost.
 - 4 °C Nevera Lynx.

3.1.3 Reactivos

- **Determinación de proteínas totales:**
 - Se empleó el *Protein ASSAY kit* de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo Lowry y Folin.
- **Revelado de las membranas de los Western blottings:**
 - Para revelar las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (marca Bio-Rad) se empleo el *Luminata Classico Western HRP substrate*.
- **Ensayos enzimáticos**
 - *Mouse malonyl coenzyme A ELISA Kit* (ref MBS705127).
 - *Mouse Carnitine-Acylcarnitine Translocase* (ref MBS044510).
 - *Ultra Sensitive Mouse Insuline ELISA Kit* de Crystal Chem (ref 90080).
- **Aislamiento de RNA total**
 - Se utilizó el kit *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen™).
- **Retrotranscripción y amplificación**
 - *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* de Applied Biosystem.
 - *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* de thermo Scientific.
- **Determinación de la actividad fosfofructokinasa**
 - *Phosphofructokinase (PFK) Activity Colorimetric Assay Kit* de sigma.

- **Otros reactivos**

- Resveratrol, Sigma ref: R 5010; Genisteína, Sigma ref: G 6649; Aceite de maíz, Dimetilsulfóxido (DMSO).
- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris) 1.5 M y 0.5 M, acrilamida/bisacrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), β -Mercaptoetanol, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de potasio (169), glicina, azul Coomassie, rojo Ponceau, ácido etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), etc, de sigma-Aldrich.
- El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Molecular Probes, Panreac.

3.2 Métodos

3.2.1 Tratamiento

3.2.1.1.1 Tratamiento con genisteína

La genisteína (Sigma) se administró a una dosis de 0.14 mg/kg/día vía intraperitoneal. Esta mezcla se preparó la semana anterior a la administración disolviéndolo en aceite de maíz. Para facilitar la disolución de la genisteína con el aceite, se agitó en un vórtex.

Durante dos días consecutivos, entre las 10:00 y las 11:00 se inyectó la dosis de genisteína en el grupo experimental.

3.2.1.1.2 Tratamiento con resveratrol

El resveratrol (Sigma) se administró a una dosis de 2.3 µg/kg/día vía intraperitoneal. Esta mezcla se preparó la semana anterior a la administración disolviéndolo en aceite de maíz. Para facilitar la disolución del resveratrol con el aceite, se agitó en un vórtex.

Durante dos días consecutivos, entre las 10:00 y las 11:00 se inyectó la dosis de resveratrol en el grupo experimental.

3.2.1.1.3 Tratamiento con vehículo

A los grupos correspondientes se les inyectó la solución vehículo compuesta por aceite de maíz.

Al igual que en el grupo con tratamiento, el vehículo se inyectó durante dos días consecutivos, entre las 10:00 y las 11:00.

3.2.2 Gasto metabólico en reposo

El gasto metabólico fue medido por calorimetría indirecta utilizando el sistema *Oxylet-Physiocage* de Panlab (Harvard Apparatus, Barcelona, España). El cual consiste en una jaula metabólica hermética, en la que se introduce al animal y se establece un flujo de aire continuo, de manera que el aire saliente de la jaula es medido por el analizador de gases (LE405 *oxygen sensor*, Panlab, Harvard Apparatus Barcelona, España) determinando el porcentaje de O₂ y CO₂ contenido en el aire.

El sistema fue calibrado semanalmente según las especificaciones del fabricante. Durante las mediciones los animales disponían de comida y bebida *ad libitum*. La jaula fue limpiada diariamente y autoclavada una vez a la semana.

Los animales a las 24h de la administración de la segunda dosis de tratamiento, fueron sacados de sus jaulas habituales e introducidos en la jaula metabólica durante 24h. Periodo durante el cual se midió el intercambio de gases en la caja metabólica mediante ciclos de 5 min, comparando cada 5 min con el aire del exterior de la jaula.

Los datos de intercambio respiratorio fueron analizados a continuación con el software *Metabolism v2.2.02* (Panlab, Harvard Apparatus, Barcelona, España) que calcula el volumen de O₂ inspirado y de CO₂ espirado por el animal.

3.2.3 Sacrificio de los animales

Tras 24h en la jaula metabólica los animales se sacaron y se sacrificaron entre las 10:00 y 11:00 horas de la mañana del día correspondiente. El sacrificio se realizó por dislocación cervical del animal.

3.2.4 Extracción y conservación de muestras

Una vez sacrificado el animal, se procedió inmediatamente a la recogida de la mayor cantidad posible de sangre en un tubo con heparina como anticoagulante.

El volumen de sangre recogido se centrifugó a 1500 g durante 10 min a temperatura ambiente para obtener el plasma. Seguidamente, éste se congeló en alícuotas a -80°C para posteriores determinaciones.

Tras la recogida de sangre, se procedió a la apertura del cráneo, para la extracción del cerebro y de la cavidad abdominal para obtener el resto de órganos de interés de los animales, como hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones y grasa. A continuación se procedió a la disección de las patas traseras para aislar los músculos: gastrocnemio y soleo.

Todos órganos fueron congelados inmediatamente mediante la técnica del *freeze-clamping* en nitrógeno líquido a -196°C para su posterior conservación a -80°C .

3.2.5 Determinación de proteínas por *western blotting*

3.2.5.1.1 Extracción de proteínas.

Para la determinación de proteínas de los diferentes órganos se realizó un homogenado de las muestras conservadas mediante la técnica del *freeze-clamping*.

- **Reactivos**

- Tampón 1: 3.766 mL de TRIS 76.5 mM, 10% de glicerol (v/v), 2% de SDS (p/v), 40 µL ortovanadato de sodio (200mM), 40 µL de cóctel inhibidor de proteasas de Sigma.

- **Procedimiento**

1. Introducir 50 mg de tejido congelado en un eppendorf con nitrógeno líquido.
2. Añadir 500 µL a las muestras de hígado de tampón 1.
3. Homogeneizar con émbolo especial de eppendorfs.
4. Sonicar el homogenado 5 segundos en hielo a baja intensidad.
5. Dejar reposar 30 min en hielo para facilitar la ruptura tisular.
6. Centrifugar 12 min a 12000 g a 4°C.
7. Recoger sobrenadante y congelar.

3.2.5.1.2 Determinación de proteínas: método de Lowry.

- **Fundamento**

Se tomó una cantidad de homogenado recogida como se describe en el apartado anterior y el resto se conserva a -20°C hasta su posterior utilización. Empleamos el *Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification* de Sigma-Aldrich, basado en una modificación de Peterson del

método de Lowry (170-171). El reactivo de Lowry, incluido en el kit, contiene SDS, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas.

El método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin, dando un complejo coloreado. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molbidoato sódico en ácido fosfórico y clorhídrico. El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^+ . Este ión, así como los grupos R de los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin, produciéndose inicialmente un producto inestable que se reduce para formar un compuesto coloreado azul.

La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas de la disolución.

La concentración de una disolución no conocida se calculó extrapolando en una recta patrón la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 660 nm.

- **Reactivos**

- Reactivo Lowry: a partir del reactivo comercial *Lowry Reagent Powder*, se añaden 40 mL de agua desionizada a la botella que contiene dicho reactivo. A continuación, mezclar hasta disolver por completo.

- Reactivo Folin: añadir 90 mL de agua desionizada a 18 mL de la solución *Folin & Ciocalteu's Phenol Regaent* en una botella opaca y mezclar bien.
- Agua milli-Q.
- Homogenado de tejido.
- Seroalbúmina bovina (BSA): Para realizar la recta patrón.

- **Preparación de la recta patrón**

Dado que, como hemos mencionado anteriormente, la cuantificación de proteínas totales de las muestras analizadas se realizó gracias a una curva patrón, previamente al ensayo habrá que proceder a prepararla:

1. Preparar un concentrado de BSA (10 mg/mL): pesar 10 mg de BSA en un eppendorf y añadirle 1 mL de agua desionizada.
2. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón:

5 mg/mL (diluir a la mitad la solución de 10 mg/mL).

2.5 mg/mL (diluir a la mitad la solución anterior).

1 mg/mL (diluir 1/10 la solución de 10 mg/mL).

0.5 mg/mL (diluir a la mitad la solución anterior).

0.1 mg/mL (diluir 1/10 la solución 1 mg/mL).

Blanco (sólo agua desionizada).

- **Protocolo**

1. En un eppendorf pipetear 490 μ L de agua desionizada y 10 μ L de la muestra diluida previamente.
2. Añadir 500 μ L del reactivo de Lowry e incubar 20 min en oscuridad.

3. Añadir 250 μL del reactivo de *Folin Ciocalteu* e incubar 30 min en oscuridad.
4. Medir la absorbancia a $\lambda = 660 \text{ nm}$.

- **Cuantificación de los resultados**

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA e interpolar en esa recta los valores de absorbancia obtenidos de nuestras muestras. El valor que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

3.2.5.1.3 Western blotting

- **Fundamento**

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones desnaturizantes. Para la realización de esta técnica es imprescindible que las proteínas se encuentren completamente desnaturizadas. Para ello, utilizamos dos agentes desnaturizantes, el SDS como detergente y el β -mercaptoetanol como agente reductor, que provoca la rotura de los puentes disulfuro. De este modo obtenemos proteínas en su estructura primaria.

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas enlazan 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Con esto tendremos la misma densidad de carga, que va a ser prácticamente constante y sólo difieren en su longitud, de acuerdo con el tamaño de la proteína. Por lo tanto, la separación se basa únicamente en el tamaño de la proteína. Además, todos los complejos proteína/SDS tendrán carga negativa y migrarán en el mismo sentido.

- **Preparación de las muestras**

Después de determinar la concentración de proteínas en los homogenados, procedemos a preparar las muestras en tampón de carga de proteínas (Tris 40 mM pH 6.8, EDTA 4 mM, sacarosa 40% (p/v), SDS 4% (p/v), β -

mercaptoetanol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v)) en una razón de 1/1. Este compuesto sirve para mejorar la conservación de la muestra y teñirla para poder visualizarla en el gel. La sacarosa aumenta la densidad de las mismas. El azul de bromofenol es una molécula que por su bajo peso molecular migra muy rápidamente en el gel y por ello se utiliza como referencia para conocer el estado de la electroforesis.

- **Condiciones del gel y electroforesis**

En primer lugar, se debe determinar cuál es el porcentaje más adecuado de acrilamida/bis-acrilamida que debe presentar el gel. En función del peso molecular de la proteína que se quiere determinar.

Para aumentar la resolución de estos geles es conveniente hacerlos discontinuos, es decir, se elabora un gel de concentración y un gel de separación de proteínas. El gel de concentración o *Stacking gel* posee un porcentaje bajo de acrilamida y un pH de 6.8, su misión es la de concentrar todas las proteínas en una banda lo más estrecha posible. El gel de separación separa las proteínas de la muestra y posee un pH de 8.8, y su porcentaje de acrilamida dependerá de la proteína de interés.

Inicialmente, se preparan los geles de separación (H₂O, Tris-HCl 1.5 M, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, APS 10%, TEMED). Se vierte esta solución entre los cristales, previamente montados y limpios, hasta un poco más de la mitad de la altura y sobre esta se añade isopropanol 50% para aislar al gel del aire y favorecer su polimerización. Una vez polimerizado el gel, se retira el isopropanol y se seca cuidadosamente con papel de filtro para añadir encima la solución del gel de concentración (H₂O, Tris-HCl 0.5 M,

SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida, APS 10%, TEMED). Enseguida se colocan los peines entre ambos cristales. Éstos se retiran cuando haya polimerizado el gel, y se comprueba los pocillos del gel, en los cuales se depositarán las muestras, se han formado correctamente.

Previamente a la carga de las muestras, se colocan los cristales en el soporte correspondiente dentro de la cubeta de electroforesis que se llena con tampón de electroforesis 1x a 4°C, cuya composición fue la siguiente (0.025 M Tris, 0.2 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3).

Las proteínas junto con el marcador de peso molecular (*PageRuler™ Plus Prestained protein Loader*, thermo Scientific) se calientan a 100 °C durante 5 min, se agitan y se cargan en el gel. En todos los pocillos se carga la misma cantidad de proteínas para poder realizar después el estudio comparativo.

A continuación, las proteínas se someten a un campo eléctrico según su tamaño y conformación.

- **Transferencia de las proteínas a un soporte sólido**

Una vez finalizada la electroforesis, se comienza con la transferencia de las proteínas, *blotting*, a una membrana de PVDF de diámetro de poro de 0.2 µm (Bio-Rad). Al ser hidrófobas las membranas de PVDF, requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas.

Los geles se montan en un sistema de sándwich. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cubeta, en la

que se encuentra un tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8.3), con dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Y se coloca de tal forma que la membrana quede hacia el ánodo (figura 2.1).

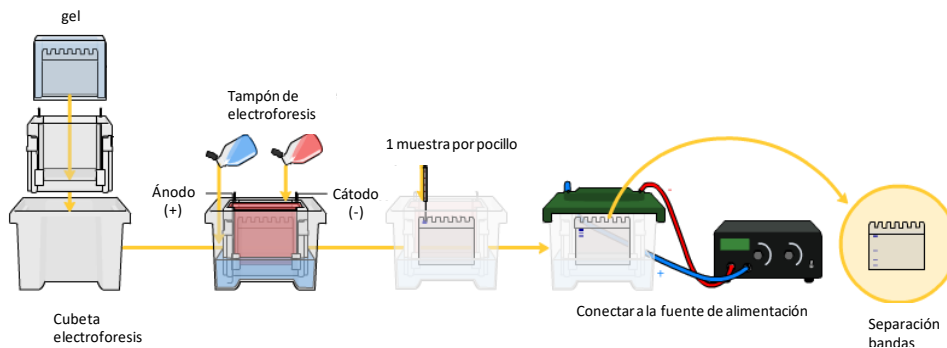


Figura 3.1 Esquema electroforesis SDS-PAGE.

La transferencia puede llevarse a cabo con una intensidad constante de 180 mAmpere/hora por membrana y a temperatura ambiente.

- **Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado**

1. Tras la transferencia, las membranas se bloquean con solución de bloqueo: BSA 5% en TBS-T (p/v) durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación.
2. Se realizan 3 lavados de 5 min con 10 mL de TBS-T.
 - TBS-T:
 - 0.1% Tween-20.
 - En 1x TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6).

3. Las membranas se incuban, durante toda la noche a 4°C en agitación orbital, con el anticuerpo primario (con las diluciones correspondientes en BSA 5% o leche 5% (p/v)) ver Tabla 2.1.
4. Se realizan 3 lavados de 10 min con TBS-T.
5. Las membranas son incubadas 60 min con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo a la concentración especificada por la casa.
6. Se realizan 3 lavados de 10 min.
7. Se procede a revelar las membranas mediante una reacción de quimioluminiscencia con el *Luminata Classico Western HRP substrate*.

- **Cálculos**

Las imágenes obtenidas se almacenan en formato digital TIF para poder realizar la densitometría de las bandas, utilizando el programa “Image J”.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresan en función de los valores de la GAPDH en tejido.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	KDa	Dilución
AMPK	Cell Signaling	2793S	62	1:1000
p-AMPK	Cell Signaling	2531S	62	1:1000
GAPDH	Sigma	G9545	36	1:10000
ACC1	Cell Signaling	3662	280	1:1000

Tabla 3.1: Descripción de los anticuerpos utilizados para Western blotting.

3.2.6 Determinación de la expresión génica

3.2.6.1.1 Aislamiento de RNA

- **Fundamento**

Para la extracción de RNA total de los tejidos se utiliza como reactivo *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™), siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por el fabricante, que es una modificación del método de extracción en un solo paso de Chomczynski y Sacchi (172). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). De este modo podremos separar las proteínas y el DNA, del RNA.

- **Reactivos**

- Tampón de extracción: TRIzol®.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol 75%.
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0.01% (v/v).

- **Procedimiento**

Según las instrucciones del TRIzol®, seguimos los siguientes pasos, para cada una de las muestras:

1.- Homogenado:

Pesar 50-100 mg de tejido y añadirlos al homogeneizador con 1mL de TRIzol®. Después de homogenizar centrifugar 12000 g 10 min 4 °C y recoger el sobrenadante en un tubo nuevo.

2.- Separación de fases:

- Incubar las muestras homogenadas durante 5 min a 15- 30 °C (completa disociación de complejos nucleoproteicos).
- Añadir cloroformo (0.2 mL por 1 mL de TRIzol® usado).
- Tapar bien y agitar fuertemente los tubos eppendorfs durante 15 segundos.
- Incubar durante 2-3 min a 15-30 °C.
- Centrifugar a no más de 12000 g durante 15 min a 2-8 °C.

➤ Obtenemos dos fases:

Debajo de color rojo: cloroformo-fenol.

Arriba incoloro: fase acuosa que contiene el RNA, 60% del volumen de TRIzol® usado en el homogenado.



3.- Precipitación del RNA:

- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo.
 - Precipitar el RNA de la fase acuosa con isopropanol (0.5 mL por cada 1 mL de TRIzol®).
 - Incubar durante 10 min a 15-30°C.
 - Centrifugar a no más de 12000 g durante 10 min a 2-8 °C.
- Aparece el RNA precipitado formando un pellet blanco visible en el fondo.

4.- Lavado del RNA:

- Retirar el sobrenadante.
- Lavar el pellet de RNA una vez con etanol al 75% (1 mL de etanol 75% por cada 1 mL de TRIzol®).
- Centrifugar a no más de 7500 g durante 5 min a 2-8 °C.

5. Redisolver el RNA:

- Eliminar el sobrenadante y secar el pellet (ambiente o vacío, unos 5 a 10 min).
- Disolver el RNA en agua DEPC. Agitar con vórtex para favorecer la disolución.
- Calentar a 60°C durante 10 min.

3.2.6.1.2 Determinación de pureza e integridad del RNA total

La cuantificación de la concentración del RNA se realiza mediante medida espectrofotométrica a 260 nm (con NANODROP 2000 Spectrophotometer), y la comprobación de la pureza mediante la relación de las medidas 260/280 nm. Valores comprendidos entre 1.8 y 2.0 indican que se obtuvo un RNA de buena calidad. El NANODROP es un espectrofotómetro de amplio espectro (220-270 nm), mide muestras de 1 µL con alta precisión y reproducibilidad mediante métodos de tensión superficial.

3.2.6.1.3 Retrotranscripción-Amplificación del RNA (RT-PCR) en tiempo real.

En la actualidad, existen varios métodos de determinación de la expresión del RNA mensajero, como el *Northern Blotting*, la hibridación *in situ*, los

ensayos basados en la protección frente a las RNAsas, *arrays* de DNA copia (cDNA) y retrotranscripción-amplificación (RT-PCR) del mRNA.

Nosotros empleamos la RT-PCR para determinar la expresión del mRNA, que consta básicamente de dos pasos:

3.2.6.1.4 Síntesis de cDNA: Retrotranscripción (RT)

- **Fundamento**

Consiste en la obtención de un cDNA a partir de un mRNA, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias unas DNA polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en vez de DNA. Para poder expresar sus proteínas, han de pasar la información a DNA. La transcriptasa inversa utilizada en esta tesis es MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems).

La obtención del cDNA se llevó a cabo mediante una transcripción reversa usando el kit de Applied Biosystems *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* y las condiciones recomendadas por el fabricante.

- **Reactivos**

- Tampón (específico del enzima, le permite ser activa y llevar a cabo su función).
- dNTPs (solución de desoxinucleotidos trifosfato necesarios para la síntesis de cDNA).
- Cebadores al azar (puntos de anclaje que servirán a la retrotranscriptasa para iniciar la síntesis).

- Enzima MsRT (reconoce el RNA molde y tiene la actividad DNA polimerasa).
- Inhibidor de RNasas.
- Agua libre de RNasas.

- **Procedimiento**

1. Preparar 2X RT *Master Mix* (sobre hielo) como se indica en la tabla

2.2 :

10X Buffer (10X)	2 μ L
25X dNTPs Mix (100 mM)	0.8 μ L
10X Cebadores	2 μ L
<i>MultiScribe Reverse transcriptase</i>	1 μ L
Inhibidor de RNasas	1 μ L
Agua libre RNasa	3.2 μ L
Volumen final por reacción	10 μ L

Tabla 3.2: Componentes de la *mix* de retrotranscripción.

2. Mezclar suavemente y dejar sobre hielo.
3. Preparar la reacción de la retrotranscripción.
 - Pipetear 10 μ L de 2X RT *Master Mix* en cada pocillo que vayamos a usar de la placa de 96 pocillos.
 - Añadir 10 μ L de RNA (1 μ g) y mezclar suavemente.
4. Centrifugar la placa para eliminar las posibles burbujas de aire que puedan quedar en los pocillos.
5. Llevar al termociclador, el perfil de temperaturas será:

25°C 10 min; 37°C 120 min; 85°C 5 min; 4°C ∞

3.2.6.1.5 Amplificación cuantitativa del RNA (PCR) a tiempo real

Una vez sintetizado el cDNA (mediante la RT), lo amplificamos por medio de la PCR a tiempo real (llamada también PCR cuantitativa). Este método permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de DNA.

El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de DNA, utilizando una cadena simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de DNA (oligonucleótidos) como cebadores de la síntesis. Estos cebadores o *primers* se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada una de las cadenas del DNA.

Los requerimientos de la reacción son simples: deoxinucleótidos (dNTPs) que proporcionan tanto la energía como las unidades de la síntesis, una polimerasa de DNA, cebadores, el DNA molde y un tampón que contenga magnesio.

El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gen a amplificar:

- Desnaturalización: separación de las cadenas complementarias del DNA.
- Unión o *annealing*: unión de los cebadores específicos a sus secuencias complementarias. La temperatura de unión es característica de cada pareja de cebadores.
- Extensión: síntesis de la hebra complementaria a partir del respectivo cebador.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del DNA, que viene dado por la expresión 2^n (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial.

- **Fundamento**

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una variante de la PCR estándar, que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación. Es decir, permite ver y analizar a tiempo real la amplificación del DNA molde.

Es actualmente el método más sensible y exacto para la detección de niveles de mRNA, tanto en células como en tejido.

La sustancia fluorescente utilizada en nuestros experimentos es *SYBR Green I*, el cual se une al DNA y emite fluorescencia sólo en el caso de que las dos hebras complementarias de DNA estén unidas.

En el caso de la PCR cuantitativa, el parámetro de medida de la expresión de un determinado gen no es la fluorescencia, sino el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial. Este ciclo se denomina ciclo umbral ("*threshold cycle*", *Ct*), pues es a partir del cual la amplificación empieza a ser realmente apreciable. De este modo, los valores de ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de cDNA de partida, puesto que cuanto más copias de mRNA de partida del gen

estudiado haya, más cDNA se obtendrá en la retrotranscripción, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

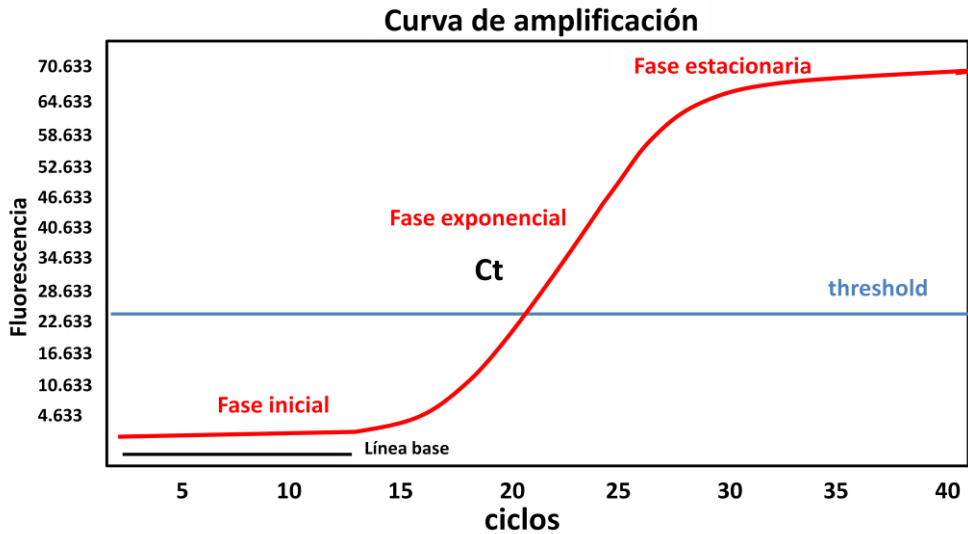


Figura 3.2: Cinética de amplificación de PCR a tiempo real (Ct).

Así pues, realizando una curva estándar de cantidades de mRNA de partida conocidas, este método permite la cuantificación relativa de la expresión de un gen en función de la expresión de un gen de expresión constitutivo, es decir, que no varía según diferentes condiciones. La cuantificación absoluta supone el conocimiento del número exacto de copias de mRNA de partida empleado para la realización de la curva estándar.

Cebadores empleados

Parte de los cebadores que se utilizaron para la determinación de los niveles de expresión de los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa GCG a partir de las secuencias génicas obtenidas en el “Genbank” de PubMed. Para cada uno de los genes a estudiar se seleccionaron los siguientes (Tabla 2.3).

Gen	CEBADORES SENTIDO	CEBADORES ANTISENTIDO
ACC-1	GTTGCACAAAAGGATTTTCAG	CGCATTACCATGCTCCGCAC
Akt	ATCCCCTCAACAACCTTCTTCTCAGT	CTTCCGTCCACTCTTCTCTTTC
PFK	CGTCTTTGAGGACCCTTCA	TCTGTGGTGTAGTGTTTCGTGACA
PGC1α	GGCAGTAGATCCTCTTCAAGATC	TCACACGGCGCTCTTCAATTG
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	AGATGATGACCCGTTTGGCT

Tabla 3.3: Secuencia de los cebadores utilizados en las PCR.

Para el resto de genes estudiados: AMPK α (Prkaa1), Cpt1a, CACT (Slc25a20) y EChs1, ACSL se utilizaron los cebadores de la casa Bio-Rad.

- **Procedimiento**

La PCR a tiempo real se realiza con el sistema de detección QuantStudio® 5 *Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Y usando el kit *Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X)*.

La reacción se realiza según el protocolo proporcionado por el citado kit. Cada una de las muestras analizadas se ensaya por triplicado. En cada una de las placas realizadas se añade el control endógeno de cada una de las muestras por triplicado y los controles negativos: sin cDNA, sin RNA y sin la enzima Transcriptasa.

Ajustamos los volúmenes de la reacción inicialmente como se muestra en la tabla 2.4.

Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5 μ L
Cebador sentido	0.3 μ M
Cebador antisentido	0.3 μ M
DNA molde 1 μ L	250 ng
Agua libre de RNasas	c.s.p 10 μ L

Tabla 3.4: qPCR componentes de la mezcla.

Usamos el diseño general de la placa, en el *software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.2* Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Y programamos el termociclador con perfil térmico característico de los cebadores usados (Tabla 2.5)

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Unió/ Extensión	60	60 s	
	95	15 s	
Curva de melting	60	15 s	1 (0.075°C/s)
	95	15 s	

Tabla 3.5: Condiciones del termociclador para RT-PCR.

- **Cálculos**

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y el *software* de análisis representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos.

El ciclo umbral (*threshold cycle*) (C_t) se convierte a una cantidad relativa a través del uso de una recta estándar construida de muestras agrupadas. La fórmula logarítmica utilizada para transformar los valores de C_t tanto para los genes estudiados y el control endógeno es:

$$Expo = \frac{(C_t \text{ muestra} - \text{Intercepto})}{Pendiente}$$

Por cada muestra, la cantidad del mRNA del gen diana se normaliza con el contenido de mRNA de GAPDH (control endógeno). Para que las eficiencias sean similares, las pendientes de ambas rectas deben ser similares, puesto

que la eficiencia de la reacción de amplificación viene dada por la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \left[10^{\left(\frac{1}{pendiente}\right)} \right] - 1$$

Para una pendiente de -3.322 obtenemos una eficiencia del 100%, lo cual significa que el aumento de un ciclo de amplificación durante la fase exponencial de la reacción supone exactamente la duplicación del material amplificado. Una reacción de amplificación debe tener una eficiencia lo más cercana al 100% para estar optimizada.

3.2.7 Determinación de la actividad fosfofructokinasa.

- **Fundamento**

La actividad PFK se determinó por un ensayo enzimático acoplado a una reacción colorimétrica, utilizando el kit "*Phosphofructokinase Activity Colorimetric Assay Kit*" de sigma. En el que la fructosa-6-fosfato y el ATP se convierten en fructosa-1,6-difosfato y ADP por PFK. El ADP se convierte mediante la mezcla de enzimas en AMP y NADH. El NADH resultante reduce una sonda incolora que da como resultado un producto colorimétrico (450 nm) proporcional a la actividad de PFK presente. Una unidad de PFK es la cantidad de enzima que generará 1.0 mmol de NADH por minuto a pH 7.4 a 37 ° C.

- **Preparación de reactivos**

1. *PFK Substrate and PFK Enzyme Mix*: reconstituir cada uno con 220 ml de *PFK Assay Buffer*.
2. *ATP and PFK Developer*: reconstituir cada uno con 220 ml de agua.
3. *NADH Standard*: reconstituir con 40 ml de tampón de ensayo PFK para generar una solución madre de NADH 10 mM (10 nmol / ml)
4. *Positive Control*: reconstituir con 100 µL of *PFK Assay Buffer*.

- **Preparación curva patrón**

1. Preparar el concentrado de 1 mM: diluir 10 µL de *NADH Standard* 10 mM con 90 µL de *PFK Assay Buffer*.
2. Añadir 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µL de 1 mM *standar solution* en diferentes pocillos. Añadir a cada pocillo el *assay buffer* necesario para un volumen final de 50 µL.

- **Procedimiento**

1. Centrifugar el homogenado de hígado, gastrocnemio o grasa abdominal a 13000 g, a 4 °C, durante 10 min.
2. Diluir las muestras de hígado y gastrocnemio 1:50 con el *PFK Assay Buffer*.
3. Añadir 50 µL de las diferentes diluciones de la curva o de las muestras en cada pocillo (por duplicado).

Nota: configurar la mezcla de reacción añadiendo el volumen suficiente para el total de muestras de acuerdo con el siguiente esquema: *PFK Assay Buffer* 42 µL; *PFK Enzyme Mix* 2 µL; *PFK Developer* 2 µL; ATP 2 µL; *PFK Substrate* 2 µL. Se requieren 50 mL de la mezcla de reacción apropiada para cada muestra.

4. Añadir 50 µL de la mezcla de reacción a cada pocillo y mezclar.
5. Incubar la placa a 37°C.
6. Después de los 5 min medir la absorbancia a 450 nm (T_{inicial}).
7. Continuar incubando la placa a 37°C y tomar medidas (A_{450}) cada 5 min, hasta que la muestra de mayor actividad supere el valor del estándar 10 mM. La medida final ($(A_{450})_{\text{final}}$) nos servirá para calcular la actividad enzimática.

- **Cuantificación de los resultados**

Corregir los datos usando el fondo del blanco. Usar el valor de la medida de $\Delta A_{450} = (A_{450})_{\text{final}} - (A_{450})_{\text{inicial}}$. Interpolar estos valores con la curva estándar (B).

La actividad de cada una de las muestras se calcula con la siguiente formula.

$$\textit{Actividad PFK} = \frac{B \times 50}{(\textit{tiempo de reacción}) \times \textit{Volumen muestra}}$$

3.2.8 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

- **Fundamento**

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es una técnica de inmunoensayo que permite detectar moléculas con gran precisión. Se basa en que el antígeno a determinar, es reconocido específicamente por el anticuerpo que recubre el pocillo (Figura 2.4). Una vez la molécula unida en la placa se aplica un segundo anticuerpo que reconoce otra región del antígeno. Este segundo anticuerpo está conjugado con la actividad enzimática de tipo peroxidasa (peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina (HRP)). Mediante esta actividad enzimática, el agua oxigenada (H_2O_2) presente en el tampón, se desdobra en H_2O y O_2 , el cual produce una reacción colorimétrica, como consecuencia de la oxidación del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Finalmente, la intensidad de la reacción colorimétrica, que es proporcional a la concentración de la molécula que estamos buscando en la muestra, se cuantifica por espectrofotometría mediante la lectura de la absorbancia. Los resultados se determinan interpolando a la curva patrón de concentraciones conocidas, los valores de absorbancia de cada una de las muestras a analizar.

En este caso se ha medido la concentración de Insulina, malonil-CoA y de carnitina-acilcarnitina translocasa. El método detallado se especifica a continuación:

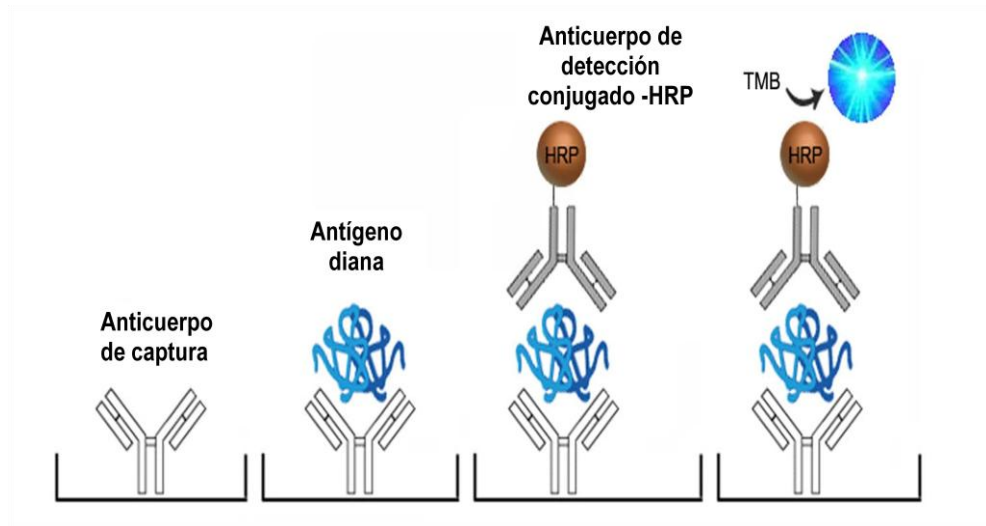


Figura 3.3 Unión específica antígeno anticuerpo en el método ELISA.

3.2.8.1.1 Determinación de los niveles de Insulina.

Los niveles de insulina en plasma fueron determinados mediante un ELISA, en concreto con el “Ultra Sensitive Mouse Insuline ELISA Kit” de Crystal Chem.

- **Preparación de los reactivos**

1. *Mouse insuline stock solution:* Añadir 100 μL de agua desionizada. Este estándar contine 25.6ng/mL de insulina de ratón.
2. *Anti-insuline enzyme conjugate:* Añadir en un tubo nuevo 3.6 mL de *anti-Insulin Enzme Conjugate Stock Solution* y 1.8 mL de *Enzyme Conjugate Diluyent*. Debe prepararse justo antes de ser usado.
3. *Wash Buffer (1x):* Diluir 25 ml de concentrado de tampón de lavado (20x) en agua desionizada para preparar 500 ml de *Wash Buffer Stock Solution*.

- **Preparación de la recta patrón**

Dado que la determinación de los niveles de insulina de las muestras analizadas se llevo a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo habrá que proceder a prepararla:

Tras preparar el *Mouse insuline stock solution* a 25.6 ng/mL. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón.

- 6.4 ng/mL (añadir 50 μ L de *Mouse insuline stock solution* y 150 μ L de *sample diluent*).
- 3.2 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 1.6 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.8 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.4 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.2 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.1 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- Blanco (sólo *sample diluent*).

- **Procedimiento**

1. Añadir 95 μ L de *sample diluent* en cada pocillo.
2. Añadir 5 μ L de la curva o de las muestras en cada pocillo (por duplicado) y cubrir la placa.
3. Incubar a 4°C durante 2 horas.
4. Retirar el líquido y lavar 5 veces.

5. Añadir 100 μ L de *anti insulin enzyme conjugate* y cubrir nuevamente la placa.
6. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos.
7. Lavar 7 veces con *Wash Buffer*.
8. Añadir 100 μ L de *enzyme substrate solution* y cubrir la placa de nuevo.
9. Incubar a temperatura ambiente 40 minutos en oscuridad.
10. Añadir 100 μ L de *reaction stop solution* en cada pocillo.
11. En los siguientes 30 min, leer la absorbancia a $\lambda = 450$ y a 630 nm en el espectrofotómetro.

- **Cuantificación de los resultados**

Los datos obtenidos se determinan interpolando las absorbancias de nuestras muestras de homogenado curva estándar, realizada de concentraciones conocidas. Los valores se expresan como ng/mg de proteína.

3.2.8.1.2 Determinación de los niveles de malonil-CoA

Los niveles de malonil-CoA en homogenado de hígado, gastrocnemio y grasa abdominal fueron determinados mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en concreto con el “malonyl coenzyme A (malonil CoA), ELISA Kit” de mybiosurce.

- **Preparación de los reactivos**

1. *Biotin-antibody* (1x): centrifugar el vial antes de abrir. *Biotin-antibody* requiere una dilución de 100 veces con *Biotin-antibody diluent*.

2. *HRP-avidin* (1x): Centrifugar el vial antes de abrir. La *HRP-avidin* requiere una dilución de 100 con el *HRP-avidin diluent*.
3. *Wash Buffer* (1x): Diluir 20 ml de concentrado de tampón de lavado (25x) en agua desionizada para preparar 500 ml de *Wash Buffer* (1x).

- **Preparación de la recta patrón**

Dado que la determinación de los niveles de malonil de las muestras analizadas se llevo a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo habrá que proceder a prepararla:

Preparar el concentrado de 10 ng/mL: al vial del *standard* añadir 1mL de *sample diluent*. Realizar diferentes diluciones a partir de la solución anterior, para conseguir los siguientes puntos para nuestra recta patrón:

- 5 ng/mL (diluir a la mitad la solución de 10ng/mL).
- 2.5 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 1.25 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.625 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.312 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- 0.156 ng/mL (diluir a la mitad la solución anterior).
- Blanco (sólo *sample diluent*).

- **Procedimiento**

1. Centrifugar el homogenado de hígado, gastrocnemio o grasa abdominal a 5000 g, a 4 °C, durante 5 min.
2. Diluir las muestras de hígado y gastrocnemio 1:1000, y las muestras de grasa abdominal 1:2000 con el *sample diluent*.

3. Añadir 100 μL de las diferentes diluciones de la curva o de las muestras en cada pocillo (por duplicado) y sellar la placa.
4. Incubar a 37°C durante 2 horas.
5. Retirar con cuidado el sellado de la placa y el líquido, no lavar.
6. Añadir 100 μL de *Biotin-antibody* y sellar nuevamente la placa.
7. Incubar a 37°C 1 hora.
8. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 3 veces con *Wash Buffer*.
9. Añadir 100 μL de *HRP-avidin* (1x) y sellar la placa de nuevo.
10. Incubar a 37°C 1 hora.
11. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 5 veces con *Wash Buffer*.
12. Añadir 90 μL de *TMB substrate* en cada pocillo, previamente atemperado.
13. Incubar a 37°C durante 15 min.
14. Detener la reacción con 50 μL de *stop solution*.
15. En los siguientes 5 min, leer la absorbancia a $\lambda = 450 \text{ nm}$ en el espectrofotómetro.

- **Cuantificación de los resultados**

Los datos obtenidos se determinan interpolando las absorbancias de nuestras muestras de homogenado curva estándar, realizada de concentraciones conocidas. Los valores se expresan como ng/mg de proteína.

3.2.8.1.3 Determinación de los niveles de carnitina-acilcarnitina translocasa

Los niveles de carnitina-acilcarnitina translocasa en homogenado de hígado, gastrocnemio y grasa abdominal fueron determinados mediante ELISA, en concreto con el “Mouse Carnitine-Acylcarnitine Translocase ELISA Kit” de mybiosurce.

- **Preparación de los reactivos**

1. *Wash solution* (1x): Diluir 20 ml de concentrado de tampón de lavado (20x) en agua desionizada para preparar 200 ml de tampón de lavado (1x).

- **Procedimiento**

1. Homogenizar 10 mg de tejido en 100 uL de PBS. Centrifugar 15 min 1500 g Recoger el sobrenadante y almacenar.
2. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente.
3. Añadir 50 µL de cada uno de los *standards* o de las muestras en cada pocillo (por duplicado) y sellar la placa.
4. Añadir 100 µL de *HRP-Conjugate Reagent* y sellar nuevamente la placa.
5. Incubar a 37°C 1 hora.
6. Retirar con cuidado el sellado de la placa y lavar 4 veces con la *wash solution*.
7. Añadir 50 µL de *chromogen solution A* y 50 µL de *chromogen solution B*, proteger de la luz.
8. Incubar a 37°C durante 15 min.
9. Detener la reacción con 50 µL de *stop solution*.

10. En los siguientes 5 min, leer la absorbancia a $\lambda = 450$ nm en el espectrofotómetro.

- **Cuantificación de los resultados**

Los datos obtenidos se determinan interpolando las absorbancias de nuestras muestras de homogenado a la curva estándar realizada de concentraciones conocidas. Los valores se expresan como ng/mg de proteína.

3.2.9 Determinación del perfil metabolómico en plasma mediante resonancia magnética nuclear

Con muestras de plasma obtenidas de los ratones sacrificados tras la administración de genisteína, resveratrol o el vehículo, se procedió a realizar un estudio metabolómico mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$) y análisis multivariable para analizar los diferentes metabolitos implicados en procesos bioquímicos diferenciales.

Los equipos de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución, permiten realizar una exploración de todos los analitos de bajo peso molecular (metabolitos) presentes en distintos tipos de biofluidos (ej. suero y/u orina) o en tejidos tanto de humanos como de modelos animales.

- **Fundamento**

La metabolómica tiene como objetivo el análisis, en la muestra biológica analizada (en este caso plasma de roedor) de las pequeñas moléculas que son producto del metabolismo. Esta información puede resultar fundamental para la comprensión de las rutas metabólicas y procesos

bioquímicos característicos del sistema en estudio, ya que habitualmente los compuestos medidos representan los productos finales del metabolismo (173-174). La espectroscopia de resonancia magnética permite medir el contenido de protones en muestras biológicas complejas de moléculas de pequeño peso molecular. El espectro de ^1H da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro (desplazamiento químico) determina el entorno químico del núcleo y, por tanto, da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. La forma de la señal da información de los protones cercanos acoplados escalarmente.

- **Procedimiento**

Las muestras líquidas de suero fueron preparadas en capilares de RMN de 1mm. El procedimiento general de preparación de las muestras consistió en adicionar 2 μL de una disolución 55,5 mM de 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-ácido tetradeuteropropionico (TMSP- d_4) en D_2O a 20 μL de plasma en un capilar de alta resolución de RMN de 1 mm de diámetro. El tiempo total de preparación en ningún caso supero los 5 minutos para cada muestra. La concentración final de TMSP- d_4 en la muestra fue de 5,05 mM.

Todos los espectros se obtienen con un Espectrómetro Bruker Avance DRX 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a una frecuencia ^1H de 600.13 MHz equipado con una microsonda PATXI de 1mm. Las muestras se colocan en un Robot SampleJet con control de temperatura que mantiene a las mismas a 4°C hasta el momento de su medida (no más de 1 hora de espera). Una vez en el espectrómetro, se

espera un tiempo total de 3 minutos para que la temperatura de la muestra alcance 37°C estables antes de que los espectros sean adquiridos. Se mide un experimento de pulso-adquisición con pre-saturación del agua para todas las muestras.

Para evitar efectos sobre la intensidad de la señal diferente de la cantidad de metabolito, se prefieren experimentos de un solo pulso sin filtrar antes que secuencias de pulso filtradas. Se usa una pre-saturación durante 1 segundo a lo largo del periodo de reciclado para la supresión de la señal del disolvente y un tiempo de adquisición de 4 segundos.

La anchura de todos los espectros es 8000 Hz para ^1H . Antes de la transformación de Fourier, la FID (*free induction decay*) se multiplica por una ventana exponencial de 0.3 Hz. El desplazamiento químico de los picos se referenció a la señal singlete de la molécula de TMS- d_4 a -0.016 ppm para todos los espectros.

Se realiza un referenciado del desplazamiento químico sobre la señal del doblete CH_3 de la alanina a 1.475 ppm en todos los espectros.

- **Análisis de datos y cálculos.**

Los espectros se procesaron, previamente al análisis, mediante corrección de fase, ajuste de la línea base y normalización al área espectral alifática total (0.5- 4.5 ppm) con el fin de eliminar las diferencias de dilución de la muestra. La asignación de las resonancias se llevó a cabo consultando la bibliografía disponible (175), la base de datos Human Metabolome Data Base, (<http://www.hmdb.ca>) y el software de asignación Chenomx NMR suite version 7.1 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada).

Todos los datos se trasladaron al entorno de programación científica y matemática MATLAB 2012b en el que se utilizaron las rutinas diseñadas e implementadas en el Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica (Servicio de Metabolómica (UCIM/INCLIVA) de la Facultad de Medicina/Universidad de Valencia) para el análisis de perfiles moleculares y la búsqueda de correlaciones globales mediante técnicas avanzadas de análisis multivariable: análisis de componentes principales (PCA), análisis de discriminantes lineales y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA). Para determinar los metabolitos más discriminativos se utilizaron los diagramas de cargas y los gráficos de *vip score* de los correspondientes componentes principales.

3.2.10 Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico se ha usado el programa IBM SPSS statistics 21. Se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ($p= 0.05$) para aceptar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

Se ha usado la prueba T para comparar 2 medias. Se usó el test estadístico ANOVA en el caso de que se comparen más de 2 medias con un factor de variación. Si la n de los grupos a comparar no es igual en todos ellos se ha usado la comparación de Scheffé. En el caso de que la n de los grupos a comparar sea igual en todos ellos dependerá de la prueba de homogeneidad de las varianzas. Si no es significativa se ha usado la comparación de Tukey, si es significativa se ha usado el método de Games-Howell.

La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

4 RESULTADOS

4.1 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el gasto energético en ratones macho de 18 meses de edad

El gasto energético representa la energía que consume un organismo. Se divide en tres componentes: la tasa metabólica basal, la termogénesis endógena y la actividad física que realiza el animal. El GE, se puede determinar por calorimetría, ya sea directa o indirecta. La calorimetría indirecta se basa en el principio del intercambio de gases, siendo el cociente respiratorio un componente importante en su determinación. Por ello determinamos el cociente respiratorio como una aproximación del gasto energético en los animales.

4.1.1 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el cociente respiratorio

Para determinar si los tratamientos administrados tenían un efecto sobre el gasto energético, se determinó la producción de CO_2 el de consumo de O_2 y el CR en ratones macho tras la administración de resveratrol o genisteína según se describe en material y métodos.

En la figura 4.1 se muestran los valores de producción de CO_2 (a) y de consumo de O_2 (b). En ella podemos observar que en los ratones tratados con resveratrol se produjo un descenso significativo en los valores de producción de CO_2 , sin cambios en el consumo de O_2 , mientras que en los ratones tratados con genisteína ambos parámetros disminuyeron de forma significativa.

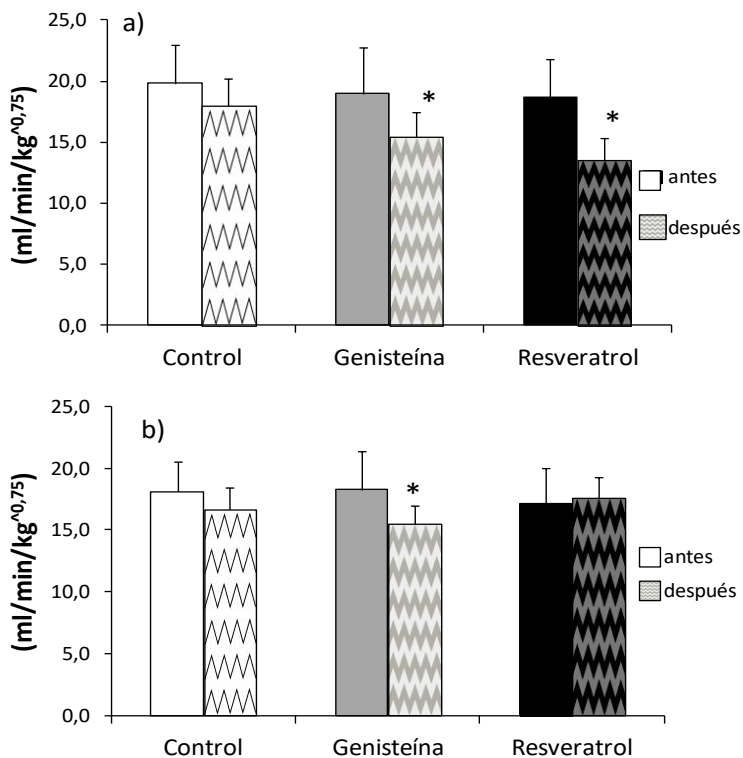


Figura 4.1: Producción de CO_2 (a), consumo de O_2 (b) de los ratones antes y después del tratamiento.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones antes y después de los diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como $*p < 0,05$ vs control.

La figura 4.2 muestra la media de los valores del CR obtenidos durante 24 horas, en ella podemos observar que el valor del CR disminuyó en los ratones tratados con resveratrol de 1,08 a 0,77.

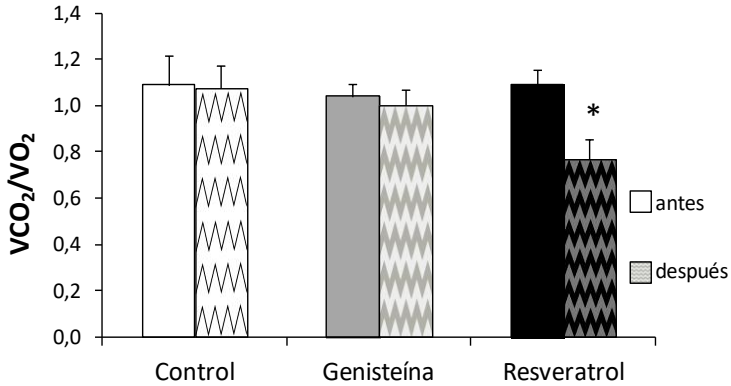


Figura 4.2: Media del cociente respiratorio, antes del tratamiento y 24 horas tras la administración del tratamiento.

Relación entre el volumen de dióxido de carbono producido (VCO_2) el volumen de oxígeno consumido (VO_2). Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones antes y después de los diferentes tratamientos. La significación estadística se expresa como $*p < 0.05$ vs control.

En la figura 4.3 se representan los datos del CR a lo largo de las 24 horas y vemos como la disminución de dicho parámetro en los ratones tratados con resveratrol se mantuvo durante el tiempo en el que se realizó el análisis. Así pues, la dosis de resveratrol administrada a los ratones conlleva una disminución significativa del CR, no observándose dicho efecto en los ratones tratados con genisteína, respecto del control.

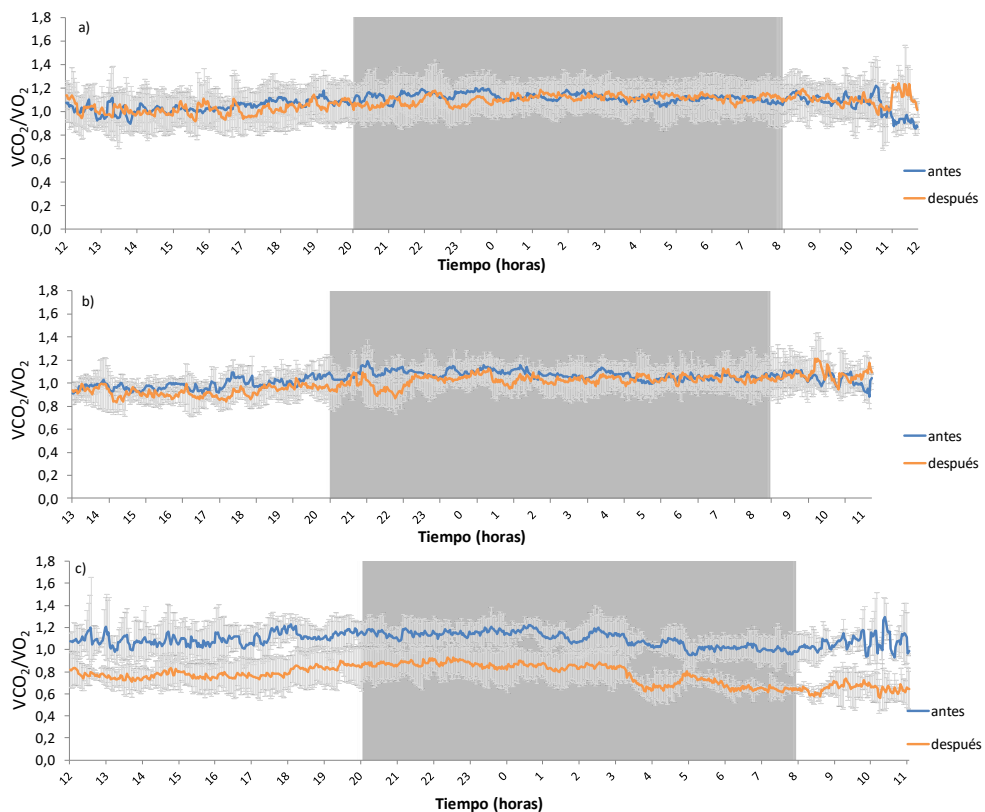


Figura 4.3: Cociente respiratorio antes del tratamiento y durante 24 horas tras la administración del tratamiento.

Los valores de los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones antes y después de los diferentes tratamientos: vehículo (control) (a), genisteína (b) o resveratrol (c).

Por lo tanto, el resveratrol conllevó una disminución del CR de los ratones, debida a una disminución de la producción de CO_2 . Sin embargo, en los ratones tratados con genisteína no se produjo una variación en el CR ya que tanto la producción de CO_2 , como el consumo de O_2 se vieron disminuidos.

4.1.2 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el peso de los ratones

A continuación, nos planteamos la posibilidad de que el tratamiento conllevara una disminución del peso del animal. Por ello, estudiamos la posible existencia de diferencias en el peso medio de los animales en función del tratamiento recibido.

Tal y como podemos observar en la figura 4.4, no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los ratones antes y después del tratamiento y tampoco entre los grupos estudiados.

Por tanto, podemos decir que la disminución del CR en los ratones tratados con resveratrol no fue debida a la pérdida de peso de los animales.

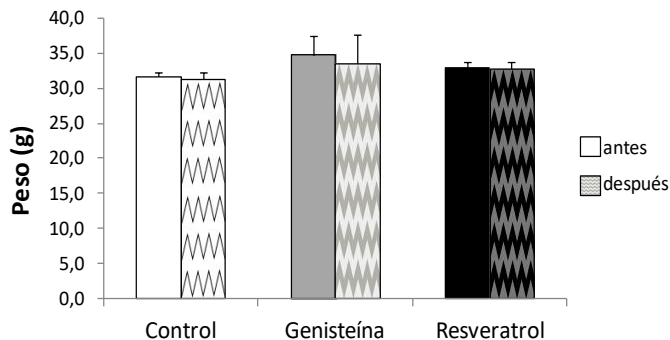


Figura 4.4: Peso de los ratones antes y después del tratamiento.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones antes y después de los diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.2 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el metabolismo glucídico

Tal y como se ha explicado en la introducción de la presente tesis, la disminución del CR en los animales se ha correlacionado con cambios en el estado energético de los mismos. Por ello, estudiamos la existencia de variaciones en dos de las principales vías para la obtención de energía, la vía de degradación de glúcidos y la de lípidos. Para la realización del estudio, se analizaron diferentes enzimas y metabolitos en tres tejidos claves para el metabolismo: tejidos hepático, muscular y adiposo.

4.2.1 Papel de Akt en el metabolismo glucídico

El metabolismo glucídico en los animales está ampliamente regulado. La proteína Akt juega un importante papel en la glicolisis aeróbica, ya que regula dicho proceso a través de la fosforilación de la PFK y la hexoquinasa.

Como se muestra en la figura 4.5 se determinó en hígado los valores de expresión de mRNA de Akt. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en este valor tras la administración de genisteína o resveratrol frente al grupo control.

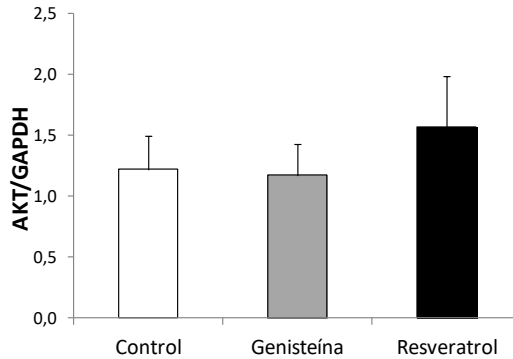


Figura 4.5: Niveles del mRNA de Akt en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

El tejido muscular tiene una elevada capacidad oxidativa, de modo que tiene una gran influencia en el metabolismo basal de los animales. Así pues, estudiamos la expresión de mRNA de Akt en el músculo gastrocnemio (figura 4.6) y observamos que se produjo un aumento significativo de la expresión del mRNA de dicha proteína tras el tratamiento con genisteína.

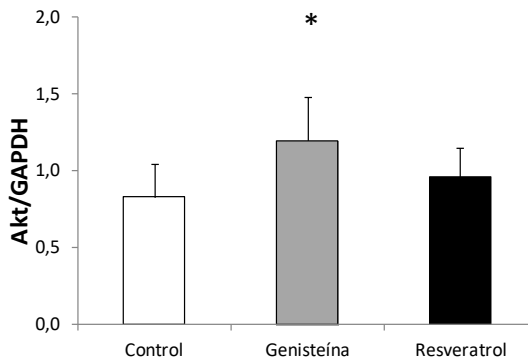


Figura 4.6: Niveles del mRNA de Akt en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

El tejido adiposo blanco responde a variaciones en el estado energético global, regulados por cambios en la ingesta y el estado calórico. Aunque este tejido es principalmente lipogénico se estudió, al igual que se realizó en los otros tejidos, si los polifenoles inducían cambios en la expresión de los niveles de mRNA de Akt, en tejido adiposo inguinal de los animales tratados con genisteína o resveratrol. Dichos resultados se muestran en la figura 4.7 en la que podemos observar que ninguno de los dos tratamientos indujo cambios en la expresión de Akt.

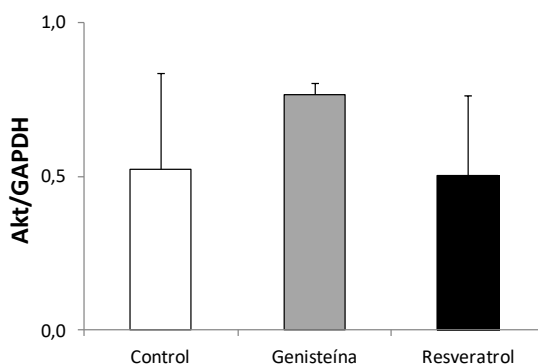


Figura 4.7: Niveles del mRNA de Akt en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.2.2 Papel de PFK en el metabolismo glucídico

Debido a que Akt regula la glucólisis a través de PFK, se determinó los niveles de mRNA de PFK1 y la actividad de dicha proteína en las muestras de hígado de los ratones tras aplicar los distintos tratamientos. Tal y como se muestra en la figura 4.8 no se percibieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

Por lo tanto, el tratamiento agudo con resveratrol o genisteína a los ratones no indujo cambios en la expresión ni en la actividad de la PFK.

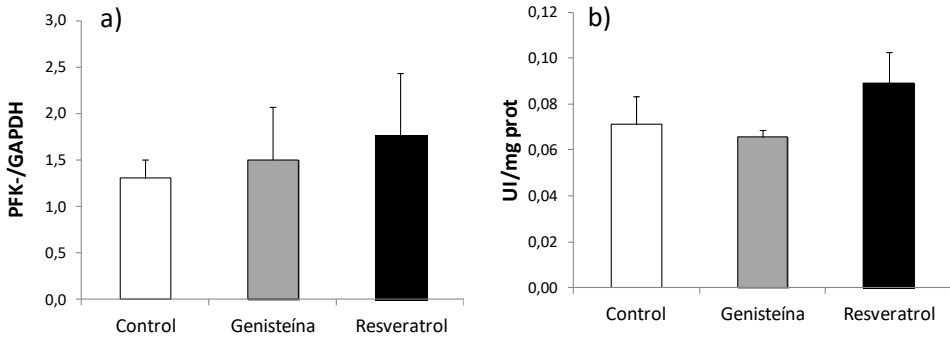


Figura 4.8: Niveles del mRNA de PFK1 (a) actividad PFK (b) en hígado de ratones. Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

Así mismo, se determinaron los niveles de mRNA y la actividad de la PFK1 en el músculo gastrocnemio de los ratones tratados con genisteína o resveratrol. Como se puede apreciar, en la figura 4.9 ambos grupos aumentaron significativamente los valores de actividad de PFK en gastrocnemio con respecto al control, aunque no los niveles de expresión del mRNA.

Por lo tanto, el tratamiento con estos dos polifenoles aumentó la actividad de la PFK, lo cual puede tener un efecto sobre la glicolisis en las células de gastrocnemio de dichos ratones.

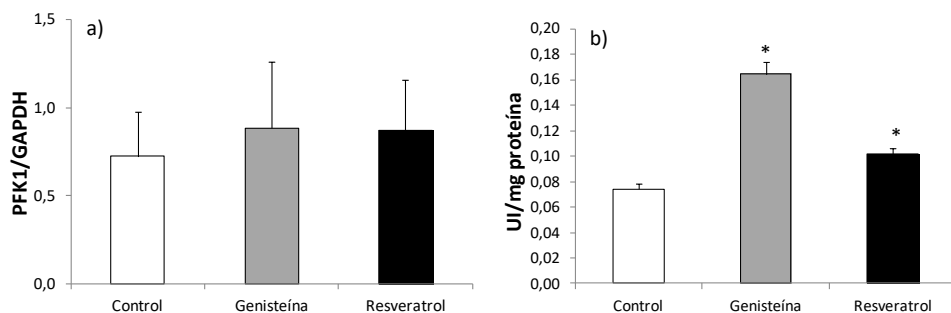


Figura 4.9: Niveles del mRNA de PFK (a), actividad de PFK (b) en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Como se muestra en la figura 4.10 no hubo cambios significativos en los niveles de mRNA de PFK1 en tejido adiposo. Por lo que al igual que ocurrió en el análisis de la expresión de mRNA de PFK1 en hígado, en tejido adiposo tampoco se observaron cambios en la expresión de la enzima clave en la regulación de la vía de la glucólisis en los ratones tratados con polifenoles.

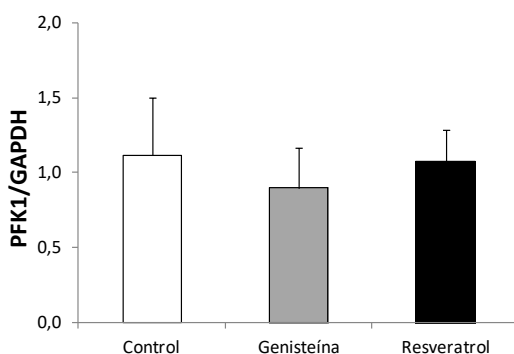


Figura 4.10: Niveles del mRNA de PFK1 en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.2.3 Análisis de los niveles de insulina en ratones tratados con resveratrol o genisteína

Debido a que la insulina es una hormona que interviene en el anabolismo de los glúcidos, promueve la glucólisis y controla en parte la lipogénesis, determinados la concentración de esta hormona en plasma.

Para estudiar si la dosis de genisteína o resveratrol administrada a los ratones inducía cambios en los niveles de dicha hormona, se analizó su concentración en plasma (figura 4.11).

Como observamos en la figura, el tratamiento con los polifenoles no produjo cambios significativos en nuestro modelo de estudio.

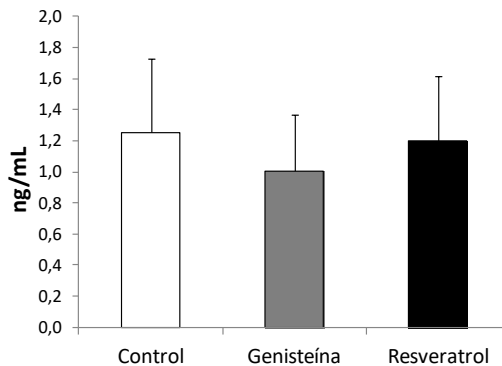


Figura 4.11: Concentración de Insulina (ng/mL) en plasma de ratones tras el tratamiento.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el metabolismo lipídico

Como hemos señalado en la introducción de la presente tesis, el metabolismo lipídico se refiere al proceso que implica tanto la síntesis como la degradación de los lípidos en los animales. Nos hemos centrado en el estudio del papel que pueden desempeñar los polifenoles en el catabolismo lipídico, ya que los lípidos, junto con los carbohidratos, son las dos principales fuentes de energía.

4.3.1.1 Papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína, sobre el metabolismo

Diferentes estudios han demostrado que el resveratrol activa a AMPK, la cual podría estar implicada en la disminución del CR en los animales, ya que es considerada un detector de energía celular.

En la figura 4.12 se representan los niveles de mRNA de la expresión de la subunidad catalítica (alfa) de AMPK en hígado de ratones, en ella podemos observar como en los animales tratados con resveratrol se produjo un aumento significativo de la expresión AMPK α .

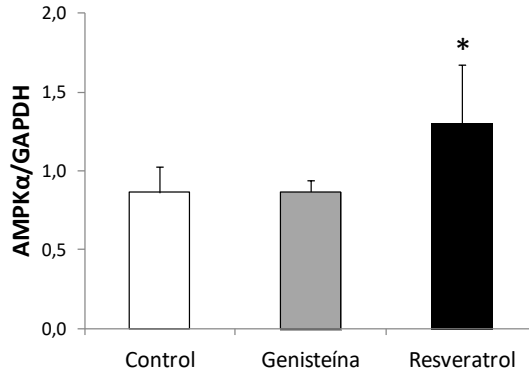


Figura 4.12: Niveles del mRNA de AMPK α en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Continuando con el estudio de la proteína AMPK en hígado, analizamos la expresión proteica tanto de la AMPK α , de la proteína fosforilada (p-AMPK α), como el ratio entre ambas.

En la figura 4.13 se observa que los ratones tratados con resveratrol aumentaron los niveles de p-AMPK α y AMPK α en hígado, pero no así el ratio. Por lo que el resveratrol indujo un incremento significativo únicamente de la expresión de AMPK α . Sin embargo, en los ratones tratados con genisteína se incrementó significativamente el ratio p-AMPK α /AMPK α .

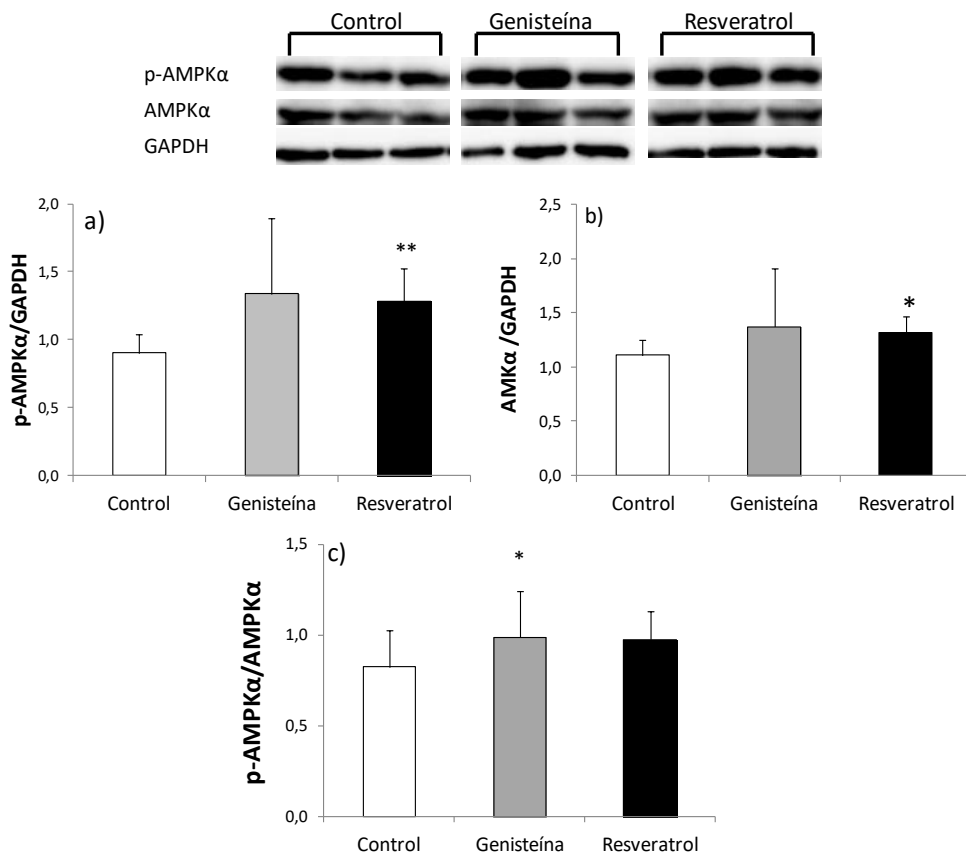


Figura 4.13: Niveles de proteína p-AMPKα (a), AMPKα (b) y p-AMPKα/AMPK (c) en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Tras ello determinamos la expresión del mRNA de AMPKα en gastrocnemio de los ratones ya que dicha proteína se considera como una de las principales reguladoras de la energía celular. Como se muestra en la figura 4.14 el tratamiento con los dos polifenoles incremento la expresión del mRNA de AMPKα con respecto al control, aunque solo en el grupo tratado con resveratrol dicho aumento fue significativo.

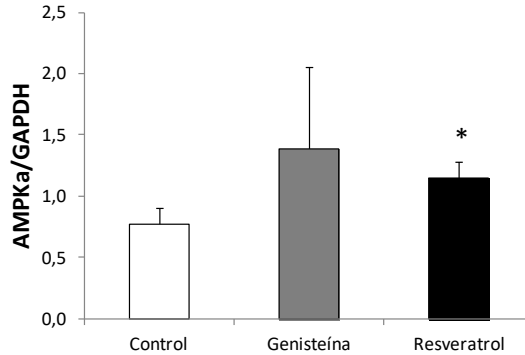


Figura 4.14: Niveles del mRNA de AMPKα en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Del mismo modo que en hígado y gastrocnemio, en tejido adiposo estudiamos AMPKα. En la figura 4.15 se muestran los niveles de mRNA de AMPKα en tejido adiposo de los ratones tratados con genisteína o resveratrol. En ella, podemos observar como la expresión de AMPKα en tejido adiposo aumentó significativamente en ambos grupos de tratamiento frente al grupo control.

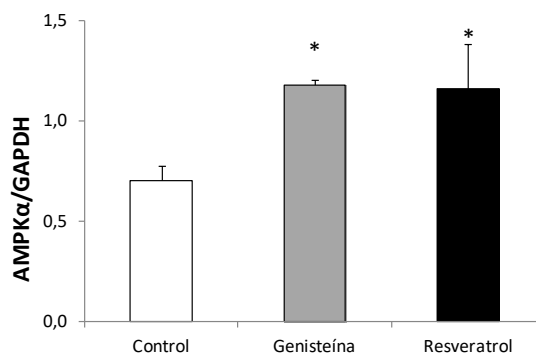


Figura 4.15: Niveles del mRNA de AMPKα en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Por lo que en los tres tejidos el resveratrol indujo un aumento de expresión de mRNA de AMPK α . Además en tejido adiposo dicho aumento también se indujo en el grupo tratado con genisteína respecto del grupo control, lo cual no se ha observado en hígado ni en gastrocnemio.

4.3.2 Papel de ACC1, tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína, sobre el metabolismo

Tras ver un aumento en la expresión de AMPK α en hígado de los ratones tratados con resveratrol, analizamos la expresión de Acetil-CoA carboxilasa-1 (ACC1), ya que AMPK se definió originalmente como la quinasa inhibidora de la enzima ACC1, la cual cataliza la reacción de obtención de malonil-CoA, un paso crítico en el metabolismo lipídico.

La figura 4.16 muestra los valores de expresión de mRNA de la proteína ACC1 en hígado de ratones tratados con resveratrol o genisteína, en ella podemos observar como en el grupo resveratrol disminuyeron significativamente respecto del grupo control.

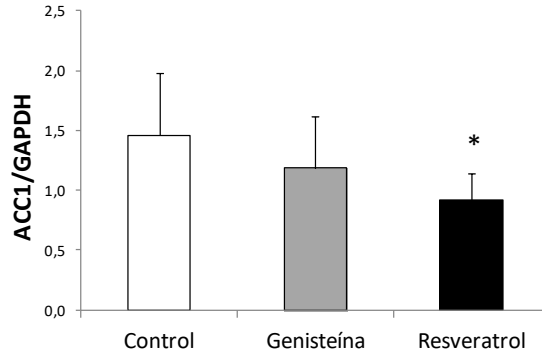


Figura 4.16: Niveles del mRNA de ACC1 en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Después de observar cambios en la expresión del mRNA de ACC1 en hígado, analizamos los niveles de la proteína ACC1 en dicho tejido. Como se muestra en la figura 4.17, éstos disminuyeron significativamente en los animales tratados con resveratrol respecto del grupo control. Así pues, el resveratrol en los ratones de estudio indujo un aumento de AMPK α y por tanto una disminución de ACC1 en hígado.

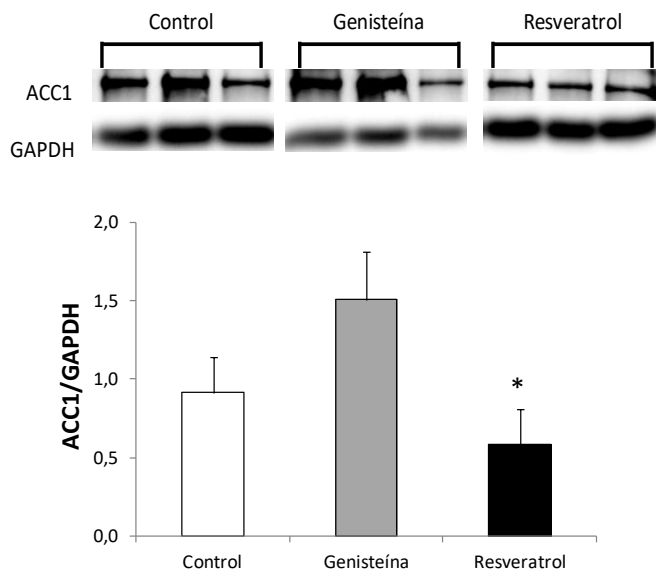


Figura 4.17: Niveles de la proteína ACC1 en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Del mismo modo que determinamos qué ocurría en la expresión de ACC1 en hígado, quisimos determinar el efecto que los polifenoles ejercen sobre la expresión de dicha enzima en gastrocnemio. Como muestra la figura 4.18, el tratamiento tanto con genisteína como con resveratrol indujo un descenso significativo de la expresión del mRNA de ACC1, respecto del grupo tratado con vehículo.

Así pues, tanto la genisteína como el resveratrol disminuyeron la expresión de la enzima ACC1 en gastrocnemio.

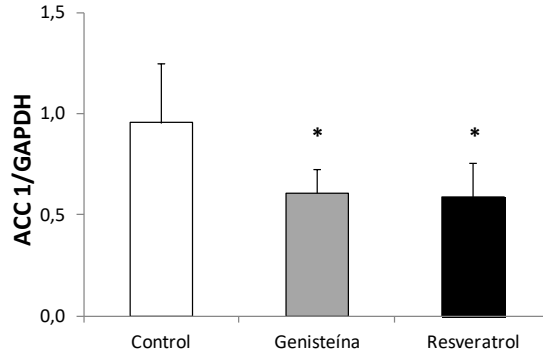


Figura 4.18: Niveles del mRNA de ACC1 en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

A continuación se estudió si en tejido adiposo la sobreexpresión del mRNA de AMPK α observada conllevaba cambios en la expresión mRNA de ACC1. La figura 4.19 muestra que ambos tratamientos (genisteína o resveratrol) disminuyeron la expresión del mRNA de ACC1, aunque solo en el grupo resveratrol dicha disminución fue significativa.

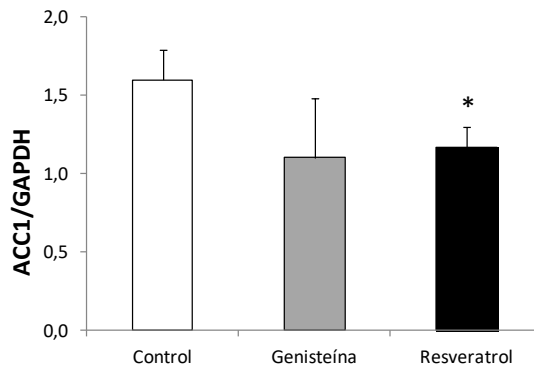


Figura 4.19: Niveles del mRNA de ACC1 en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

4.3.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre malonil-CoA

Posteriormente, para comprobar si la disminución de la expresión del mRNA de ACC1 influía en la concentración del producto de dicha enzima, se analizó el malonil-CoA, metabolito que desempeña un papel importante en la regulación de la síntesis y oxidación de ácidos grasos.

En la figura 4.20 podemos observar que se produjo un descenso estadísticamente significativo de los niveles de malonil-CoA en el grupo resveratrol frente al control.

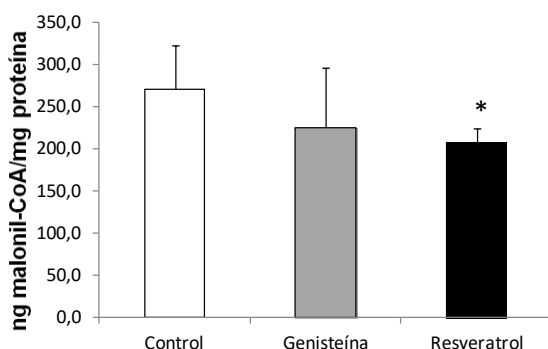


Figura 4.20: Niveles de malonil-CoA en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Por ello, podemos afirmar que en nuestro modelo de estudio el resveratrol activó a AMPK α y a la forma fosforilada de dicha proteína, la cual inhibió a ACC1 y conllevó a una disminución de los valores de malonil-CoA en hígado de los ratones. Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente

significativos en la expresión de dichas enzimas en hígado de los ratones tratados con genisteína.

En los resultados obtenidos en gastrocnemio observamos como la cantidad de malonil-CoA descendió de forma significativa a casi la mitad en el grupo genisteína y a más de la mitad en el grupo resveratrol, respecto del control (figura 4.21).

Por tanto, los polifenoles estudiados indujeron una disminución significativa de la expresión de mRNA de ACC1 y de su metabolito final el malonil-CoA en gastrocnemio de ratón, a diferencia del hígado donde solo el resveratrol resultó inductor de dichas variaciones en el metabolismo lipídico.

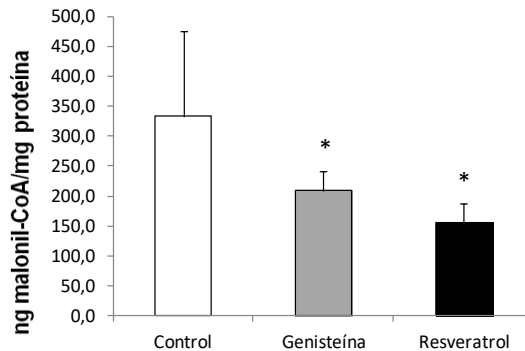


Figura 4.21: Niveles de malonil-CoA en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Para poder determinar la posible implicación de dicho resultado en el metabolismo lipídico, se analizó la concentración de malonil-CoA en tejido adiposo de los ratones tratados (figura 4.22). Así pues, el tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente la cantidad de malonil-CoA en tejido adiposo, respecto al control.

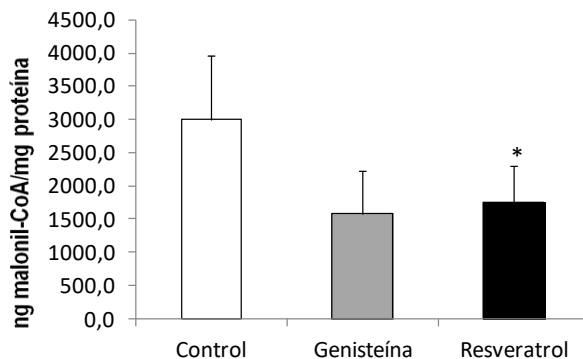


Figura 4.22: Niveles de malonil-CoA en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

4.3.4 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la activación de los ácidos grasos de cadena larga

Una vez establecido que los polifenoles inducían cambios en las enzimas y en los metabolitos encargados de regular el metabolismo lipídico, determinamos si estas diferencias conllevaban cambios en la β -oxidación. Para ello, como se ha comentado anteriormente en la presente tesis, los ácidos grasos han de ser activados y transportados al interior de la mitocondria. Por tanto, determinamos la acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga (ACSL) para evaluar la activación de ácidos grasos de cadena larga.

Como observamos en la figura 4.23, se produjo un aumento de los niveles de ACSL en gastrocnemio de los ratones tratados con genisteína y resveratrol, aunque solo en el caso del grupo resveratrol dicho cambio fue significativo.

Por lo tanto, el tratamiento con dos dosis de 100nM de resveratrol aumentaron los niveles de mRNA de ACSL, la enzima responsable de la activación de ácidos grasos de cadena larga, en el músculo de ratones macho de 18 meses de edad.

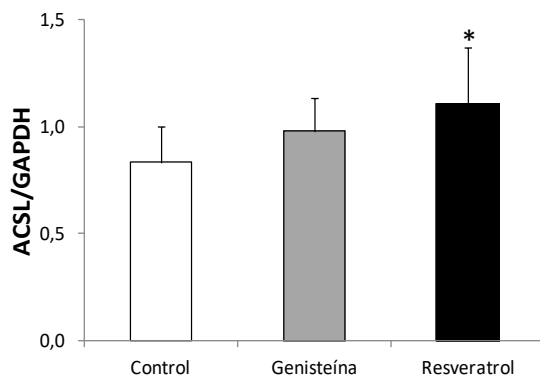


Figura 4.23: Niveles del mRNA de ACSL en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Tras observar variaciones en la expresión de ACSL en gastrocnemio estudiamos si también el tratamiento había producido modificaciones en tejido adiposo. En la figura 4.24 se muestran los valores de expresión del mRNA de la ACSL, en tejido adiposo de los ratones tratados con polifenoles. En ella podemos ver que ni la genisteína ni el resveratrol produjeron cambios en este enzima.

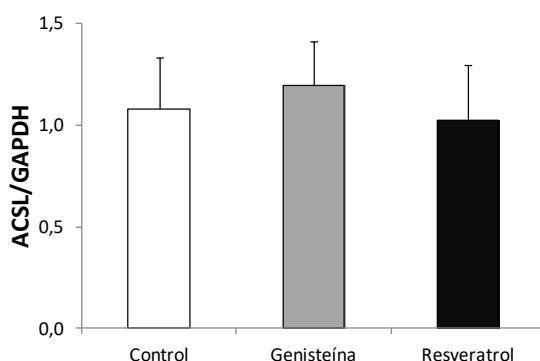


Figura 4.24: Niveles del mRNA de ACSL en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.3.5 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre el sistema carnitina palmitoil transferasa

El sistema carnitina palmitoil transferasa es un componente clave en la oxidación de los ácidos grasos, ya que al ser la membrana mitocondrial interna impermeable a la entrada de acil-CoA de cadena larga, es necesario un sistema de transporte para su transferencia hacia la matriz. Como se ha comentado en la introducción de la presente tesis, las enzimas encargadas del transporte de los acil-CoA al interior de la mitocondria, son: CPT1, CACT y CPT2.

4.3.6 Estudio de CPT1 tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína

Para estudiar el efecto de los polifenoles sobre la oxidación de ácidos grasos, analizamos los niveles del mRNA de la CPT1. La figura 4.25 muestra como los ratones tratados con resveratrol, pero no así los tratados con genisteína, presentaron mayores niveles de mRNA de CPT1 en hígado.

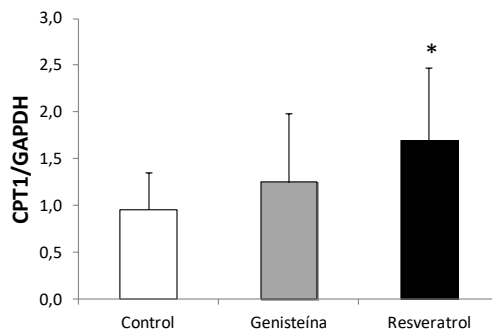


Figura 4.25: Niveles del mRNA de CPT1 en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Analizamos los niveles de mRNA de CPT1 en gastrocnemio, cuyos resultados se muestran en la figura 4.26, en la cual se observa un aumento significativo de la expresión del transportador CPT1 en los ratones tratados con resveratrol.

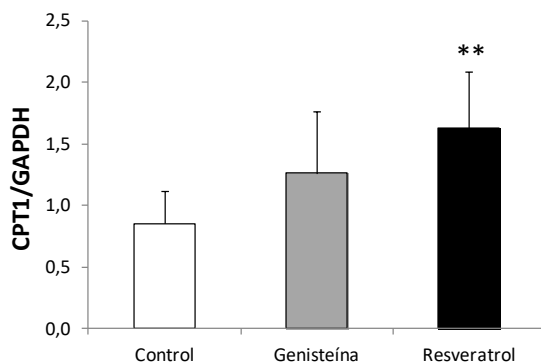


Figura 4.26: Niveles del mRNA de CPT1 en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ vs control.

Tal y como se muestra en la figura 4.27 no se produjeron cambios significativos en la expresión del mRNA de la proteína transportadora de ácidos grasos, CPT1, al interior de la mitocondria, en el tejido adiposo.

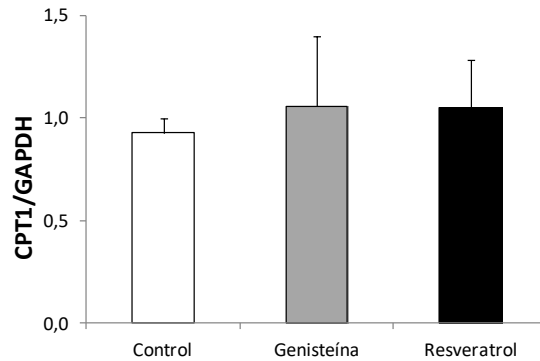


Figura 4.27: Niveles del mRNA de CPT1 en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Por tanto, el resveratrol indujo un aumento de CPT1 en tejido hepático y gastrocnemio, pero no en tejido adiposo, en ratones macho de 18 meses de edad.

4.3.7 Estudio de CACT tras el del tratamiento con resveratrol o genisteína

Una vez, visto que había un aumento de la expresión de CPT1, quisimos comprobar si también había cambios en la enzima encargada de translocar los ácidos grasos a la matriz mitocondrial.

Para ello estudiamos los valores de la proteína CACT en hígado, los cuales como se muestra en la figura 4.28, estaban aumentados de forma significativa en el grupo que recibió resveratrol.

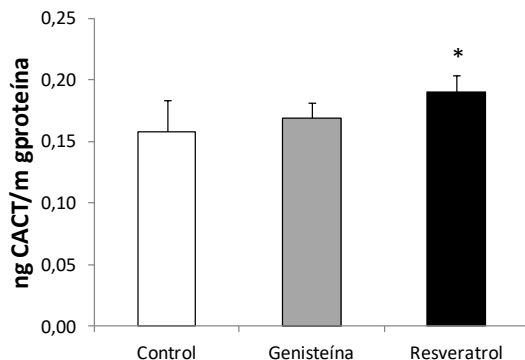


Figura 4.28: Niveles de la proteína CACT en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Tras ello, analizamos en gastrocnemio las variaciones cambios en los niveles de mRNA de CACT. Los cuales como se muestran en la figura 4.29 aumentaron de forma significativa en el grupo de ratones tratados con resveratrol respecto del grupo control.

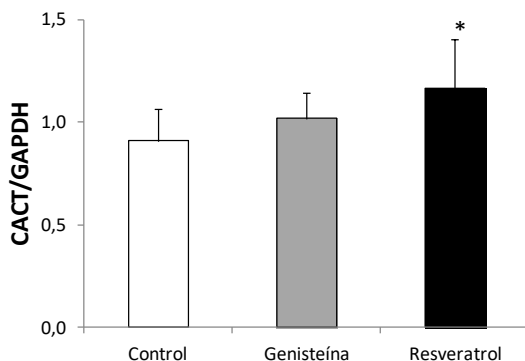


Figura 4.29: Niveles del mRNA de CACT en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Tras observar un aumento de la expresión de los niveles de mRNA de CACT estudiamos los niveles proteicos de CACT, en gastrocnemio de los ratones tratados con polifenoles. Como se muestra en la figura 4.30 en ambos grupos de tratamiento se indujo un aumento significativo de los niveles proteicos de CACT respecto del control.

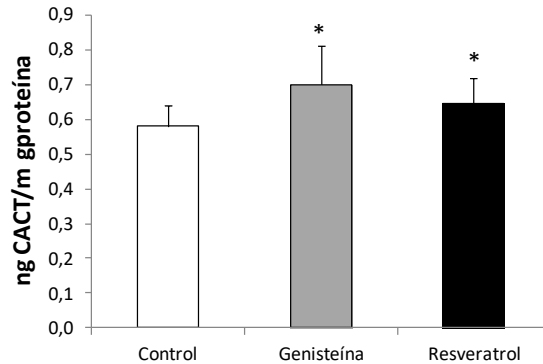


Figura 4.30: Niveles de la proteína CACT en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control

Por tanto, en cuanto al efecto del tratamiento con polifenoles sobre este sistema de transporte, podemos decir que los polifenoles estudiados aumentaron los niveles de expresión de CPT1 y CACT, aunque solo en el caso del resveratrol el aumento fue significativo. Sin embargo, tanto el tratamiento con genisteína como con resveratrol aumentaron significativamente los niveles proteicos de CACT respecto al control en gastrocnemio.

A continuación analizamos la expresión de CACT en tejido adiposo, como se muestra en la figura 4.31 no se produjeron cambios significativos en la expresión del mRNA de CACT en este tejido.

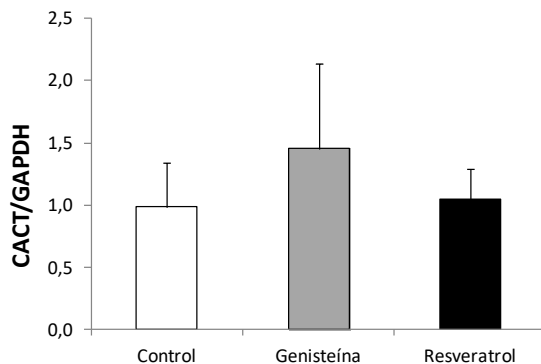


Figura 4.31: Niveles del mRNA de CACT en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como $*p < 0.05$ vs control.

A pesar de no haber observado variaciones en la expresión a nivel de mRNA de CACT analizamos los niveles de dicha proteína, para ver si el tratamiento inducía cambios en los niveles proteicos. Como se observa en la figura 4.32, ninguno de los polifenoles administrados a los ratones produjo cambios significativos en CACT en tejido adiposo.

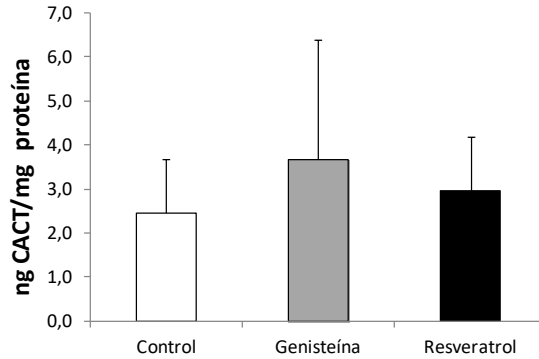


Figura 4.32: Niveles de la proteína CACT en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de cuatro ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Por tanto los ratones tratados con polifenoles mantuvieron los niveles de expresión de mRNA y proteína de los transportadores de ácidos grasos al interior de la mitocondria en tejido adiposo, a diferencia de lo ocurrido tanto en hígado como en gastrocnemio.

4.3.8 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la degradación oxidativa de los ácidos grasos

Por otro lado, una vez los ácidos grasos han sido activados y transportados al interior de la mitocondria han de ser oxidados a través de la β -oxidación. Un paso clave en este proceso es la acción que ejerce la enoil-CoA hidratasa (Ech).

La figura 4.33 representa la expresión del mRNA de la Ech (enoil-CoA hidratasa de cadena corta) en hígado de ratones tratados con genisteína o resveratrol. En dicha figura se puede constatar como el tratamiento con resveratrol indujo un aumento significativo de los niveles de mRNA de Ech frente al control, mientras que no se produjeron cambios estadísticamente significativos en hígado de los ratones tratados con genisteína.

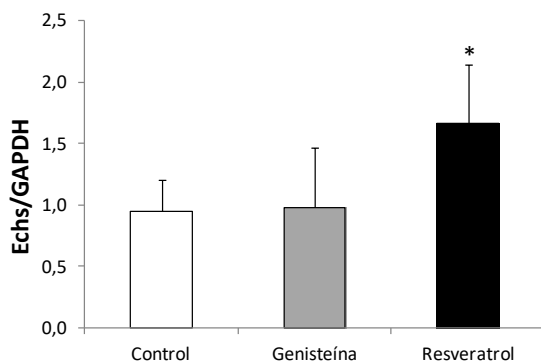


Figura 4.33: Niveles del mRNA de Ech en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$ vs control.

Así pues, podemos concluir que el tratamiento con resveratrol, aumento significativamente la expresión de uno de los genes implicado en la β -

oxidación de los ácidos grasos en hígado de los ratones, respecto del control. Aunque no observamos ningún efecto en el tratamiento con genisteína en este tejido.

En la figura 4.34 se representan los niveles de mRNA de Echs en gastrocnemio de los tres grupos de estudio y en ella se puede observar que tanto en el grupo genisteína como en el resveratrol se produjo un aumento de la expresión de mRNA de la enzima Echs con respecto al control.

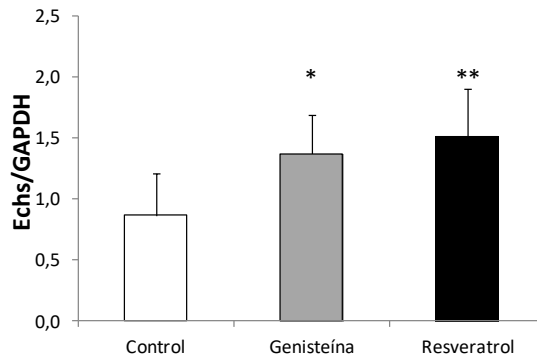


Figura 4.34: Niveles del mRNA de Echs en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control.

Por tanto, en gastrocnemio ambos tratamientos indujeron un aumento de expresión de una de las enzimas implicadas en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Tras ello, estudiamos si los polifenoles a nivel del tejido adiposo producían cambios en Echs. En la figura 4.35, podemos observar que no se produjeron cambios significativos en los niveles de mRNA de Echs, en

tejido adiposo tras el tratamiento agudo con genisteína o resveratrol, tal y como ocurrió en hígado y gastrocnemio.

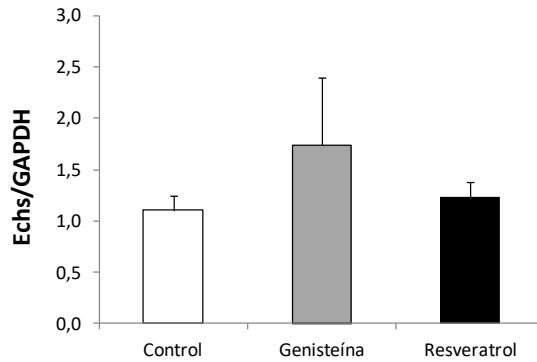


Figura 4.35: Niveles del mRNA de Echs en tejido adiposo inguinal de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de tres ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

4.4 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre la biogénesis mitocondrial

Son muchos los estudios que atribuyen un efecto modulador de los polifenoles, en concreto del resveratrol, la capacidad de activar a PGC1 α , un importante regulador de la biogénesis, función mitocondrial y balance energético (176-177). A su vez, PGC1 α está regulada por AMPK, la cual como hemos visto anteriormente esta sobre-expresada en el grupo resveratrol.

Por ello, estudiamos los niveles de mRNA de PGC1 α en hígado de los ratones de nuestro estudio. En la figura 4.36 observamos que en el grupo resveratrol hubo un aumento estadísticamente significativo de los niveles de mRNA de dicho coactivador transcripcional con respecto al grupo control.

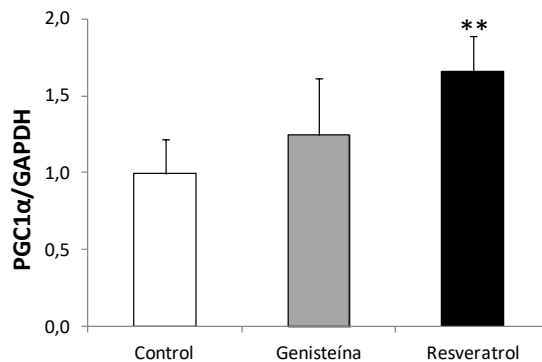


Figura 4.36: Niveles del mRNA de PGC1 α en hígado de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol. La significación estadística se expresa como ** $p < 0.01$ vs control.

Por tanto en este tejido, el resveratrol indujo la expresión de uno de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial.

Como podemos observar en la figura 4.37, en el gastrocnemio de los ratones tratados con genisteína o resveratrol hubo un ligero aumento del nivel de expresión de mRNA con respecto al control, aunque no fue significativo.

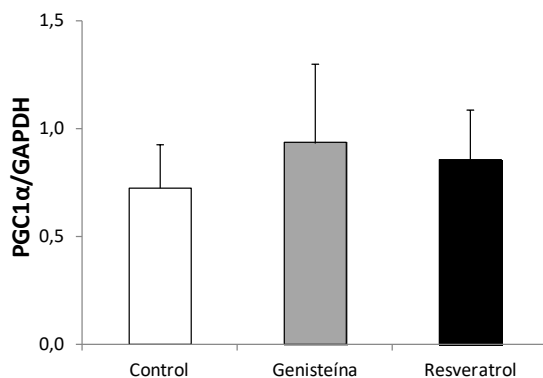


Figura 4.37: Niveles del mRNA de PGC1α en gastrocnemio de ratones.

Los valores de los resultados se expresan como media + desviación estándar. Cada punto corresponde a la media de seis ratones y a diferentes tratamientos: vehículo (control), genisteína o resveratrol.

Es por ello que con los resultados obtenidos en nuestro estudio no podemos afirmar que el tratamiento con genisteína o resveratrol tiene un efecto sobre la biogénesis mitocondrial en gastrocnemio.

4.5 Determinación del perfil metabolómico del plasma tras la administración de resveratrol o genisteína

Como se ha visto en los apartados anteriores, la genisteína o el resveratrol modulan diferentes enzimas implicadas en el metabolismo. Los perfiles de metabolitos proporcionan una visión global en las caracterizaciones y las interacciones de los metabolitos en determinados estados fisiológicos o patológicos. Así pues, la investigación de los cambios metabólicos tras la administración de polifenoles nos proporciona información sobre los efectos de éstos.

En la figura 4.38 se muestra el resultado de un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (del inglés “Partial Least squares Discriminant Analysis” (PLSDA)) del plasma de los animales tratados con genisteína respecto a los controles. En ella se puede observar que las muestras de los ratones aparecen en dos grupos según su condición.

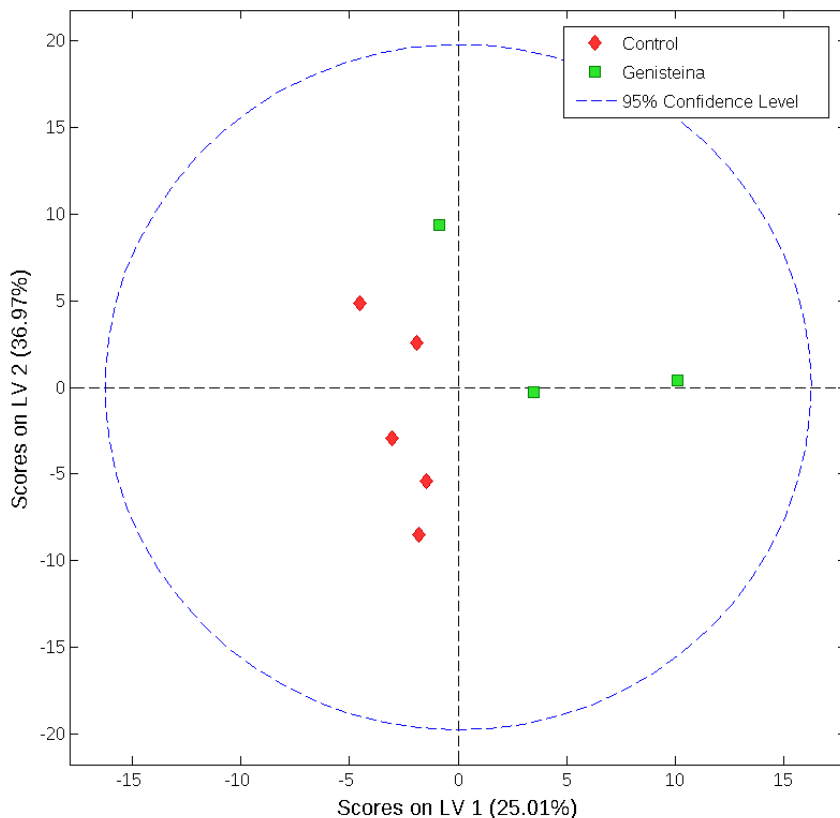


Figura 4.38: PLSDA de muestras de plasma de ratones tratados con genisteína o como control.

Control: muestras de plasma de ratones tratados con vehículo (n=5). Genisteína: muestras de plasma de ratones tratados con genisteína (n=3).

Los metabolitos que tienen una mayor contribución a la discriminación entre el grupo control o genisteína aparecen en la tabla 4.1.

Por tanto, podemos observar como el perfil metabolómico de los ratones tratados con genisteína varía respecto del grupo control.

Metabolitos	VIP score	Control	Genisteína	p valor
N-Nitrosodimethylamine	6.02	1.72 ± 0.75	0.65 ± 0.21	0.0579
Ethanolamine	5.94	4.82 ± 1.04	6.39 ± 0.66	0.0602
3-Hydroxyisovalerate	4.91	0.92 ± 0.25	1.30 ± 0.22	0.7355
3-Methylxanthine	4.74	0.86 ± 0.34	0.51 ± 0.16	0.1514
4-Pyridoxate	2.86	0.45 ± 0.17	0.33 ± 0.16	0.3379
Putrescine	2.76	1.18 ± 0.30	1.61 ± 0.53	0.1814
Choline	2.26	0.93 ± 0.56	1.62 ± 1.02	0.2515
Threonine	2.18	4.74 ± 0.84	6.30 ± 2.50	0.2279
Methanol	2.14	0.43 ± 0.11	0.72 ± 0.54	0.2676
Glucuronate	2.14	2.77 ± 0.92	3.77 ± 1.29	0.2421
Creatinine	2.00	0.32 ± 0.06	0.38 ± 0.10	0.2661

Tabla 4.1: VIP score de los metabolitos.

En la tabla se representan los metabolitos con VIP score superior a 2, junto con el p valor y las concentraciones de los metabolitos en nM.

Así mismo en la figura 4.39 se muestra el resultado del análisis discriminatorio PLS-DA del plasma de los animales tratados con resveratrol respecto a los controles. Se puede observar que las muestras de los ratones aparecen en dos grupos según su condición. Así, pues el perfil metabolómico de los ratones tratados con resveratrol varía respecto de los controles.

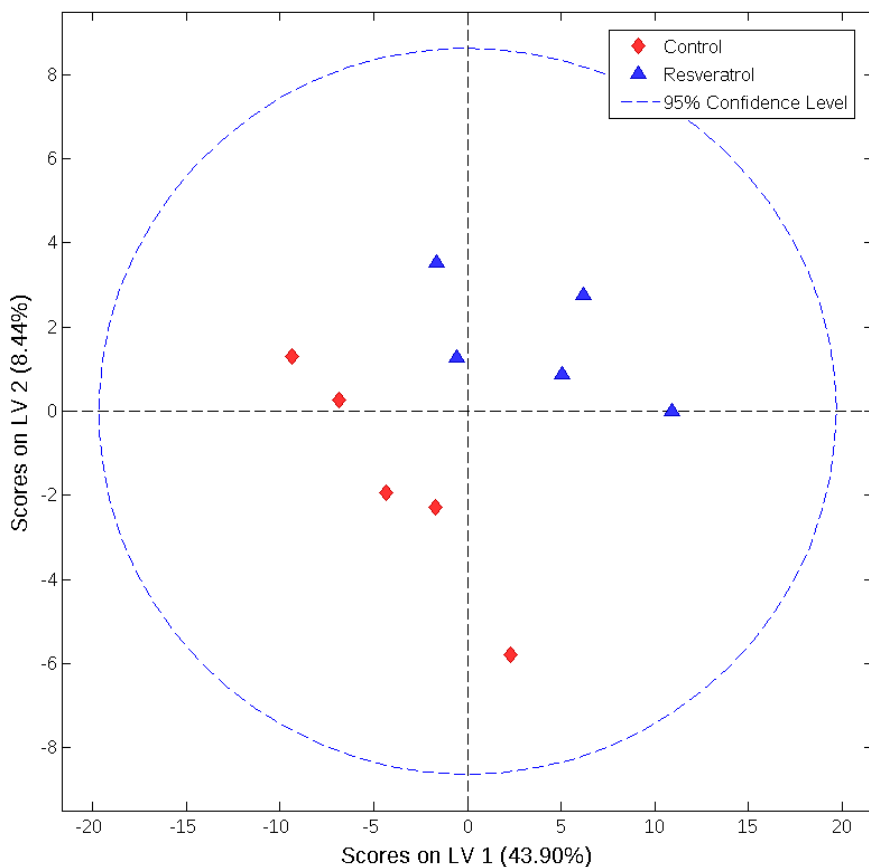


Figura 4.39: PLSDA de muestras de plasma de ratones tratados con resveratrol o con vehículo.

Control: muestras de plasma de ratones tratados con vehículo (n=5). Resveratrol: muestras de plasma de ratones tratados con resveratrol (n=5).

Los metabolitos que tienen una mayor contribución a la discriminación entre el grupo control y resveratrol aparecen en la tabla 4.2, entre los que destacamos: piruvato, acetona, y 2-oxibutirato. Además en los ratones tratados con resveratrol hay 4 metabolitos determinados cuya concentración varía significativamente respecto del grupo control.

Metabolitos	VIP score	Control	Resveratrol	p valor
5-Hydroxyindole-3-acetate	4.04	0.78 ± 0.20	0.73 ± 0.26	0.7318
Methanol	3.91	0.43 ± 0.11	0.65 ± 0.28	0.1289
Ethanolamine	3.81	4.82 ± 1.04	6.75 ± 0.46	0.0051
N-Dimethylglycine	3.52	0.25 ± 0.10	0.35 ± 0.04	0.0876
Betaine	3.18	0.32 ± 0.15	0.29 ± 0.11	0.6896
Acetone	2.89	1.03 ± 0.32	1.02 ± 0.32	0.9652
3,4-Dihydroxybenzeneacetate	2.75	0.29 ± 0.15	0.25 ± 0.15	0.6833
Creatine	2.40	0.72 ± 0.39	0.62 ± 0.14	0.5931
Isopropanol	2.33	1.76 ± 0.43	2.88 ± 0.76	0.0199
2-Oxobutyrate	2.16	2.57 ± 0.77	4.70 ± 1.64	0.0306
Pyruvate	2.04	1.64 ± 0.38	2.31 ± 0.43	0.0316
Malonate	2.03	9.07 ± 1.45	11.11 ± 1.51	0.0616

Tabla 4.2: VIP score de los metabolitos.

En la tabla se representan los metabolitos con VIP score superior a 2, junto con el p valor y las concentraciones de los metabolitos en nM.

5 DISCUSIÓN

5.1 Justificación del estudio

Las modificaciones metabólicas llevadas a cabo por las distintas células del organismo se desencadenan por múltiples señales, ya sean fisiológicas o químicas. Un ejemplo de situaciones fisiológicas capaz de activar una respuesta metabólica es el ayuno o el ejercicio físico. En este estado el organismo modula los metabolitos y las enzimas en determinados órganos o células, con el fin de adaptarse a esta situación fisiológica.

Respecto a las señales químicas, es importante destacar, ya que es de interés para el desarrollo de la presente tesis, que los alimentos que ingerimos contienen sustancias capaces de activar determinados genes que desempeñan un papel crucial en el metabolismo. Por una parte, el resveratrol, un estilbeno presente en la piel de la uva y otros alimentos, es capaz de activar la expresión AMPK e inhibir la lipogénesis, tanto en adipocitos en cultivo como en modelos animales (65, 178-179). También son varios los autores que le han atribuido a la genisteína, una isoflavona presente en la soja, efectos sobre el metabolismo glucídico y lipídico (180-182).

En los últimos años son muchos los estudios que se han realizado para evaluar las propiedades de los compuestos naturales en ciertas patologías, y como alguna de sus moléculas son capaces de modificar parámetros metabólicos en estados fisiopatológicos, causados por una enfermedad como la diabetes (183), obesidad (57) e incluso cáncer (82, 184), que tienen un gran componente metabólico. Es por ello que en la presente tesis se planteó el estudio de las variaciones metabólicas inducidas por polifenoles

en condiciones fisiológicas, para poder comprender mejor sus efectos en procesos fisiopatológicos.

De este modo, estudiamos si la genisteína o el resveratrol, dos sustancias presentes en la dieta, son capaces de inducir cambios en el gasto energético en ratones sanos, ya que Lagouge y colaboradores describen dichos cambios en ratones obesos (185). Así mismo analizaremos si dichas modificaciones están mediadas por la activación de genes implicados en el metabolismo glucídico o lipídico. Ya que las variaciones en las enzimas implicadas en el metabolismo podrían ser responsables, en parte, de las diferencias metabólicas que se observan tras el tratamiento, también nos planteamos estudiar como el resveratrol o la genisteína inducen cambios en el perfil metabólico de los ratones tras su tratamiento, evaluando variaciones en un amplio número de metabolitos gracias al análisis del metaboloma.

Así pues, el objetivo principal de la presente tesis fue determinar *in vivo* el mecanismo por el cual la genisteína o el resveratrol, inducen cambios en el metabolismo energético de los ratones. Aunque existen muchos estudios sobre el beneficioso papel de los polifenoles en procesos patológicos relacionados con cambios metabólicos, los efectos favorables de estos compuestos en condiciones fisiológicas no han sido investigados todavía en profundidad.

Una vez justificados los motivos para la realización del presente estudio, pasamos a discutir los resultados obtenidos en los siguientes apartados.

5.2 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el gasto energético

Diversas investigaciones reportan variaciones de la cantidad de energía que requiere un organismo para su actividad, tras la administración de sustancias presentes en la dieta, como los polifenoles.

Estudios anteriores muestran un efecto de los polifenoles, como los flavan-3-oles en el gasto energético. Sus autores observan como el tratamiento con proantocianidinas, derivadas de semilla de uva (500 mg/kg de peso corporal durante 7 días), aumentó el gasto energético y estimuló la oxidación de ácidos grasos en ratas macho viejas. Las diferentes dosis de proantocianidinas que estudiaron, conllevaron una disminución del CR, por lo que sugieren que las proantocianidinas y varios flavonoides aumentan la oxidación de los lípidos en comparación con la oxidación de los carbohidratos (186).

Son diversos los autores que han descrito que el resveratrol afecta el metabolismo energético y sirve como un mimético de restricción calórica, al menos en modelos animales de obesidad. Lagouge y colaboradores en 2006 estudiaron el efecto del resveratrol (4g/kg de comida) sobre el gasto energético, en ratones con una dieta obesogénica. El gasto energético basal, medido por el consumo de oxígeno (O_2), aumentó significativamente en los ratones alimentados con dieta rica en grasa y tratados con resveratrol, pero su cociente respiratorio no se modificó, sin observar cambio la ingesta y peso de los animales (185).

Andrade y colaboradores son de los pocos que han estudiado el efecto del resveratrol (4g/kg/día durante 4 semanas) sobre el gasto energético en ratones alimentados con una dieta estándar, sus hallazgos sugieren que la administración oral de resveratrol podría mediar la inducción de una mayor eficiencia energética, ya que observan un aumento en el volumen de oxígeno consumido, y mejores parámetros metabólicos (187).

En base a lo observado en la bibliografía quisimos estudiar si el resveratrol induce cambios en el GE, para lo cual determinamos mediante calorimetría indirecta el VCO_2 producido y el VO_2 consumido por los ratones y con ello el CR (figuras 4.1-4.3). Tras el estudio observamos que el resveratrol disminuyó la producción de CO_2 , lo que conllevó a una disminución del CR. Además, observamos que este cambio era independiente del peso del animal ya que éste no varió tras el tratamiento con resveratrol (figura 4.4).

La ausencia de cambio en el peso del animal puede ser debida a que el tiempo de tratamiento (2 días) es inferior al estudiado por otros autores (4-6 semanas) (188).

Los hallazgos de nuestro estudio en animales sanos y con una dieta estándar sugieren que el resveratrol podría estimular el gasto energético. Esto ha sido previamente descrito en modelos animales, desde levaduras hasta primates pero se ha realizado mediante la determinación de otros parámetros como: la masa corporal, la ingesta de energía espontánea, TMR, la actividad locomotora espontánea y las variaciones diarias en la temperatura corporal (2, 189). Los efectos del resveratrol sobre el metabolismo energético también se han empezado a estudiar en humanos, aunque en dichos estudios los resultados son controvertidos (190).

Tras ver que diferentes polifenoles están implicados en la modulación del gasto energético, también quisimos estudiar la genisteína, puesto que varios estudios en animales han demostrado que la genisteína reduce la ingesta de alimentos, el peso corporal y la masa de células adiposas en ratones hembras ovariectomizadas (191-192).

Para ello determinamos si el tratamiento con genisteína inducía cambios en el GE determinado por calorimetría indirecta. En esta determinación vimos que la genisteína indujo un descenso del VCO_2 producido y del VO_2 consumido, sin producir cambios en el cociente respiratorio (figuras 4.1-4.3). Además, observamos que el peso del animal no influía en la medida de estos parámetros, ya que este se mantuvo constante a lo largo del estudio (figura 4.4).

Si bien es cierto que no hemos encontrado en la literatura otros estudios que midan el CR en ratones tras la administración de genisteína, nuestros resultados indican que los valores de VCO_2 y VO_2 de los ratones tratados con genisteína difieren de los obtenidos en el grupo control.

5.3 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el metabolismo glucídico

Tras observar variaciones en el VCO_2 producido y del VO_2 consumido de los ratones, después del tratamiento intraperitoneal de resveratrol o genisteína, pensamos que dicho cambios podían estar asociados con cambios en el metabolismo glucídico. Además, las variaciones en el metabolismo de los glúcidos son una de las dianas de diferentes patologías como la diabetes, obesidad o cáncer (193-195).

5.3.1 Papel de Akt en el metabolismo glucídico

Distintos estudios han demostrado que la activación de Akt es suficiente para incrementar la entrada de glucosa en la célula, así como para producir un fenotipo glucolítico (20). A nivel de la glucólisis se ha podido observar que la activación de la ruta de Akt actúa incrementando los niveles de PFK (22). En este sentido, se ha demostrado que el aumento de la señalización de la ruta de Akt se correlaciona directamente con mayores niveles en la tasa de metabolismo de la glucosa.

Estudios previos han evidenciado que el resveratrol induce cambios en el metabolismo glucídico mediados por Akt, ya que esta proteína aumenta la expresión de GLUT1, y activa la hexoquinasa y PFK1. Kueck y colaboradores evaluaron el efecto del resveratrol sobre la viabilidad y la captación de glucosa, en cinco líneas celulares de cáncer humano, y encontraron que los tratamientos de hasta 8 horas fueron capaces de reducir la absorción de glucosa e inhibir Akt de una manera dependiente de la dosis y el tiempo (196-197). Además, en estudios anteriores realizados en nuestro

laboratorio con células derivadas de líneas cancerígenas describimos que el resveratrol a concentraciones nutricionales disminuya los niveles de p-Akt (198). Aunque en el estudio *in vivo* el tratamiento con resveratrol no produjo cambios en los niveles de expresión de Akt en ninguno de los tres tejidos analizados: hígado, gastrocnemio y tejido adiposo (figuras 4.5-4.7).

Nuestros resultados no concuerdan con los realizados por otros autores, en los que el resveratrol a 400 mg/kg/día en los ratones rescata la disfunción endotelial inducida por hiperglucemia mediante un aumento de la fosforilación de Akt (199). Dicha diferencia en los resultados puede deberse a que la gran mayoría de los estudios de Akt están realizados en células humanas, y mayoritariamente derivadas de líneas cancerígenas, además las concentraciones estudiadas son entre 10 y 1000 veces superiores a la usada en nuestro estudio.

Del mismo modo, estudiamos el efecto de la genisteína sobre Akt, ya que anteriormente se ha descrito como la genisteína inhibe la fosforilación de Akt en diferentes líneas celulares cancerígenas (200-201). Así pues, observamos que el tratamiento con genisteína indujo un aumento de la expresión de Akt en gastrocnemio (figura 4.6) y en tejido adiposo (figura 4.7), aunque dicho aumento solo es significativo en gastrocnemio.

Tras el tratamiento con los polifenoles, resveratrol o genisteína, no obtuvimos resultados similares en los niveles de Akt. Esta diferencia puede deberse a mecanismo de acción distintos de los polifenoles. Por ello, estudiamos otros parámetros implicados en la glucólisis para poder dilucidar el efecto de los polifenoles sobre el metabolismo glucídico.

5.3.2 Papel de PFK en el metabolismo glucídico

La importancia del papel regulador de PFK1 en la glucólisis, ha sido estudiada por Gómez y colaboradores que describieron recientemente la capacidad del resveratrol para inhibir directamente la función de la PFK1 (202). Además, en dicho estudio realizado en células de cáncer de mama humano MCF-7 y extractos enzimáticos purificados, correlacionaron este efecto con una disminución en la absorción de glucosa y la producción de lactato. Por ello, y para determinar el papel de los polifenoles sobre el metabolismo energético, estudiamos la expresión del mRNA de PFK1 en hígado, gastrocnemio y tejido adiposo, así como la actividad de PFK en hígado y gastrocnemio.

En nuestros resultados observamos que, en los tres tejidos estudiados, no hay cambios en la expresión de PFK1 en los animales tratados con resveratrol (véase figuras 4.8-4.10). Sin embargo, sí que observamos una mayor actividad de dicha enzima en el gastrocnemio de los ratones del grupo resveratrol (figura 4.9). Estos datos no concuerdan con los observados en la bibliografía muestran que la actividad de PFK es inhibida por el resveratrol de una manera dependiente de la concentración (1-100 μ M). Por tanto, las diferencias de resultados pueden ser debido a que las concentraciones usadas en nuestro estudio son distintas a las de Gómez y colaboradores y que se han realizado en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7. Además ellos mismos sugieren que el resveratrol es objeto la isoforma M de PFK pero no han estudiado si el resveratrol podría modular específicamente las otras isoformas de PFK (202).

Con respecto a la genisteína, se ha visto que suprime la glucólisis aerobia en diferentes líneas humanas de hepatocarcinoma y osteocarcinoma, en las cuales observaron que el tratamiento con genisteína disminuía la actividad de HK y PFK en diferentes grados aunque la expresión de mRNA no se producían cambios significativos (203-204).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio en lo referente al tratamiento con genisteína, son similares a los obtenidos en resveratrol. Tras el tratamiento con genisteína la actividad de PFK solo aumentó en gastrocnemio (figura 4.9). Sin embargo, difieren de lo obtenido recientemente por Li y colaboradores en estudios *in vitro* en los cuales el tratamiento con 60 μ M de genisteína en células HCC-LM3 disminuyó la actividad de PFK (203), aunque es poca la bibliografía que existe al respecto.

Aunque nuestros resultados no concuerdan con los estudios realizados *in vitro* sí que se ha visto que los polifenoles pueden actuar sobre Akt y la actividad de la PFK, así como desencadenar modificaciones en la glucólisis. Por ello, la utilización de los polifenoles como inductores de modificaciones en el metabolismo glucídico podría ser una herramienta útil en determinadas situaciones.

5.3.3 Efecto del tratamiento con resveratrol o genisteína sobre los niveles de insulina

Tras ver que en nuestro modelo animal los polifenoles estudiados tenían un efecto escaso sobre la inducción de la glucólisis, quisimos ver si ejercían algún efecto sobre los niveles de insulina, ya que varios estudios revelan que el resveratrol mejora la acción de la insulina en ratones hiperlipidémicos, ratas Zucker obesas y animales con diabetes tipo 2. Se ha descrito que el resveratrol, administrado a dosis entre 2.5-400 mg/kg/día en un periodo entre 1 y 6 meses disminuye la concentración de insulina circulante, y aumenta la sensibilidad a la insulina en diferentes modelos animales (205).

Recientemente, Brasnyo y colaboradores mostraron en pacientes con diabetes tipo 1 una mejora significativa en la sensibilidad a la insulina después de la administración de 5 mg de resveratrol dos veces al día durante cuatro semanas (195). Además, Crandall y colaboradores informaron de los efectos del resveratrol sobre la sensibilización a la insulina en pacientes que padecían intolerancia a la glucosa. Los resultados mostraron una disminución en la concentración de glucosa postprandial sin cambios en la producción de insulina, lo que indica probablemente una mejor sensibilidad a la insulina (206). Así mismo, se ha descrito que el resveratrol (4 g/kg de comida) mejora la sensibilidad a la insulina en un modelo de obesidad inducida por dieta, ya que en los ratones tratados con dieta rica en grasa conjuntamente con resveratrol los niveles de insulina en ayunas se redujeron significativamente (185).

No obstante, en nuestro estudio no hemos encontrado una variación en los niveles de insulina tras el tratamiento con resveratrol (figura 4.11). Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por Lagouge y colaboradores, aunque podría deberse a que los animales no estuvieran en ayunas antes de la toma de muestra para la medición de los niveles de insulina, como si que lo estaban en su estudio, o simplemente porque no tomaban una dieta obesogénica como ocurre en gran parte de las investigaciones con animales en los que se determina los niveles de insulina (185, 207-209).

Asimismo, los estudios realizados en ratones C57BL/KsJ-db/db (182) y ratones diabéticos no obesos (210) demostraron que la genisteína mejoró los metabolismos de glucosa y lípidos. También, Choi y Song describieron que la suplementación con genisteína al 0.1%, junto con una dieta rica en grasa, redujo significativamente los niveles de insulina, la glucosa sérica y el índice de resistencia a la insulina en ratas ovariectomizadas (211).

Nosotros, al igual que en el tratamiento con resveratrol, no observamos cambios en los niveles plasmáticos de insulina en los ratones tras el tratamiento con genisteína, por lo que apuntamos que en nuestro modelo animal los cambios observados en el metabolismo no se deben a variaciones en los niveles de insulina de los animales.

5.4 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el metabolismo lipídico

5.4.1 Papel de la proteína quinasa activada por AMP sobre el metabolismo

AMPK es una enzima que tiene la función de mantener el equilibrio entre la producción y el consumo de ATP en la mayoría de las células eucariotas. Desempeña un papel relevante en la regulación del metabolismo celular, preserva la homeostasis de la energía celular y participa en muchos otros procesos celulares y metabólicos.

Recientemente se ha visto que ciertos compuestos naturales pueden prevenir y tratar enfermedades a través de la activación de AMPK. Es por ello que pensamos que variaciones en esta enzima pueden ser los responsables de los cambios observados en el cociente respiratorio.

Así pues, en nuestros estudios vimos que el tratamiento de los ratones con resveratrol aumentó los valores de expresión de AMPK α (figuras 4.12, 4.14-4.15) en los tres tejidos estudiados, así como los niveles proteicos de AMPK α y pAMPK α en hígado (figura 4.13). Este efecto está ampliamente descrito en la bibliografía ya que varios grupos han demostrado que el resveratrol activa a AMPK, aunque indirectamente (188, 212). Además, se ha demostrado que AMPK también es necesaria para que se produzcan los efectos metabólicos del resveratrol, ya que en ratones KO de AMPK el tratamiento durante 13 semanas con resveratrol no se produjeron los cambios metabólicos, lo que sugiere que los cambios metabólicos inducidos por el resveratrol están mediados en su mayoría por AMPK (65).

Aunque todavía queda por conocer el mecanismo por el cual el resveratrol podría activar AMPK, sabemos que la acción que desempeña sobre esta proteína es clave para que se den los cambios a nivel metabólico.

Por otra parte, diferentes autores han descrito que la genisteína activa a AMPK indirectamente. Así pues, Ji y colaboradores vieron en macrófagos RAW 264.7 que la genisteína a concentraciones dietéticas 0.1-10 μM induce la activación de AMPK (213). En esta misma línea se ha descrito, en células 3T3-L1, como la genisteína aumenta la fosforilación de AMPK de una manera dependiente del tiempo (3-24 horas) y de la concentración (50-200 μM) (214-215).

Los resultados que otros autores han observado están realizados *in vitro*, y es escasa la bibliografía relativa a la activación de AMPK *in vivo*, por ello estudiamos el efecto de la genisteína sobre AMPK en ratones. En tejido adiposo se indujo un aumento de la expresión de AMPK (figura 4.15). Este dato no se reprodujo en gastrocnemio ni en hígado, aunque en hígado sí que observamos un aumento del ratio pAMPK α /AMPK α (figura 4.13), por lo que la genisteína tal vez no esté implicada solo en la expresión de AMPK sino en su activación, para la cual debe ser fosforilada.

5.4.2 Papel de ACC1 sobre el metabolismo

Posteriormente, comprobamos si el aumento de AMPK tras el tratamiento con resveratrol o genisteína se extendía a un incremento en la oxidación de ácidos grasos en los diferentes tejidos determinando los niveles de ACC1 (figuras 4.16-4.19). Esta vía de señalización disminuye la concentración de

malonil-CoA, lo que conlleva a un aumento de la oxidación de ácidos grasos.

Como se comenta en el apartado correspondiente de resultados solamente en gastrocnemio ambos polifenoles disminuyeron los niveles de mRNA de ACC1. El efecto en el grupo de resveratrol sí que se observa en los tres tejidos, no solo en la expresión de mRNA sino que además el resveratrol también disminuye los niveles de proteína en hígado. Ello corrobora los resultados encontrados tanto por Andrade y colaboradores como por Baur y colaboradores, que describieron una disminución de la expresión de ACC tras administración de resveratrol, aunque en ambos estudios, a diferencia del nuestro, los ratones además de recibir una suplementación con resveratrol 0.04% p/p eran alimentados con una dieta con un alto contenido en grasa o calorías (176, 216).

Por otra parte, ciertos estudios como el de Palacios y colaboradores han visto que las proteínas de la soja produjeron un aumento significativo en ACC fosforilada en el músculo esquelético en ratas Zucker Fa/Fa, las cuales son obesas (217). Resultados similares han obtenido recientemente Liu y colaboradores, en un estudio del efecto de la genisteína sobre la esteatosis hepática en ratas tratadas con una dieta alta en grasa y sacarosa (218). También se ha descrito en cultivos celulares que el tratamiento con genisteína a 100 μ M de células HepG2 aumentó la fosforilación de ACC de acuerdo con la activación de AMPK por esta isoflavona (219) y como la genisteína a 10 μ M disminuye los niveles de mRNA de ACC1 (220).

En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con los datos que acabamos de mostrar en cuanto a la

inhibición de ACC tras el tratamiento con genisteína. Aunque en nuestro caso los animales eran sanos, con una dieta normal y con un tratamiento de 5 μ M de genisteína, tal vez al ser diferente el modelo de estudio y el tratamiento esta disminución solo fue significativa en el tejido adiposo.

5.4.3 Efecto del resveratrol o genisteína sobre malonil-CoA

Ya que ACC cataliza la reacción de síntesis de malonil-CoA, que en sí mismo es un inhibidor de la β -oxidación, decidimos analizar la concentración de malonil-CoA en hígado, gastrocnemio y tejido adiposo de los ratones tras el tratamiento con los polifenoles estudiados en la presente tesis. Los resultados obtenidos (figuras 4.20-4.22) muestran que el resveratrol conlleva una disminución de la concentración de malonil-CoA en los tres tejidos. Por tanto el tratamiento con resveratrol tiene un efecto sobre la actividad de ACC ya que disminuye la concentración de malonil-CoA. Por otra parte, el tratamiento con genisteína indujo una disminución de malonil en los tres tejidos aunque solo en el gastrocnemio dicha disminución fue significativa.

No se ha encontrado estudios en los que se analicen las concentraciones de malonil tras el tratamiento con resveratrol o genisteína. Murase y colaboradores han estudiado como los polifenoles del café o del té verde disminuyen la concentración de malonil-CoA en el hígado o músculo de los ratones tratados con dicho polifenol (221-222).

Esto nos lleva a pensar que los polifenoles, en nuestro caso el resveratrol o la genisteína, inhiben la enzima ACC lo cual conlleva a una disminución de

los niveles de malonil-CoA y posiblemente a un aumento de la oxidación de los ácidos grasos.

5.4.4 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la activación de los ácidos grasos de cadena larga

Para determinar si había un aumento de la oxidación de los ácidos grasos continuamos el estudio determinando la expresión de la ACSL, ya que esta enzima es la encargada de activar y por tanto dirigir los ácidos grasos de cadena larga hacia la β -oxidación.

Tras analizar la expresión de dicha enzima en gastrocnemio y tejido adiposo (figuras 4.23 y 4.24) vimos que el resveratrol aumentó en los niveles de mRNA de ACSL, mientras que no hay diferencias significativas en ninguno de los dos tejidos estudiados tras el tratamiento con genisteína.

Son escasos los estudios realizados sobre el efecto de los polifenoles sobre la acil-CoA sintasa. Park y colaboradores describieron que la expresión del mRNA de acil-CoA sintetasa no fue significativamente diferente entre el grupo tratado con dieta rica en grasa y la dieta rica en grasa suplementada con extracto de uva rica en polifenoles (223). Otros autores han encontrado que en hígado y músculo de ratones, tras el tratamiento de genisteína conjuntamente con carnitina aumenta la expresión de ACS, mientras que el tratamiento únicamente con genisteína no la aumenta significativamente (224).

Mientras que en nuestros resultados se ve una tendencia al aumento de la expresión de ACSL, tras el tratamiento, se necesitarían más estudios para ver si los polifenoles pueden ejercer efecto a nivel de la activación de los

ácidos grasos para su degradación. Por lo tanto, decidimos estudiar su transporte hacia la matriz mitocondrial.

5.4.5 Efecto del resveratrol o genisteína sobre el sistema carnitina palmitoil transferasa

5.4.5.1 Papel de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1) en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial

La carnitina palmitoiltransferasa (CPT) es una enzima clave en la regulación de la β -oxidación mitocondrial, cataliza la conversión de acil-CoA en moléculas de acil-carnitina para entrar en la matriz mitocondrial (54).

Una gran parte de los estudios que se han realizado sobre la activación de CPT con resveratrol han sido en modelos animales obesos (225), o con una gran carga lipídica en su dieta. Una muestra de ello es el estudio realizado por Alberdi y colaboradores en el que ratas macho fueron alimentadas con una dieta obesogénica y resveratrol (30 mg/kg) durante 6 semanas. El estudio mostró que el resveratrol disminuyó la acumulación de grasa hepática y aumentó CPT-1a (53).

Tras ver que diversos autores destacan el papel del resveratrol sobre el transportador de carnitina y la lipólisis, quisimos ver si en nuestro estudio si se producía dicho efecto. Así pues, pudimos ver que los niveles CPT1 están aumentados tanto en hígado como en gastrocnemio, aunque no así en el tejido adiposo, en los ratones tratados con resveratrol (figuras 4.25-4.27). Por tanto, nuestros datos muestran una mayor capacidad de entrada de los ácidos grasos en la mitocondria inducida por resveratrol.

Cabe destacar que el tratamiento con genisteína indujo una tendencia al alza de los niveles de mRNA CPT1, pero que en ninguno de los tres tejidos este resultado fue significativo. Otros autores sí han descrito que la genisteína reduce la acumulación de lípidos en el tejido hepático y adiposo, estimulando la β -oxidación a través de la modulación de CPT en ratas ovariectomizadas (180). Sin embargo, nuestros resultados no pueden afirmar que la genisteína tenga un efecto directo sobre una de las enzimas implicadas en la translocación de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria para ser oxidados. Pero como comentan otros autores es posible que exista una modulación post-transcripcional, que aumente la actividad de CPT1, ya que en sus resultados vieron que el aumento del nivel de ARNm de CPT1 no fue proporcional a la actividad de CPT1 (224).

5.4.5.2 Papel de carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial

Aunque la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) no muestra sensibilidad a malonil-CoA ni parece limitar la tasa de captación de ácidos grasos mitocondriales (54), nos resultó interesante analizar si dicha enzima estaba regulada por resveratrol o genisteína, para ver si otra de las proteínas implicadas en la entrada de ácidos grasos a la mitocondria también estaba activada. Como se observa en la figura 4.29, los niveles de mRNA de CACT en gastrocnemio aumentan tras el tratamiento con resveratrol, pero no solo eso sino que además tanto en hígado como en gastrocnemio los niveles proteicos de esta enzima están aumentados (figuras 4.28 y 4.30). En tejido adiposo al igual que con la proteína CPT1 no observamos variaciones.

El resveratrol incrementa la capacidad de estas células para incorporar ácidos grasos a la mitocondria, tanto sobre la enzima que actúa como transportador como la translocadora los ácidos grasos a la matriz mitocondrial en los tejidos que requieren un mayor consumo de energía (hígado y músculo), mientras que esta acción no se ve en el tejido encargado de almacenar la energía, tejido adiposo.

Sin embargo, tras el tratamiento con genisteína solo se ven variaciones en los niveles proteicos de CACT en gastrocnemio (figura 4.30). Por lo que debido a los escasos estudios del efecto de esta isoflavona sobre la enzima CACT, y los resultados obtenidos en la presente tesis, no podemos afirmar que la genisteína desempeñe un papel en el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial.

Por ello proponemos que el aumento en la expresión de mRNA de CPT1 y CACT podría contribuir a la mejora parcial de la oxidación de grasas por el resveratrol dietético en ratones alimentados con dieta no rica en grasas en los tejidos donde se produce la lipólisis como el hígado y el músculo.

5.4.6 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la degradación oxidativa de los ácidos grasos

Varios estudios han abordado los efectos de los polifenoles en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético o en el hígado. Aunque la mayoría de los estudios se centran en el estudio de las estructuras y actividad mitocondrial (226), ya que es en ellas donde se produce la β -oxidación, no se conocen por completo los mecanismos de acción que explican el efecto en la disminución de la masa grasa que induce el resveratrol.

Al ser la β -oxidación el principal proceso por el cual los ácidos grasos se oxidan, proporcionando así energía, estudiamos una de las cuatro enzimas que catalizan dicho proceso, la enoil-CoA hidratada.

Como se muestra en las figuras 4.33 a 4.35, hay diferencias significativas en la expresión de Echs entre el grupo control y resveratrol en hígado y en gastrocnemio, pero no en tejido adiposo.

Debido a la ausencia de estudios en la literatura, sobre las enzimas implicadas en la β -oxidación, tras el tratamiento con resveratrol, dicho hallazgo resulta relevante. Hay un estudio que sigue el mismo objetivo, pero analizan otros genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, como PPAR α , el cual según describen Ahn y colaboradores, aumentó en hígado tras el tratamiento de ratones con resveratrol (227).

Nuestros resultados nos llevan a pensar que tanto en hígado como en gastrocnemio, el resveratrol conduce a un aumento de genes relacionados con la β -oxidación de ácidos grasos.

Tas el tratamiento con genisteína solo se produjeron diferencias en la expresión de Echs en gastrocnemio (figura 4.34). Existe muy poca bibliografía para poder comparar el resultado obtenido tras el tratamiento con genisteína, pero aun así concuerda con lo que han encontrado otros autores. En sus estudios se describe como tras la administración de genisteína en ratas aumentó la actividad de diferentes enzimas implicadas en la β -oxidación como: CPT, Ech, 3-hidroxiacyl-CoA deshidrogenasa y 3-Ketoacil-CoA tiolasa (228-230).

5.5 Efecto del resveratrol o genisteína sobre la biogénesis mitocondrial

Tras ver aumentados los niveles de AMPK α y observar cambios en la oxidación de los ácidos grasos, tanto en hígado como en gastrocnemio, quisimos analizar si este efecto podría relacionarse con un aumento de la mitocondriogénesis.

Lagouge y colaboradores describen que los efectos del resveratrol se asocian con una inducción de genes para la fosforilación oxidativa y la biogénesis mitocondrial y los explican en gran medida por una mayor actividad de PGC-1 α (185). También está descrito que el resveratrol aumenta los niveles de AMPK y PGC1 α , así como el número de mitocondrias y mejora de la función motora en ratones, previniendo así los efectos nocivos del exceso de ingesta calórica (176).

En las figuras 4.36 y 4.37 podemos observar como únicamente el resveratrol indujo un incremento significativo de los niveles de mRNA de PGC1 α en hígado. Estos resultados indican el posible beneficio del resveratrol sobre la biogénesis mitocondrial, lo cual podría estar relacionado con el incremento de la oxidación de los lípidos en dicho tejido.

Aunque el resveratrol presenta efectos prometedores sobre las mitocondrias en diferentes modelos experimentales y en nuestros propios resultados, éstos varían dependiendo del tejido estudiado. Sin embargo, estarían en concordancia con lo descrito por Oliveira y colaboradores ya que al no conocerse aún con exactitud el mecanismo por el cual el

resveratrol modula la función y dinámica mitocondrial, el tipo de célula o tejido, la concentración, la duración de la exposición, el sexo, la edad y el estado de diferenciación celular pueden enumerarse como factores que influyen en esta acción (231).

En el trabajo publicado por Rasbach y Schnellmann, el tratamiento con genisteína (10 μ M) durante 48 h reguló positivamente la expresión de PGC-1 α y las proteínas mitocondriales en las células del túbulo proximal renal (232). Del mismo modo se ha descrito el efecto de la genisteína en la dieta, sobre la función mitocondrial en hígado de ratones alimentados con dietas ricas en grasas, donde vieron una tendencia a que el mRNA de PGC-1 aumentara (233).

En nuestro estudio (figuras 4.36-4.37) no se obtuvieron cambios significativos en la expresión de mRNA de PGC1 α , aunque si la tendencia a un mayor nivel de expresión del mRNA en hígado y gastrocnemio.

En general, se necesita más investigación para examinar si la genisteína induce la biogénesis mitocondrial y los mecanismos moleculares que explican este efecto, ya que varias vías metabólicas como la adipogénesis, la apoptosis, la lipogénesis, la lipólisis, la termogénesis y la oxidación de ácidos grasos se han descrito en la literatura como objetivos efectivos para este polifenol.

5.6 Estudio del perfil metabolómico tras el tratamiento con resveratrol o genisteína

Como ya hemos destacado anteriormente, la metabolómica es una disciplina emergente que se basa en la medición y el estudio de todos los metabolitos de bajo peso molecular endógenos para establecer una visión general del estado metabólico de un sistema biológico. La caracterización de los metabolitos puede proporcionar información sobre los mecanismos subyacentes a las acciones genómicas o ambientales en el metabolismo (234).

Uno de los objetivos de la presente tesis era estudiar el efecto sobre el perfil metabolómico tras la administración de un tratamiento agudo con los polifenoles resveratrol o genisteína en ratones macho. El perfil metabolómico podría ayudar a completar e interpretar los resultados obtenidos en los demás experimentos acerca de la importancia o no de los cambios metabólicos inducidos por dichos polifenoles.

Los resultados obtenidos *in vivo* tras el tratamiento con resveratrol, concuerdan con uno de los pocos estudios del perfil metabolómico realizado con resveratrol. Massimi y colaboradores en exometaboloma de las células HepG2 tratadas con resveratrol, vieron como había un cambio en el perfil metabolómico hacia la utilización de grasa para la producción de energía, lo cual parecía estar de acuerdo con un efecto mediado por activación de AMPK y Sirt1, que observaron en su modelo celular (235).

Estos hechos trasladados a nuestro estudio indicarían que los polifenoles inducen un efecto sobre el perfil metabolómico de los animales, siendo

mayor las variaciones en los animales tratados con resveratrol que los tratados con genisteína, lo cual concuerda con otros resultados obtenidos en la presente tesis. En nuestros resultados, se muestran perfiles metabólicos diferentes en el plasma de los ratones tratados con resveratrol o genisteína frente a los tratados con vehículo. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del espectro de RMN en plasma nos permitió agrupar las distintas muestras en función de su composición metabólica global.

Así, en las figuras 4.38 y 4.39 se observa como los distintos grupos de tratamiento se alejan del grupo control, apareciendo de forma agrupada independientemente del tratamiento que se trate.

Las alteraciones metabólicas inducidas por isoflavonas de la soja como la genisteína o diadzina, han sido recientemente estudiadas en células sensibles al estrógeno (MCF-7) y en células que no responde a estrógenos (MDA-MB-231), usando un enfoque metabolómico global. En ambas líneas celulares, la exposición a isoflavonas condujo a una absorción de glucosa deficiente, privando a las células de su principal fuente de energía, viéndose los efectos reflejados fuertemente en el metaboloma celular, ya que las isoflavonas modulaban principalmente la captación de glucosa (236).

5.7 Consideraciones finales sobre el tratamiento con resveratrol o genisteína en el metabolismo energético

Diversas investigaciones reportan variaciones significativas del gasto energético en animales mediadas por resveratrol o genisteína, aunque la gran parte de estos estudios han sido realizados en animales obesos o alimentados con alta contenido calórico (176, 187, 216, 218, 225, 233). En los ratones incluidos en nuestro estudio, los cuales eran sanos y estaban alimentados con una dieta estándar, observamos que el cociente respiratorio de los tratados con resveratrol disminuyó significativamente. Sin embargo, en los tratados con genisteína no hubo diferencia en el cociente respiratorio, aunque sí en el consumo de O₂ y la producción de CO₂.

Muchos autores han atribuido las variaciones en el gasto energético a modificaciones en el metabolismo glúcido, en los que el resveratrol puede actuar sobre Akt y PFK (197, 202). Nosotros no hemos observado variaciones en dichos enzimas tras el tratamiento con resveratrol o genisteína lo cual puede deberse a que la gran parte de los estudios anteriores se han realizado en líneas celulares tumorales (197-198, 201-202). Sin embargo, sí que hemos observado un aumento del metabolismo lipídico mediado por la activación de AMPK, en hígado, gastrocnemio y tejido adiposo, lo cual concuerda con lo descrito anteriormente (178, 212). Ya que gran parte de los estudios que se han realizado sobre el papel del resveratrol o la genisteína en la activación transporte y β -oxidación de ácidos grasos, ha sido en animales obesos (217, 225), estudiamos en nuestro modelo alguno de los enzimas implicados en dicho mecanismo. En

ellos el resveratrol conduce a un aumento de las enzimas implicadas en la β -oxidación tanto en hígado como en gastrocnemio, mientras que la genisteína solo activa parte de los enzimas en gastrocnemio. Asimismo el perfil metabólico tras la administración de resveratrol o genisteína difiere respecto de los controles.

6 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La administración parenteral de resveratrol disminuye la producción de CO₂ y el cociente respiratorio.
2. La administración parenteral de genisteína disminuye la producción de CO₂ y el consumo de O₂, sin producir alteración en el cociente respiratorio.
3. El resveratrol no produce cambios en la expresión de Akt ni de PFK en hígado, gastrocnemio o tejido adiposo de ratones.
4. La genisteína aumenta la expresión de Akt y PFK en gastrocnemio y no así en hígado y tejido adiposo de ratones.
5. El resveratrol aumenta la expresión génica y los niveles proteicos de AMPK y disminuye los de ACC1 en hígado, gastrocnemio y tejido adiposo de ratones.
6. El resveratrol en hígado aumenta la expresión de los transportadores de ácido grasos hacia la matriz mitocondrial, CPT1 y los niveles de proteína de CACT, e induce la expresión de Ech implicada en la β-oxidación. Así mismo, en gastrocnemio produce un aumento de la expresión de ACSL, CPT1, CACT y Ech implicados en la activación, transporte y oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, en tejido adiposo no se observa ningún cambio en dichas enzimas.
7. La genisteína en gastrocnemio, produce una disminución de los niveles de expresión de ACC1, una caída de los niveles de malonil-

CoA, un aumento de los niveles proteicos de CACT y de la expresión de Ech.

8. Los ratones tratados con resveratrol o genisteína presentan perfiles metabólicos plasmáticos diferentes respecto de los controles.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Organization WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: World Health Organization; 2000.
2. Manini TM. Energy expenditure and aging. *Ageing research reviews*. 2010;9(1):1-11.
3. Landsberg L. Core temperature: a forgotten variable in energy expenditure and obesity? *Obesity Reviews*. 2012;13(S2):97-104.
4. Mataix J, Martínez J. Balance de energía corporal. *Nutrición y alimentación humana* Mataix J Ed Oceano/Ergon Barcelona. 2006:703-22.
5. Westerterp KR. Control of energy expenditure in humans. *European journal of clinical nutrition*. 2017;71(3):340-4.
6. Kien CL, Ugrasbul F. Prediction of daily energy expenditure during a feeding trial using measurements of resting energy expenditure, fat-free mass, or Harris-Benedict equations. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(4):876-80.
7. Seale JL. Energy expenditure measurements in relation to energy requirements. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;62(5):1042S-6S.
8. McClave SA, Lowen CC, Kleber MJ, McConnell JW, Jung LY, Goldsmith LJ. Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2003;27(1):21-6.
9. Speakman JR. Measuring energy metabolism in the mouse—theoretical, practical, and analytical considerations. *Frontiers in physiology*. 2013;4.
10. Arch J, Hislop D, Wang S, Speakman JR. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *International journal of obesity*. 2006;30(9):1322-31.
11. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, DiStefano PS, et al. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010;298(3):R747-R54.
12. Murray RK, Bender DA, Botham KM. *Harper: bioquímica ilustrada*: McGraw-Hill; 2010.
13. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger. Principios de Bioquímica—6ª Edición*. 2014.
14. Sola-Penna M, Da Silva D, Coelho WS, Marinho-Carvalho MM, Zancan P. Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase

and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life*. 2010;62(11):791-6.

15. Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da Silva D. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;100(4):372-8.

16. Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene*. 2001;20(47):6891-8.

17. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes & development*. 2000;14(4):391-6.

18. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(12):9519-25.

19. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(29):21797-800.

20. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research*. 2004;64(11):3892-9.

21. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(4):1437-46.

22. Yang J, Li J, Le Y, Zhou C, Zhang S, Gong Z. PFKL/miR-128 axis regulates glycolysis by inhibiting AKT phosphorylation and predicts poor survival in lung cancer. *American journal of cancer research*. 2016;6(2):473.

23. Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2012;1821(1):177-89.

24. Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annual review of nutrition*. 2002;22(1):383-415.

25. Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2002;282(2):E239-E46.

26. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2010;82(4):149-54.
27. Weisiger R, Gollan J, Ockner R. Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science*. 1981;211(4486):1048-51.
28. Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 1994;79(3):427-36.
29. Glatz J, Luiken J, Van Nieuwenhoven F, Van der Vusse G. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. 1997;57(1):3-9.
30. Killenberg PG, Davidson ED, Webster LT. Evidence for a medium-chain fatty acid: coenzyme A ligase (adenosine monophosphate) that activates salicylate. *Molecular pharmacology*. 1971;7(3):260-8.
31. Hesler CB, Olymbios C, Haldar D. Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(12):6600-5.
32. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—from concept to molecular analysis. *The FEBS Journal*. 1997;244(1):1-14.
33. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2001;1546(1):21-43.
34. Pande SV. A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(3):883-7.
35. Murthy M, Pande SV. Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochemical Journal*. 1987;248(3):727-33.
36. Bahnsen BJ, Anderson VE, Petsko GA. Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry*. 2002;41(8):2621-9.
37. Donaldson WE, editor. Regulation of fatty acid synthesis. *Federation proceedings*; 1979.

38. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2010;45(3):199-214.
39. Dowell P, Hu Z, Lane MD. Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:515-34.
40. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(29):17513-20.
41. Miranda-Saavedra D, Stark MJ, Packer JC, Vivares CP, Doerig C, Barton GJ. The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC genomics*. 2007;8(1):309.
42. Nilsson EC, Long YC, Martinsson S, Glund S, Garcia-Roves P, Svensson LT, et al. Opposite transcriptional regulation in skeletal muscle of AMP-activated protein kinase γ 3 R225Q transgenic versus knock-out mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(11):7244-52.
43. CHEUNG PC, DAVIES SP, HARDIE DG, CARLING D. Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*. 2000;346(3):659-69.
44. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology*. 2003;13(22):2004-8.
45. Rakhshandehroo M, Sanderson LM, Matilainen M, Stienstra R, Carlberg C, De Groot PJ, et al. Comprehensive analysis of PPAR α -dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR research*. 2007;2007.
46. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS letters*. 2003;546(1):113-20.
47. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(9):4011-5.

48. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund A-C, Watts TD, Witters L. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(3):1502-9.
49. Thampy K. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(30):17631-4.
50. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu Z-X, Kim S, Kulkarni A, et al. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(42):16480-5.
51. Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu Z-X, Zhang D, Wang A, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(3):817.
52. Aguirre L, Portillo MP, Hijona E, Bujanda L. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(23):7366.
53. Alberdi G, Rodríguez VM, Macarulla MT, Miranda J, Churrua I, Portillo MP. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition*. 2013;29(3):562-7.
54. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1486(1):1-17.
55. Park EA, Mynatt R, Cook G, Kashfi K. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-I. *Biochemical Journal*. 1995;310(3):853-8.
56. Zammit VA, Arduini A. The AMPK-malonyl-CoA-CPT1 axis in the control of hypothalamic neuronal function. *Cell Metabolism*. 2008;8(3):175.
57. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014;25(1):1-18.
58. Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churrua I, Simon E, Zechner R, et al. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J Nutr Biochem*. 2012 May 2.

59. Kim HJ, Jeon SM, Lee MK, Jung UJ, Shin SK, Choi MS. Antilipogenic effect of green tea extract in C57BL/6J-Lepob/ob mice. *Phytotherapy research*. 2009;23(4):467-71.
60. Gutgesell A, Wen G, König B, Koch A, Spielmann J, Stangl GI, et al. Mouse carnitine–acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPAR α and PPAR δ in liver cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(10):1206-16.
61. Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Yamasaki D, Ishimoto K, Tanaka T, et al. Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;389(3):501-5.
62. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413(6852):131-8.
63. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
64. Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, le Lièvre X, et al. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(5):3760-8.
65. Um J-H, Park S-J, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, et al. AMP-activated protein kinase–deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes*. 2010;59(3):554-63.
66. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1776.
67. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2003;284(4):E671-E8.
68. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010;6(12):689-97.
69. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*. 2000;21(1):55-89.
70. Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, et al. Glucose metabolism and catecholamines. *Critical care medicine*. 2007;35(9):S508-S18.

71. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine reviews*. 2013;34(3):309-38.
72. Tara M, Sharoff C, Chipkin SR, Grow D, Ruby BC, Braun B. Regulation of exercise carbohydrate metabolism by estrogen and progesterone in women. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2002;283(5):E1046-E55.
73. Navarro G, Allard C, Xu W, Mauvais-Jarvis F. The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. *Obesity*. 2015;23(4):713-9.
74. Lundholm L, Zang H, Hirschberg AL, Gustafsson J-Å, Arner P, Dahlman-Wright K. Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. *Fertility and sterility*. 2008;90(1):44-8.
75. Tara M, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(43):35983-91.
76. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*. 2010 Jan;40(1):387-426.
77. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002 Jan;48(1-2):155-71.
78. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Oct;68(10):2374-6.
79. Horning EC. Use of combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry for clinical problems. *Clin Chem*. 1968;14:777.
80. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*. 2007;43(4):348.
81. Uchiumi F, Watanabe T, Hasegawa S, Hoshi T, Higami Y, Tanuma S-i. The effect of resveratrol on the Werner syndrome RecQ helicase gene and telomerase activity. *Current Aging Science*. 2011;4(1):1-7.
82. Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 2005;113(4):660-9.

83. Leifert WR, Abeywardena MY. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutrition research*. 2008;28(12):842-50.
84. Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(37):34783-93.
85. Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, García-Almagro FJ, Ruiz-Ros JA, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2012;110(3):356-63.
86. Gescher A, Steward WP, Brown K. Resveratrol in the management of human cancer: how strong is the clinical evidence? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1290(1):12-20.
87. Bonet-Costa V, Herranz-Perez V, Blanco-Gandia M, Mas-Bargues C, Inglés M, Garcia-Tarraga P, et al. Clearing amyloid- β through PPAR γ /ApoE activation by genistein is a treatment of experimental Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016;51(3):701-11.
88. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
89. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*. 2001;72(2):145-71.
90. Shahidi F, Naczk M, Griffiths W. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. *Trends in Food Science and Technology*. 1996;7(7):243.
91. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*. 2005;27(2):269-77.
92. Sosulski F, Krygier K, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1982;30(2):337-40.
93. Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under experimental and clinical research*. 2003;29(5-6):181-7.

94. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 2002 May 22;50(11):3337-40.
95. Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Grossi G, Tolomelli B, et al. Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2001;49(12):6026-32.
96. Covas M, Miro-Casas E, Fito M, Farre-Albadalejo M, Gimeno E, Marrugat J, et al. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under experimental and clinical research.* 2003;29(5-6):203-6.
97. Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. An update on bioactive plant lignans. *Natural product reports.* 2005;22(6):696-716.
98. Cortell JM, Kennedy JA. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006;54(22):8510-20.
99. Bredsdorff L, Nielsen ILF, Rasmussen SE, Cornett C, Barron D, Bouisset F, et al. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from α -rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *British journal of nutrition.* 2010;103(11):1602-9.
100. Kuhnle GG, Dell'Aquila C, Runswick SA, Bingham SA. Variability of phytoestrogen content in foods from different sources. *Food chemistry.* 2009;113(4):1184-7.
101. Mazza G, Cacace JE, Kay CD. Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international.* 2004;87(1):129-45.
102. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006;54(11):4069-75.
103. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000;80(7):1081-93.
104. Takaoka MJ. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes.fil.). *J Fac Sci Hokkaido Imp Univ.* 1940;3:1-16.
105. Takaoka M. Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*. *Nippon Kagaku Kaishi.* 1939;60:1090-100.

106. Paul BM, I.; Deopujari, J.; Charpentier, C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol.* 1999;68:71-6.
107. Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. Chemical constituents of polygonaceous plants. i. studies on the components of ko-j o-kon.(*polygonum cuspidatum sieb. et zucc.*). *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* 1963;83:988-90.
108. Langcake P, Pryce R. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology.* 1976;9(1):77-86.
109. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6.
110. Siemann EH, L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic.* 1992;43:4.
111. Trela BC, W, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agricultural Food Chem.* 1996;44:1253-7.
112. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research.* 2004;24(5A):2783-840.
113. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
114. Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical biochemistry.* 2002;35(2):119-24.
115. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res.* 2005 May;49(5):472-81.
116. Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular nutrition & food research.* 2005;49(5):482-94.
117. Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, et al. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003 Apr 4;72(20):2219-33.
118. El-Mohsen MA, Bayele H, Kuhnle G, Gibson G, Debnam E, Srail SK, et al. Distribution of [3H] trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. *British journal of nutrition.* 2006;96(1):62-70.

119. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2005 May;49(5):495-504.
120. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015.
121. Witte AV, Kerti L, Margulies DS, Flöel A. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *The Journal of Neuroscience*. 2014;34(23):7862-70.
122. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(3):R209-R25.
123. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
124. Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2000;11(6):326-31.
125. Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Poloniae Pharmaceutica—Drug Research*. 2000;57(2):I35-I55.
126. Walz E. Isoflavon- und Saponin-Glucoside in Soja hispida. *European Journal of Organic Chemistry*. 1931;489(1):118-55.
127. Bennetts H, Uuderwood E, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian veterinary journal*. 1946;22(1):2-12.
128. Axelson M, Kirk D, Farrant R, Cooley G, Lawson A, Setchell K. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl) chroman] in human urine. *Biochemical Journal*. 1982;201(2):353-7.
129. Goodman MT, Wilkens LR, Hankin JH, Lyu L-C, Wu AH, Kolonel LN. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *American journal of epidemiology*. 1997;146(4):294-306.
130. Barnes S. 2Phytoestrogens and breast cancer. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. 1998;12(4):559-79.
131. Herman C, Adlercreutz T, Goldin BR, Gorbach SL. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *The Journal of nutrition*. 1995;125(3):757S.

132. Ma D-F, Qin L-Q, Wang P-Y, Katoh R. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*. 2008;27(1):57-64.
133. Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *The Journal of nutrition*. 1998;128(10):1589-92.
134. Adlercreutz H. Epidemiology of phytoestrogens. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. 1998;12(4):605-23.
135. Barnes S, Peterson TG, Coward L. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1995;59(S22):181-7.
136. Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *Journal of the national cancer institute*. 2003;95(12):906-13.
137. Kolonel LN. Variability in diet and its relation to risk in ethnic and migrant groups. *Phenotypic Variation in Populations*: Springer; 1988. p. 129-35.
138. Hamilton-Reeves JM, Vazquez G, Duval SJ, Phipps WR, Kurzer MS, Messina MJ. Clinical studies show no effects of soy protein or isoflavones on reproductive hormones in men: results of a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2010;94(3):997-1007.
139. Setchell KD. Soy isoflavones—benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(sup5):354S-62S.
140. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson J-Å. The estrogen receptor β subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1998;19(4):253-86.
141. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 1999;85(1):47-51.
142. Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British journal of nutrition*. 2004;91(4):513-31.
143. Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H, Bowey E. *Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora*. Portland Press Limited; 1999.
144. Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, et al. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after

- ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *The Journal of nutrition*. 2006;136(1):45-51.
145. Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutrition and cancer*. 2007;57(1):1-10.
146. Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1995;208(1):44-50.
147. Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(2):447-53.
148. Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of nutrition*. 1997;127(7):1260-8.
149. Rice S, Whitehead SA. Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;108(3):186-95.
150. Setchell KD. Absorption and metabolism of soy isoflavones—from food to dietary supplements and adults to infants. *The Journal of nutrition*. 2000;130(3):654S-5S.
151. Joannou G, Kelly G, Reeder A, Waring M, Nelson C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995;54(3):167-84.
152. Setchell KD, Brown NM, Desai PB, Zimmer-Nechimias L, Wolfe B, Jakate AS, et al. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *The Journal of nutrition*. 2003;133(4):1027-35.
153. Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutrition and cancer*. 2000;36(1):27-32.
154. Tikkanen MJ, Wähälä K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3106-10.

155. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S-i, Itoh N, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(12):5592-5.
156. Markovits J, Linassier C, Fossé P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, et al. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer research*. 1989;49(18):5111-7.
157. Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallardo FV, Mann GE, et al. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2136-8.
158. Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2015;6(4):408-19.
159. Patel RP, Boersma BJ, Crawford JH, Hogg N, Kirk M, Kalyanaraman B, et al. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(12):1570-81.
160. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(5):276-82.
161. Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, et al. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans—. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(2):395-400.
162. Vedavanam K, Srijayanta S, O'Reilly J, Raman A, Wiseman H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 1999;13(7):601-8.
163. Bartke A, Peluso M, Moretz N, Wright C, Bonkowski M, Winters T, et al. Effects of soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice. *Hormone and metabolic research*. 2004;36(08):550-8.

164. Lee Y-B, Lee HJ, Sohn HS. Soy isoflavones and cognitive function. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005;16(11):641-9.
165. Monteiro SC, de Mattos CB, Ben J, Netto CA, Wyse AT. Ovariectomy impairs spatial memory: prevention and reversal by a soy isoflavone diet. *Metabolic brain disease*. 2008;23(3):243-53.
166. Vina J, Lloret A, Valles SL, Borrás C, Badia MC, Pallardo FV, et al. Mitochondrial oxidant signalling in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007 May;11(2):175-81.
167. Mahn K, Borrás C, Knock GA, Taylor P, Khan IY, Sugden D, et al. Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *The FASEB journal*. 2005;19(12):1755-7.
168. Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2010;1802(1):205-11.
169. Hasslacher M, Ivessa A, Paltauf F, Kohlwein S. Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(15):10946-52.
170. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-75.
171. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*. 1977;83(2):346-56.
172. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
173. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicological Sciences*. 2005;85(2):809-22.
174. Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *Journal of proteome research*. 2007;6(2):443-58.
175. Lindon JC, Nicholson JK, Everett JR. NMR spectroscopy of biofluids. *Annual reports on NMR spectroscopy*. 1999;38:1-88.
176. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-42.

177. Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. Cyclodextrins for drug delivery. *J Drug Target*. 2010 Nov;18(9):645-56.
178. Chen S, Li Z, Li W, Shan Z, Zhu W. Resveratrol inhibits cell differentiation in 3T3-L1 adipocytes via activation of AMPK. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2011;89(11):793-9.
179. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*. 2006;55(8):2180-91.
180. Choi JS, Koh I-U, Song J. Genistein reduced insulin resistance index through modulating lipid metabolism in ovariectomized rats. *Nutrition research*. 2012;32(11):844-55.
181. Weigt C, Hertrampf T, Flenker U, Hülsemann F, Kurnaz P, Fritzscheier KH, et al. Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;154:12-22.
182. Park SA, Choi M-S, Cho S-Y, Seo J-S, Jung UJ, Kim M-J, et al. Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life sciences*. 2006;79(12):1207-13.
183. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition research*. 2012;32(7):537-41.
184. Pavese JM, Krishna SN, Bergan RC. Genistein inhibits human prostate cancer cell detachment, invasion, and metastasis. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100(Supplement 1):431S-6S.
185. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006;127(6):1109-22.
186. Serrano J, Casanova-Martí À, Gual A, Pérez-Vendrell AM, Blay MT, Terra X, et al. A specific dose of grape seed-derived proanthocyanidins to inhibit body weight gain limits food intake and increases energy expenditure in rats. *European journal of nutrition*. 2017;56(4):1629-36.
187. Andrade JMO, Frade ACM, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MTP, Guimarães ALS, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and

decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European journal of nutrition*. 2014;53(7):1503-10.

188. Bitterman JL, Chung JH. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. *Cellular and molecular life sciences*. 2015;72(8):1473-88.

189. Dal-Pan A, Blanc S, Aujard F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC physiology*. 2010;10(1):11.

190. de Ligt M, Timmers S, Schrauwen P. Resveratrol and obesity: can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(6):1137-44.

191. Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, et al. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*. 2003;144(8):3315-20.

192. Kim H-K, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang J-Y, Zhang W, Duan J, et al. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *The Journal of nutrition*. 2006;136(2):409-14.

193. Jordan SD, Krüger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Brönneke HS, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nature cell biology*. 2011;13(4):434.

194. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(10):635.

195. Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *British journal of nutrition*. 2011;106(3):383-9.

196. Kueck A, Pipari AW, Griffith KA, Tan L, Choi M, Huang J, et al. Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2007;107(3):450-7.

197. Gwak H, Haegeman G, Tsang BK, Song YS. Cancer-specific interruption of glucose metabolism by resveratrol is mediated through inhibition of Akt/GLUT1 axis in ovarian cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2015;54(12):1529-40.

198. Ingles M, Gambini J, Miguel MG, Bonet-Costa V, Abdelaziz KM, El Alami M, et al. PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. *Biomed Res Int*. 2014;2014:580852.

199. Li J-y, Huang W-q, Tu R-h, Zhong G-q, Luo B-b, He Y. Resveratrol rescues hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of Akt. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017;38(2):182.
200. Kaushik S, Shyam H, Sharma R, Balapure AK. Dietary isoflavone Daidzein synergizes Centchroman action via induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in MCF-7/MDA MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Phytomedicine*. 2018.
201. Qin J, Teng J, Zhu Z, Chen J, Huang W-J. Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells. *Pharmaceutical biology*. 2016;54(1):74-9.
202. Gomez LS, Zancan P, Marcondes MC, Ramos-Santos L, Meyer-Fernandes JR, Sola-Penna M, et al. Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochimie*. 2013;95(6):1336-43.
203. Li S, Li J, Dai W, Zhang Q, Feng J, Wu L, et al. Genistein suppresses aerobic glycolysis and induces hepatocellular carcinoma cell death. *British journal of cancer*. 2017;117(10):1518.
204. Engel N, Adamus A, Schauer N, Kühn J, Nebe B, Seitz G, et al. Synergistic action of genistein and calcitriol in immature osteosarcoma MG-63 cells by SGLP1 up-regulation. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169742.
205. Abbasi Oshaghi E, Goodarzi MT, Higgins V, Adeli K. Role of resveratrol in the management of insulin resistance and related conditions: mechanism of action. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2017;54(4):267-93.
206. Crandall JP, Oram V, Trandafirescu G, Reid M, Kishore P, Hawkins M, et al. Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2012;67(12):1307-12.
207. Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Lasa A, Aguirre L, Rimando AM, Portillo MP. Pterostilbene, a dimethyl ether derivative of resveratrol, reduces fat accumulation in rats fed an obesogenic diet. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(33):8371-8.
208. Kang W, Hong HJ, Guan J, Kim DG, Yang E-J, Koh G, et al. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 2012;61(3):424-33.

209. Kim S, Jin Y, Choi Y, Park T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochemical pharmacology*. 2011;81(11):1343-51.
210. Choi M, Jung U, Yeo J, Kim M, Lee M. Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2008;24(1):74-81.
211. Choi JS, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. *Nutrition*. 2009;25(6):676-85.
212. Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(17):7217-22.
213. Ji G, Zhang Y, Yang Q, Cheng S, Hao J, Zhao X, et al. Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF- κ B following AMP kinase activation in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One*. 2012;7(12):e53101.
214. Hwang J-T, Park I-J, Shin J-I, Lee YK, Lee SK, Baik HW, et al. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(2):694-9.
215. Park CE, Yun H, Lee E-B, Min B-I, Bae H, Choe W, et al. The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. *Journal of medicinal food*. 2010;13(4):815-20.
216. Andrade JMO, Paraíso AF, de Oliveira MVM, Martins AME, Neto JF, Guimarães ALS, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition*. 2014;30(7):915-9.
217. Palacios-González B, Zarain-Herzberg A, Flores-Galicia I, Noriega LG, Alemán-Escondrillas G, Zariñán T, et al. Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(1):132-40.
218. Liu H, Zhong H, Yin Y, Jiang Z. Genistein has beneficial effects on hepatic steatosis in high fat-high sucrose diet-treated rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;91:964-9.

219. Hsu M-H, Savas Ü, Lasker JM, Johnson EF. Genistein, resveratrol, and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside induce cytochrome P450 4F2 expression through an AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337(1):125-36.
220. Shin ES, Lee HH, Cho SY, Park HW, Lee SJ, Lee TR. Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *The Journal of nutrition*. 2007;137(5):1127-31.
221. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, et al. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2010;300(1):E122-E33.
222. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006;290(6):R1550-R6.
223. Park S-H, Park T-S, Cha Y-S. Grape seed extract (*Vitis vinifera*) partially reverses high fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Nutrition research and practice*. 2008;2(4):227-33.
224. Yang J-Y, Lee S-J, Park H-W, Cha Y-S. Effect of genistein with carnitine administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. *Journal of medicinal food*. 2006;9(4):459-67.
225. Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Macarulla M, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *British journal of nutrition*. 2012;107(2):202-10.
226. Aguirre L, Fernández-Quintela A, Arias N, Portillo MP. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules*. 2014;19(11):18632-55.
227. Ahn J, Cho I, Kim S, Kwon D, Ha T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *Journal of hepatology*. 2008;49(6):1019-28.
228. Takahashi Y, Odbayar T-O, Ide T. A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009;44(3):223-30.
229. Takahashi Y, Ide T. Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling

- proteins and peroxisome proliferator-activated receptor γ in adipose tissues of rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008;19(10):682-93.
230. Xiao CW, Wood CM, Weber D, Aziz SA, Mehta R, Griffin P, et al. Dietary supplementation with soy isoflavones or replacement with soy proteins prevents hepatic lipid droplet accumulation and alters expression of genes involved in lipid metabolism in rats. *Genes & nutrition*. 2014;9(1):373.
231. de Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, Daglia M, Hajheydari Z, Nabavi SM. Resveratrol and the mitochondria: from triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2016;1860(4):727-45.
232. Rasbach KA, Schnellmann RG. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;325(2):536-43.
233. Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition*. 2006;22(9):956-64.
234. Tikunov AP, Johnson CB, Lee H, Stoskopf MK, Macdonald JM. Metabolomic investigations of American oysters using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Marine drugs*. 2010;8(10):2578-96.
235. Massimi M, Tomassini A, Sciubba F, Sobolev AP, Devirgiliis LC, Micheli A. Effects of resveratrol on HepG2 cells as revealed by $^1\text{H-NMR}$ based metabolic profiling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012;1820(1):1-8.
236. Uifălean A, Schneider S, Gierok P, Ionescu C, Iuga CA, Lalk M. The impact of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells using a global metabolomic approach. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(9):1443.