



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Efecto de la genisteína y la miogénesis en la expresión  
de *Fndc5* en miotúbulos derivados de la línea celular  
C2C12

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:

**AUGUSTO ORTEGA GRANILLO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. ARMANDO R. TOVAR PALACIO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, 2016

CDMX



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A todos los mexicanos, quienes me han dado la oportunidad de empoderarme de mis decisiones y han confiado en mí, ciegamente, para que obtenga la libertad de vivir la vida que quiero vivir

A toda la comunidad de la UNAM, quienes han sembrado en mí la esperanza de un mejor país y la voluntad de generar oportunidades para que más mexicanos conozcan una forma alternativa de administrar nuestros recursos, no para un cambio, sino para crecer

A mi hermana, quien nunca me dio tregua durante esta aventura, en buenos momentos y en malos también, quien alimentó mi curiosidad con su propia curiosidad y me recordó que siempre voy a encontrar a alguien mejor que yo

A mi mamá, que me recordó constantemente que la fortuna pasa todo el tiempo apenas a unos centímetros de mí, y que sólo yo puedo hacer algo para que en el momento adecuado la atrape y haga lo mejor de todo aquello que la vida me ofrece

A mi papá, quien me enseñó que la vida puede ser dura, pero que depende de mis acciones lo que obtendré de vuelta

Al increíble Alfonso Medina, quien se declaró como mi primer fan, y que ha dado todo para que yo tenga la oportunidad de volar muy alto

A mi abuela Elodia, quien me enseñó que no importa cómo me sienta, debo levantarme, arreglarme y salir a trabajar

A mi tía Rocío, quien ha hecho todo lo que ha podido por demostrarme lo especial que soy

A mi tía Vianney, quien me ha dado el ejemplo de luchar por uno mismo, aun cuando eso significa poner distancia entre yo y los que más quiero, porque primero estoy yo

A Fani, por hacerme sentir especial en mis años de mayor fragilidad

A mis primos y sobrinos, porque algún día puedan descubrir lo maravillosa que es la vida y encuentren un camino que los lleve a la felicidad

A la familia que me vio crecer, a veces de buenas y a veces de no tan buenas, porque me recordaron que nosotros los hijos, estamos para tener una mejor vida que los padres, y les creí

A mis padres adoptivos 田留 ちえみ y しんいち, que lucharon por mí aun en contra de sus propias costumbres

A AFS, quienes creyeron en mí y me dieron la oportunidad de vivir en otro país, porque gracias a ellos aprendí que hoy necesito una realidad para mí, mejor de la que vivo y de la que ellos me permitieron contemplar

Al Dr. Armando Tovar Palacio, por darme la libertad de crecer a mi propio ritmo, siempre creyendo en mi trabajo duro y autocrítica científica. No habría llegado tan lejos como investigador sin su figura como tutor

A la Dra. Alicia González Manjarrez, quien de no haber apostado por mí, dos veces, yo no habría escrito esta tesis

Al Dr. Raúl Aguilar Roblero, quien me demostró hasta la extenuación que sólo yo puedo hacer una diferencia en cómo quiero que sea mi realidad

A la Dra. Lilia Noriega, quien me enseñó que por más vínculos que tenga con mi comunidad, yo soy libre de escoger la vida que quiero tener

A la Dra. Sue L. Jaspersen, porque confió en mi trabajo duro, me dio la oportunidad de demostrarles que tengo lo que se necesita para hacer un doctorado y me acompañó en el proceso que significó aplicar al PhD

Al Dr. David Obeso Domingo, quien me enseñó, acompañó, hizo reír, hizo reflexionar e hizo trabajar intensamente durante el tiempo en el que descubrí lo maravilloso que es el instituto Stowers

A la Dra. K. Thanh Voung, quien me ha apapachado aún lo poco que trabajamos juntos, quien me echó porras y apoyó en todo lo que necesité para mi desarrollo académico y profesional

A la Dra. Alexandra Rodríguez, por los momentos de cercanía que me brindó cuando los necesitaba, por su amistad incondicional y muchas otras cosas más

A la Dra. Mónica Leticia, quien con su maravilloso sentido del humor, me dio ánimo de aventurarme más allá de lo que pensé que podía lograr

Al Dr. Sergio Ponce de León Rosales, quien me enseñó que aun nadando en aguas desconocidas, de mí depende disfrutar lo que hago y aprender de lo que la vida me pone enfrente

Al Dr. Alejandro Fernández Velasco, porque nos cuidó y procuró a todos mis compañeros de generación por igual, siempre creyendo en nuestro bienestar y crecimiento personal

A la Dra. Julieta Rubio Ligthbourn, quien nos enseñó que nosotros los alumnos somos los dueños de la clase, que de nosotros depende nuestro aprendizaje, así como nuestras buenas maneras

A la Lic. Araceli Sosa Castillo, quien de no haber confiado en mí no sería biomédico, ni hablaría japonés

A la Lic. Angelina Torres, quien de no haberme dedicado su tiempo gratuitamente, no habría escrito esta tesis

Al Prof. Helios Becerril, quien me preparó y acompañó durante el proceso de ingreso a esta licenciatura

A Eva, porque ha sido mi cómplice incondicional en el descubrimiento de quien soy yo y lo que quiero para mí en el futuro

A Ana, porque no me imagino la vida sin su amistad

A Bere, porque me enseñó que aquellas cosas que son raras, también son bellas si se les mira detenidamente

A Citlali, porque me enseñó a creer en mí, a trabajar duro y a no recibir menos de lo que sé que merezco

A Edson, porque compartió conmigo su increíble historia, llena de aprendizaje y trabajo duro, la cual me causa gran admiración

A Karen, por lo mucho que me dio durante tanto tiempo

A Raquel, porque me enseñó que las buenas intenciones, la confianza y el cariño son independientes del tiempo que llevas conociendo a una persona, más bien son características intrínsecas de la gente bien

A Alejandro, quien me ha acompañado en el proceso de conclusión de la licenciatura e inicio del doctorado, porque su inteligencia es inigualable y su amistad muy valiosa

A Daniel, porque hay muchas cosas de mi vida que serían menos geniales sin su amistad

A Cesia, porque me enseñó la importancia de ser insumiso, de buscar más de lo que hay y conseguirlo

A Stephanie, porque me sonrió muchísimas veces en todo el tiempo que nos hemos dedicado uno al otro

A Shantal, porque me enseñó que a pesar de distanciarnos a ratos, una verdadera amistad es incondicional, atemporal y muy divertida

A Rodrigo, quien me ha cocinado, consentido y hecho reír muchas veces

A Ceci, porque me ha motivado para conseguir lo que quiero, porque me ha regalado muchas sonrisas y porque comparto con ella el deseo de éxito y felicidad

A Benjamín, quien me ha enseñado demasiadas cosas buenas de la vida

A David, quien grabó en mi memoria con mucha intensidad la confesión de sus sentimientos en el discurso de nuestra graduación

A Felipe y su hermosa familia, porque sin su apoyo mi trabajo en el laboratorio habría sido muy diferente y menos productivo

A Felipe, porque me brindó un espacio de reflexión, distracción y emoción, casi siempre en los miércoles

A Aniko, porque mi vida sería mucho más aburrida sin su compañía

A Saraí, porque ha crecido conmigo académicamente, profesionalmente y personalmente después de tantas pláticas en el cuarto de cultivo

## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
Cambios adaptativos del músculo esquelético .....	4
La participación del músculo en la termorregulación y el gasto energético .....	5
La miogénesis influye en la expresión del gen <i>Fndc5</i> .....	7
La nutrición tiene efectos mayores en la homeostasis .....	8
La bioinformática da oportunidad de robustecer una hipótesis .....	9
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
Cultivo celular .....	13
Conteo de células .....	13
Tratamientos con genisteína.....	14
Extracción de proteína total .....	14
Cuantificación de proteína .....	14
Western Blot.....	15
Extracción de RNA .....	16
RT-PCR.....	16
qPCR .....	16
Diseño de oligonucleótidos .....	16
Construcción de plásmidos .....	17
Secuenciación de los insertos.....	17
Transfección de mioblastos.....	17
Ensayo dual de luciferasa y renilla.....	18
Análisis estadístico.....	18
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
Análisis de la expresión génica.....	19
El efecto de la genisteína en la expresión de <i>Fndc5</i> es mínimo .....	24

La genisteína tiene un efecto en la cantidad de proteína <i>Fndc5</i> y $PGC1\alpha$ dos horas después de administrar el estímulo.....	24
Evaluación de marcadores de diferenciación.....	28
El perfil de expresión del cultivo depende de la densidad de la siembra.....	29
<i>Fndc5</i> tiene un perfil de expresión similar a <i>Myog</i> .....	31
Los programas GeneNetwork, Biomart, Pro-Coffee y Lasagna generan información robusta para un análisis <i>in silico</i> del promotor de un gen .....	33
La expresión del gen <i>Fndc5</i> parece ser regulada por <i>Myog</i> durante la miogénesis.....	37
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>

**ABREVIATURAS**

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AMPK	del inglés Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
ATCC	del inglés American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
C2C12	línea celular de mioblastos murinos
COSMIC	del inglés Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
Ctrl	Control
DMEM	del inglés Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENCODE	del inglés Encyclopedia of DNA Elements
Fndc5	del inglés Fibronectin type III Domain Containing 5
Foxo1	del inglés Forkhead box O1
IL-6R	del inglés Interleukin 6 receptor
MAPKs	del inglés Mitogen-Activated Protein Kinase
Mef2a	del inglés Myocyte Enhancer Factor 2 <sup>a</sup>
M-MLV	del inglés Moloney Murine Leukemia Virus
Mrpl2	del inglés Mitochondrial ribosomal protein L2
Mrf4	del inglés muscle regulatory factor 4
Mstn	Miostatina
Myf5	del inglés Myogenic factor 5
MyoD	del inglés Myogenic Differentiation
Myog	Miogenina
Nrbf2	del inglés Nuclear receptor binding factor 2
PBS	del inglés phosphate buffered saline
Pdk4	del inglés Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4
Pgc1 $\alpha$	del inglés Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha
PPAR $\gamma$	del inglés Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PPAR $\delta$	del inglés Peroxisome Proliferator Activated Receptor delta
PVDF	del inglés PolyVinylidene Fluoride
QTL	del inglés Quantitative Trait Loci
RIPA	del inglés RadioImmunoPrecipitation Assay
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	del inglés Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
TBS	del inglés Tris-Buffered Saline
TRANSFACT	del inglés TRANScriptioN FACtor database
UA	Unidades Arbitrarias
Ucp1	del inglés Uncoupling protein 1

## RESUMEN

La nutrición es fundamental para un balance adecuado de la ingesta, almacenamiento y utilización de la energía. En mamíferos, estos procesos requieren de tejidos especializados para mantener la homeostasis. El músculo esquelético tiene efectos fundamentales en el metabolismo; por ejemplo, almacena cuatro veces más glucógeno que el hígado<sup>1</sup>.

En 2012, Boström y colaboradores demostraron que la actividad física incrementa la síntesis de la proteína Fndc5 en músculo esquelético en ratones<sup>2</sup>. Esta proteína es procesada y secretada, originando la mioquina irisina. En el artículo, se demostró que la sobre expresión muscular del gen *Pgc1α* tiene como consecuencia el mismo fenotipo; también, que la irisina causa una reconfiguración en el metabolismo del tejido adiposo blanco. Se denominó a este proceso “browning”, por los efectos que la irisina tiene en el metabolismo del tejido adiposo blanco, haciéndolo similar al del tejido adiposo pardo.

La genisteína es un polifenol derivado de la soya que es conocido por su actividad como agonista parcial del receptor de estrógenos  $\alpha$ , así como su actividad inhibitoria no específica de tirosina cinasas<sup>3</sup>. También, se conoce su actividad inhibitoria de la vía de las MAPKs en células epiteliales humanas<sup>4</sup>, así como el papel activador de la vía de AMPK en la línea celular C2C12<sup>5</sup>.

En el laboratorio del Dr. Tovar, se encontró que ratones alimentados con una dieta control suplementada con genisteína, mostraban un incremento en los niveles de irisina en plasma, así como una mayor cantidad de proteína Fndc5 en músculo esquelético, en contraste con los ratones que no ingirieron genisteína. Consecuentemente, nos preguntamos si la genisteína podía incrementar la cantidad de proteína Fndc5 o la expresión del gen *Fndc5* en cultivo *in vitro* de una línea celular de músculo esquelético.

Una serie de experimentos con miotúbulos derivados de la línea celular C2C12, demostraron que la genisteína *per se* no modifica la cantidad de proteína Fndc5 ni la expresión del gen *Fndc5*, contrario a nuestras expectativas. Sin embargo, logramos demostrar que el gen *Fndc5* tiene un perfil de expresión similar al de los genes marcadores de la miogénesis: *Myog* y *Mef2a*. Consecuentemente, se caracterizó el perfil de expresión

de estos genes durante la diferenciación en la línea celular C2C12, encontrando que la densidad de la siembra del cultivo tiene un efecto significativo en el perfil de expresión. Posteriormente, se decidió utilizar las plataformas de internet: GeneNetwork, Ensembl, Pro-Coffee y Lasagna, para caracterizar el promotor del gen *Fndc5* *in silico*. Se encontró que existen posibles sitios de unión a los factores de transcripción: Myog y Mef2a; lo cuál explica el perfil de expresión del gen *Fndc5* durante la miogénesis. Para demostrar que los posibles sitios de unión son transcripcionalmente activos, se clonaron tres segmentos de distinta longitud del promotor del gen *Fndc5* en un plásmido que contiene el gen reportero de luciferasa. Se transfectaron mioblastos de la línea celular C2C12 y se indujo diferenciación. Se encontró que sólo la región que abarca del -710 al -492 es responsable del efecto que la miogénesis tiene en la expresión del gen *Fndc5*; dentro de esta región del promotor, se encuentran dos sitios de unión a los factores de transcripción Mef2a y Myog predichos en el análisis *in silico*.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la genisteína no tiene un efecto directo en músculo esquelético, en la cantidad de proteína Fndc5 ni en la expresión del gen *Fndc5*. Por ello, pensamos que el fenotipo observado *in vivo* en el estudio previo, es consecuencia de la interacción fisiológica entre un órgano blanco de la genisteína y el músculo esquelético. No obstante, se pudo demostrar que el gen *Fndc5* tiene un perfil de expresión muy similar al de los genes marcadores de la diferenciación *Mef2a* y *Myog*. Finalmente, se caracterizó *in silico* y experimentalmente el promotor del gen *Fndc5*, encontrando que existe una región del promotor responsable por el perfil de expresión del gen *Fndc5* durante la miogénesis.

## INTRODUCCIÓN

**Cambios adaptativos del músculo esquelético.** Se sabe que el músculo esquelético participa en diversos procesos biológicos fundamentales para la vida en vertebrados. El movimiento voluntario dependiente de la función muscular, nos permite buscar comida, observar nuestro alrededor e interactuar con el ambiente, entre otras actividades cotidianas. La masa muscular puede llegar a abarcar el 30% del peso total del cuerpo en mujeres y alrededor de 38% en varones<sup>6</sup>. El músculo esquelético tiene un papel relevante en el metabolismo además de la capacidad motriz<sup>1</sup>; por ejemplo, en 1981 se demostró que el 85% del metabolismo de glucosa, oxidación y almacenamiento, en condiciones de hiperinsulinemia y euglicemia, ocurre en el músculo esquelético<sup>7</sup>.

La plasticidad del tejido muscular es mayor en contraste con otros tejidos. Por ejemplo, en respuesta a ejercicio físico rutinario, se observa un cambio gradual en el contenido de proteína y la capacidad metabólica del músculo esquelético. Estos cambios progresivos son consecuencia de la activación o inhibición de vías de señalización, que regulan la transcripción de genes y la traducción de proteínas que son reguladas por el ejercicio físico; si estos estímulos suceden con cierta frecuencia, los niveles basales de expresión y de traducción se ven modificados de acuerdo con la necesidad metabólica del músculo. En 2005 se publicó un artículo<sup>8</sup> en el que se reportó un análisis por microarreglos de la expresión de 7 mil genes en biopsias de músculo esquelético en humanos, antes, 3 y 48 horas después de realizar ejercicio intenso. Se encontró que la expresión de algunos genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y metabolismo de ATP fue alterada por el ejercicio físico intenso. Entre ellos se encuentran los genes que codifican para los factores de transcripción: Foxo1, PPAR $\gamma$  y Nr1h2. Así como los genes que codifican para las proteínas: IL-6R, Pdk4, Mrpl2, entre otras. En el caso de los genes mencionados anteriormente, su expresión incrementó 3 horas después de haber realizado ejercicio físico, y regresó a los niveles basales 48 horas después de la intervención. Es notable que se obtuvieron resultados similares con genes relacionados con el estrés oxidativo, el transporte de electrolitos, y la diferenciación celular. Siendo el caso contrario, la expresión de genes relacionados con apoptosis, que se vio inhibida<sup>8</sup>.

Por la naturaleza de la contracción muscular en mamíferos, el ejercicio físico demanda una gran cantidad de ATP<sup>1</sup>. Consecuentemente, los depósitos de glucógeno muscular se ven extenuados después de esta práctica. Es por ello, que el músculo incrementa el volumen, transporte y capacidad oxidativa de lípidos en la mitocondria, como se observa en los cambios en la expresión de genes relacionados con estos procesos. De esta forma, una vez que la demanda de ATP cesa, los depósitos de glucógeno se reconstituyen y la energía necesaria para restaurar las funciones del músculo debido a la extenuación proviene del catabolismo de ácidos grasos<sup>8</sup>.

En 2007 se publicó un trabajo<sup>9</sup>, en el que se cuantificó la expresión de varios genes relacionados con el recambio de proteínas y la inflamación, en un grupo de sujetos sanos que practicaba rutinariamente ejercicio anaeróbico, característico por el uso de músculos de contracción rápida que son principalmente glucolíticos. Se encontró que después de someter a los sujetos a ejercicio físico anaeróbico, el curso temporal de la expresión de los genes que codifican para la interleucina 6 y la interleucina 8, que han sido relacionados con la inflamación muscular, mostraron un incremento significativo de 800 veces en contraste con los niveles de expresión antes de realizar el ejercicio físico. El efecto contrario se observó al medir la expresión de Miostatina, cuya función se asocia con la inhibición del desarrollo de la masa muscular, que mostró una disminución significativa de 6 veces a las 8 horas después de realizar la actividad física<sup>9</sup>.

En conclusión, aún en personas que llevan a cabo ejercicio físico de manera rutinaria, el tejido muscular es capaz de responder al estímulo mecánico causado por el ejercicio físico. Estos cambios en la expresión génica se pueden resumir en un aumento del recambio de proteína, biogénesis mitocondrial, una disminución en la muerte celular y un incremento de la oxidación de ácidos grasos.

**La participación del músculo en la termoregulación y el gasto energético.** El músculo tiene un papel fundamental en la termoregulación del organismo, además del rol fundamental que tiene en el movimiento voluntario y metabolismo en mamíferos. Se ha observado en aves y mamíferos que la exposición aguda a bajas temperaturas causa escalofrío sistémico<sup>10</sup>. El fenómeno de escalofrío se define como temblor o

estremecimiento involuntario causado por contracciones de músculo esquelético con frecuencia de 8 a 11 Hz (ciclos por segundo) en humanos<sup>11</sup> y de 20 a 40 Hz en roedores<sup>12</sup>. Se sabe que la estructura del músculo esquelético tiene un efecto en la regulación de la temperatura en mamíferos homeotermos; por ejemplo, en 2015 se publicó un trabajo que caracterizó la relación que existe entre una mutación en la proteína titina y la termoregulación en ratones<sup>12</sup>. Se observó, que los individuos que son homocigotos para una delección de 779 pares de bases de la región N2A del gen que codifica para la titina, tienen una relación entre la temperatura ambiental y la temperatura corporal similar a la identidad (línea recta con pendiente de 1); cuando la relación que existe entre ambas temperaturas describe una línea identidad, el organismo no tiene la capacidad de regular su temperatura y depende enteramente de la temperatura ambiental. En contraste con los heterocigotos y la cepa silvestre, no importa el rango de temperatura ambiental, la temperatura corporal de estos dos grupos experimentales no bajó del rango homeostático. Con una serie de experimentos subsecuentes, el grupo de investigación logró demostrar que la delección presente en el gen que codifica para la titina, cuando el genotipo es homocigoto para esta delección, conlleva a un fenotipo que afecta la composición corporal, la frecuencia de estremecimiento, el gasto energético y la resistencia al frío<sup>12</sup>.

Además del papel que el músculo tiene en la termoregulación dependiente del estremecimiento, se ha descrito un mecanismo independiente del escalofrío en el que el músculo modula el gasto energético del tejido adiposo, capacitando al adipocito blanco para realizar termogénesis mediante un proceso llamado “browning”. En 2012, se publicó un trabajo que describe la regulación que ejerce el músculo esquelético en el metabolismo del tejido adiposo subcutáneo en respuesta al ejercicio físico<sup>2</sup>. Mediante un proceso endocrino el tejido muscular activa la síntesis de proteínas termogénicas en el tejido adiposo subcutáneo, lo que causa un incremento significativo en el gasto energético del adipocito, así como la prevención del desarrollo de la resistencia a la insulina relacionada con obesidad. Es notable que en roedores, la termogénesis independiente del estremecimiento se lleva a cabo en el tejido adiposo pardo, el cual se caracteriza por tener un alto contenido de mitocondrias, que tienen una gran cantidad de proteína Ucp1. Esta proteína se caracteriza por desacoplar la cadena respiratoria de la mitocondria, disipando el gradiente de protones utilizado para generar ATP. Como consecuencia se crea un ciclo fútil

en el que la mitocondria procura mantener el gradiente de protones pero este se disipa a través de Ucp1. Sin embargo, la energía almacenada en el gradiente de protones que se disipa al momento en que éstos pasan a través de Ucp1, se convierte en calor. Es por ello que la proteína Ucp1 es considerada el componente principal de la termogénesis del tejido adiposo pardo<sup>13</sup>.

La regulación descrita en 2012<sup>2</sup>, la ejerce el músculo esquelético en el tejido adiposo subcutáneo es orquestada por la mioquina irisina, cuyo precursor es codificado por el gen *Fndc5*. La proteína *Fndc5* está formada por un péptido señal en el extremo N-terminal, un dominio de fibronectina tipo III, un dominio transmembranal y un dominio C-terminal; la irisina corresponde a un fragmento del dominio de fibronectina tipo III que se escinde y modifica post traduccionalmente para dar lugar a la hormona. Se describió en el trabajo que la transcripción del gen *Fndc5*, así como la secreción de irisina al plasma sucede cuando se somete a los individuos a una rutina de ejercicio físico<sup>2</sup>. Curiosamente, el mismo fenotipo se observó en ratones transgénicos que sobre expresan la proteína *Pgc1α* específicamente en tejido muscular. *Pgc1α* es un coactivador del factor de transcripción *PPARγ*, que es responsable de regular la expresión de proteínas desacoplantes de la cadena respiratoria y termogénesis en tejido adiposo pardo<sup>14</sup>, también se ha asociado con biogénesis mitocondrial<sup>15</sup> y metabolismo oxidativo en otros tipos celulares<sup>16</sup>. Se concluye que la sobre expresión de *Pgc1α* en músculo, ya sea mediante ejercicio físico o con regulación transgénica, favorece la síntesis y secreción de irisina. Causando una reconfiguración del metabolismo del tejido adiposo blanco *in vivo*. La irisina causa el fenómeno de “browning” en el tejido adiposo blanco, característico por la sobre expresión de la proteína termogénica Ucp1, que incrementa el gasto energético del adipocito blanco generando calor.

**La miogénesis influye en la expresión del gen *Fndc5*.** La miogénesis es el proceso mediante el cual las células precursoras del músculo, también llamadas mioblastos, dan origen a una fibra muscular, también llamada miotúbulo. En la biología del desarrollo se ha observado que los factores de transcripción MyoD, Myf5, Myog y Mrf4 controlan la especificación y diferenciación del linaje muscular durante el desarrollo embrionario<sup>17</sup>. Es notable que el curso temporal de la expresión de estos factores está ligado al proceso de diferenciación que se debe llevar a cabo de acuerdo con el momento del desarrollo del

embrión. Una fibra muscular se caracteriza por formarse de un grupo de células precursoras que se fusionaron para dar origen a un sincicio. Es por ello que el mantenimiento, la hipertrofia y regeneración de una fibra muscular depende de una población de células precursoras que no se han fusionado aún, llamadas células satelitales. En adultos, las células satelitales tiene la capacidad de diferenciación característica de los mioblastos y de ellas depende que el músculo crezca y se mantenga sano a lo largo de la ontogenia del individuo<sup>18,19</sup>.

En 2014 se publicó un trabajo en el que se caracterizó la expresión de los genes *Fndc5*, *Myog* y *Pgc1a* en cultivo primario de mioblastos humanos<sup>20</sup>. Se observó que la expresión de los tres genes incrementa durante la miogénesis, con su pico de expresión a los 5 días de inducir diferenciación, alcanzando un plateau ligeramente menor al valor máximo de expresión a partir del día 8 en adelante. Esta evidencia sugiere que la síntesis de irisina depende de la diferenciación de células precursoras, que ocurre al momento de compartir uniones estrechas fusionarse para dar origen a miotúbulos durante la hiperplasia muscular.

**La nutrición tiene efectos mayores en la homeostasis.** La nutrición es fundamental para un balance energético adecuado, tiene efectos en el procesamiento, almacenamiento y utilización de la energía. Actualmente, existe un problema de salud pública a nivel mundial causado por un mal manejo de la ingesta y el gasto energético. Uno de los retos en la epidemia de obesidad, es la reincidencia de obesidad en pacientes que alcanzan su peso sano. Esto se puede evitar sólo si la ingesta calórica es igual al gasto energético, lo cual es posible si los hábitos alimenticios y de actividad física se mantienen por un período largo de tiempo. Es notable que el cambio en la forma de vida es mayor cuando un individuo quiere mantener su peso sano después de ser obeso, que un sujeto sano que no quiere desarrollar obesidad sin haberla padecido anteriormente<sup>21</sup>. Es por ello que los cambios adaptativos que causa la obesidad, facilitan la reincidencia del sujeto en contraste con un individuo que no ha sido obeso nunca.

Los compuestos bioactivos son componentes de la dieta que se han estudiado por las propiedades que poseen de modular el metabolismo. La genisteína es una isoflavona presente en la dieta rica en soya, pertenece al grupo de los polifenoles que son característicos por su actividad antioxidante. En 2003 se publicó un trabajo que describió el

efecto de la genisteína en la adipogénesis y la osteogénesis. Se encontró que a dosis menores a  $1\mu\text{M}$  la genisteína actúa como estrógeno, estimulando la osteogénesis e inhibiendo la adipogénesis. Sin embargo, cuando la dosis de genisteína era mayor a  $1\mu\text{M}$ , el efecto observado fue contrario, aumentaba la actividad transcripcional de PPAR $\gamma$  induciendo adipogénesis y se inhibe el efecto osteogénico observado a una concentración menor de genisteína<sup>22</sup>.

En 2014 se publicó un trabajo en el que se observa que aumenta la fosforilación de AMPK y ACC, en ratas Zucker fa/fa alimentadas con una dieta rica en soya; lo cual disminuyó la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos y aumentó la expresión de genes relacionados con la termogénesis<sup>5</sup>. También, se demostró que en cultivo de miotúbulos derivados de la línea celular C2C12, la genisteína aumenta la expresión del gen *Pgc1 $\alpha$* , que se asocia con un incremento en la actividad de los factores de transcripción de la familia PPAR. Curiosamente, se observó que se atenua el efecto de la genisteína al incubar las células con un inhibidor específico de PPAR $\delta$ .

El estudio de los compuestos bioactivos tiene aplicaciones terapéuticas complementarias que ayudan a combatir enfermedades como la obesidad. Si comprendemos el mecanismo mediante el cual estos compuestos tiene la capacidad de modular el metabolismo, se puede hacer una recomendación de la ingesta, frecuencia y seguridad de su uso para mejorar la calidad de vida

**La bioinformática da oportunidad de robustecer una hipótesis.** La bioinformática representa un área de estudio de la biología que nos permite procesar información con el poder de una computadora. Actualmente, se depositan en bases de datos grandes cantidades de información obtenida de la colaboración de grupos de investigación en todo el mundo. Proyectos como el COSMIC<sup>23</sup> y ENCODE<sup>24</sup>, han permitido que se identifiquen interacciones que no se habrían predicho sin el análisis de información masiva que permite la bioinformática. Algunas de las aplicaciones directas que tiene la bioinformática son: predicción de la estructura tridimensional de las proteínas, predicción de las interacciones proteína-proteína que hay en un complejo proteico, análisis de la transcriptómica obtenida en muestras de pacientes sanos o enfermos, y predicción de sitios de unión a factores de transcripción en un locus que no haya sido caracterizado experimentalmente.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

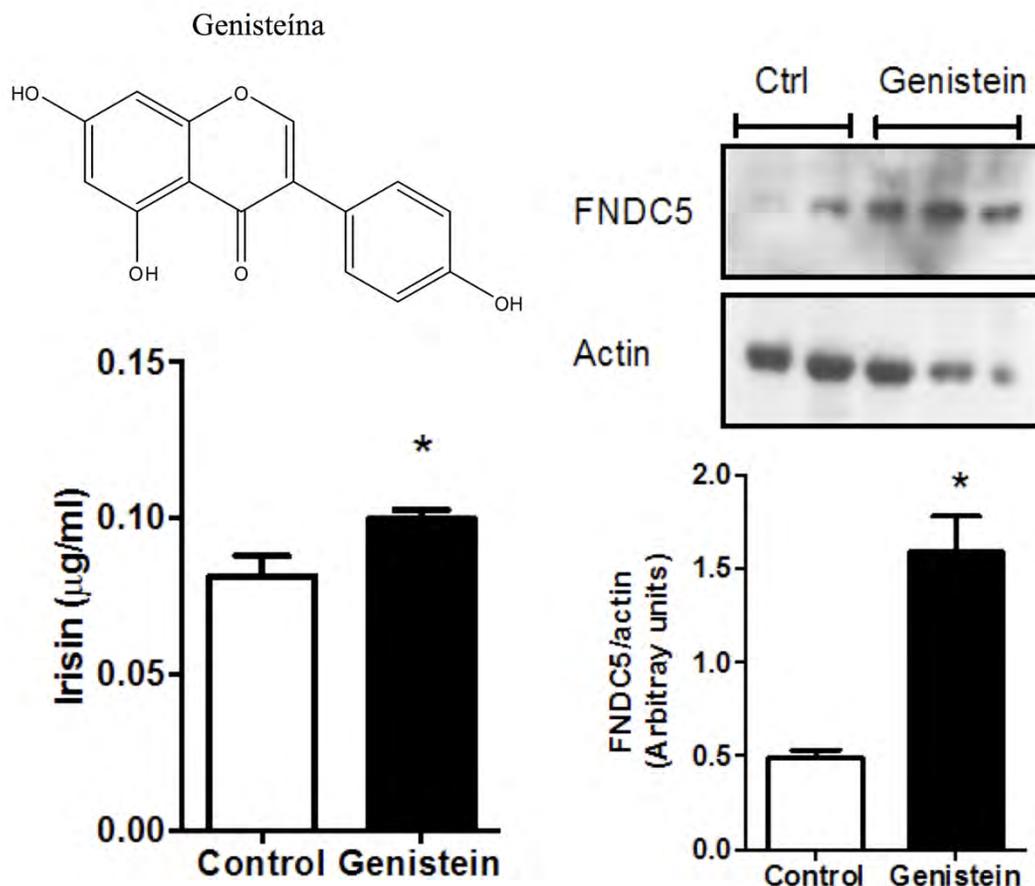
El proyecto de investigación deriva de una observación experimental del laboratorio hecha hace tres años. En ratones alimentados con la dieta AIN-93G<sup>25</sup>, se dio tratamiento con y sin genisteína suplementada en la dieta. Se observó que los ratones que ingirieron genisteína, tenían niveles más altos de irisina en plasma con respecto a los que no ingirieron genisteína; también, se observó mayor cantidad de proteína Fndc5 en lisados de músculo esquelético cuando los animales ingirieron genisteína en contraste con los controles, ver figura 1. Al mismo tiempo que se hicieron estas observaciones, existía evidencia de que la genisteína podría activar vías de señalización en el músculo esquelético responsables del fenotipo observado. Consecuentemente, pensamos que el músculo esquelético podría ser un órgano blanco en el que la genisteína tiene efecto en el ratón.

La pregunta que derivó de estas reflexiones fue: ¿la genisteína tiene la capacidad de inducir la síntesis de Fndc5 en miotúbulos? Para ello decidimos utilizar la línea celular C2C12, que es un modelo bien establecido de miotúbulos *in vitro*. También, nos interesó conocer el mecanismo de regulación de la expresión del gen *Fndc5*, para lo que decidimos utilizar una serie de herramientas bioinformáticas, así como el gen reportero de luciferasa para caracterizar los elementos de respuesta del promotor.

La importancia del proyecto de investigación radica en el problema que causa la epidemia de obesidad que afrontamos actualmente. Si entendemos la forma en que la síntesis de Fndc5 es regulada en el músculo esquelético, sobre todo si ésta es inducida por estímulos con genisteína, se podrá incrementar el gasto energético mediante una intervención nutricional. Es evidente que el ejercicio físico tiene los efectos deseados, pero pedirle a un paciente con obesidad mórbida que aumente su actividad física puede favorecer un desgaste óseo no deseado por su alto índice de masa corporal. Es por ello que la intervención nutricional es un mecanismo deseable para condicionar el metabolismo de dichos individuos, y una vez que su peso disminuya, pedirles que aumenten su actividad física para alcanzar niveles sanos de composición corporal.

La aplicación de la ciencia básica es una necesidad científica en instituciones públicas. La caracterización de la señalización mediada por irisina genera expectativas por los efectos

benéficos que tiene en el metabolismo del tejido adiposo, sobre todo en el contexto actual de una epidemia de obesidad a nivel mundial.



Palacios-González, B. unpublished

**Figura 1.** Se observa en el extremo superior izquierdo la estructura de la genisteína. En el panel inferior izquierdo se muestra la concentración de irisina en plasma en ratones alimentados con dieta control exclusivamente, y alimentados con dieta control suplementada con genisteína. En el panel de la derecha se observa la cantidad de proteína Fndc5 determinada mediante Western blot en lisados de músculo esquelético de las dos condiciones experimentales mencionadas anteriormente.

## OBJETIVOS GENERALES

- Determinar el efecto de la genisteína sobre la síntesis de la proteína *Fndc5* y la expresión del gen *Fndc5* en miotúbulos derivados de la línea celular C2C12
- Caracterizar la región reguladora del promotor del gen *Fndc5*

## OBJETIVOS PARTICULARES

- En ensayos de Western Blot, determinar la cantidad de proteína de *Fndc5* en cultivos de miotúbulos derivados de la línea celular C2C12 estimulados con genisteína
- Mediante RT-qPCR, determinar el nivel de expresión de los marcadores de diferenciación *Myog*, *Mef2a* y *Casq2* en mioblastos y miotúbulos de la línea celular C2C12
- Mediante RT-qPCR, determinar si los niveles de expresión del gen *Fndc5* varían en respuesta a estímulos de genisteína en miotúbulos derivados de la línea celular C2C12
- Utilizando una serie de herramientas bioinformáticas, caracterizar la región promotora del gen *Fndc5*
- De acuerdo con el protocolo Fast Cloning<sup>26</sup>, construir tres plásmidos con distintas longitudes del promotor del gen *Fndc5* seguidas del gen reportero de luciferasa
- Transfectar en mioblastos los plásmidos construidos para medir el gen reportero después de la diferenciación celular a miotúbulos

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo celular.** Se adquirió la línea celular C2C12 de la compañía ATCC (CRL-1772 ATCC Manassas VA), en el certificado de análisis del producto se establece que el pase de la línea celular es desconocido por lo que todos los pases con los que se trabajó fueron relativos a las condiciones en que se recibió el vial de ATCC.

Antes de cualquier ensayo, se crecieron las células en frascos T75, sembrando 200 mil células por frasco. Se cultivaron las células por dos días con medio DMEM alto en glucosa (Gibco Life Sciences) enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco Life Sciences), 1% de antibióticos antimicóticos (Carson) y 3.7g/L de bicarbonato de sodio (ATCC). Se tripsinizaron las células con 2mL de tripsina-EDTA (Carson) por cada frasco T75 durante 5 minutos, se inactivó la proteólisis con 20mL de medio de cultivo, que contiene inhibidores de tripsina. Se centrifugaron las células a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de cultivo fresco y se determinó la cantidad de células en suspensión.

Para realizar ensayos, se sembraron 300 mil células por pozo en placas de 6 pozos (Corning). El cultivo celular en placa se llevó a cabo en dos fases: la fase de proliferación y la fase de diferenciación. La fase de proliferación abarca los primeros dos días del cultivo en los que se incubaron las células con medio DMEM alto en glucosa (Gibco Life Sciences) enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco Life Sciences), 1% de antibióticos antimicóticos (Carson) y 3.7g/L de bicarbonato de sodio (ATCC). La fase de diferenciación abarca de los días 2 al 6 después de la siembra, durante este período se cultivaron las placas con medio DMEM alto en glucosa (Gibco Life Sciences) enriquecido con 2% de Suero de Caballo (ATCC), 1% de antibióticos antimicóticos (Carson) y 3.7g/L de bicarbonato de sodio (ATCC).

**Conteo de células.** El número de células se determinó mediante hematocitómetro y tinción con azul de tripano. Se tomó una alícuota de 10 $\mu$ L de las células y se mezcló con 10 $\mu$ L de azul de tripano y 80 $\mu$ L de PBS. Se colocaron 10 $\mu$ L de la mezcla en cada cara del hematocitómetro, y se contó el número de células de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Tratamientos con genisteína.** La genisteína (Sigma) se administró al medio de cultivo en una fracción de una centésima del volumen del medio para atenuar los efectos del vehículo sobre el estudio. Como vehículo se utilizó etanol absoluto de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**Extracción de proteína total.** Para coleccionar las muestras de proteína se lavó cada pozo dos veces con PBS frío, se utilizó un gendarme (Corning) para levantar la monocapa de células y se recolectaron las monocapas de cada condición experimental en un tubo eppendorff de 1.5mL, al menos fueron 3 pozos independientes. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante, se congeló el pellet con nitrógeno líquido y se almacenaron las muestras a -70°C hasta su procesamiento posterior, debido a la naturaleza de los experimentos realizados se continuó con la extracción una vez que todas las muestras experimentales fueron tomadas. La extracción de proteína se llevó a cabo utilizando buffer RIPA, que contiene 150 mM cloruro de sodio, 1.0% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS y 50 mM Tris base con un pH de 8.0. Se resuspendió el pellet en 100µL de buffer RIPA con inhibidores de proteasas (cOmplete Mini Roche) y de fosfatasas (2mM fluoruro de sodio, 1mM ortovanadato de sodio), se incubaron las muestras durante 45 minutos a 4°C en una gradilla giratoria, se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteína en cada una de las muestras, se hicieron diluciones adecuadas de acuerdo a la cantidad de proteína que se planeó cargar en los geles de Western blot, se alicuotaron las muestras y se almacenaron a -70°C.

**Cuantificación de proteína.** Se hizo ensayo de Lowry-Bradford para determinar la cantidad de proteína en los lisados celulares de acuerdo con las especificaciones del kit para la cuantificación de proteína de Bio-Rad (RC DC Protein Assay Kit II Cat 500-0122). Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro xMark (BioRad) a 750nm de longitud de onda y se descargaron las lecturas crudas para análisis en hoja de cálculo (LibreOffice). En la hoja de cálculo, se sustrajo el valor promedio de tres pozos con reactivos pero sin proteína. En cada placa hecha para la medición de Lowry-Bradford se incluyó por duplicado una curva estándar de proteína en la que se midió la absorbancia en muestras donde la

concentración de proteína fue: 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/mL utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (Roche Applied Science), se hizo regresión lineal de las mediciones de la curva estándar, considerando que la regresión tuviera un coeficiente de determinación mayor a 0.98. Finalmente, se extrapola la cantidad de proteína de las muestras experimentales con base en la regresión lineal. Si la medición de las muestras fue mayor al valor máximo de la curva estándar, se diluyó una alícuota de la muestra experimental para poder hacer la medición dentro del rango de sensibilidad óptima de la curva estándar.

**Western Blot.** En todos los experimentos se utilizaron geles de poliacrilamida al 10%. Primero, se mezclaron las muestras experimentales 1:1 con buffer Laemmli (Bio-Rad) 5%  $\beta$ -mercaptoetanol y se desnaturalizaron las muestras por 5 minutos a 80°C. Luego, se cargaron los geles en cámaras de electroforesis con buffer de corrida (3g/L de Tris base, 14.48g/L de glicina y 1g/L de SDS), se corrieron los geles a 70V por 30 minutos para crear un frente de corrida alineado y se corrieron a 100V hasta por 120 minutos para separar las proteínas. Se transfirieron los geles a membranas de PVDF (Millipore) mediante transferencia húmeda de dos formas diferentes, a 100V por una hora utilizando bloques de enfriamiento o a 20V durante 12 horas dentro de una cámara de refrigeración a 4°C. Las membranas se tiñeron reversiblemente con Ponceau S para confirmar que la transferencia haya sido exitosa. Se cortaron las membranas mientras estaban teñidas de acuerdo a lo necesario para revelar contra la proteína de interés. Se lavaron las membranas con TBS + 1% tween (TBS-t) para desteñirlas y se bloquearon con 5% de leche (Bio-Rad) o 5% BSA (Roche Applied Science) en TBS-t. Se lavaron las membranas tres veces por diez minutos con TBS-t y se incubaron por 16 horas con anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a 4°C. Se usaron los anticuerpos anti-Fndc5 policlonal (ab93373, Abcam) a una dilución 1:500, anti-Fndc5 monoclonal (ab174833, Abcam) a una dilución 1:1000, anti-PGC1 $\alpha$  policlonal (ab54481, Abcam) a una dilución 1:1000 y anti- $\gamma$ Tubulina policlonal (sc-7396, Santa Cruz) a una dilución 1:1000. Se lavaron las membranas tres veces por diez minutos con TBS-t y se incubaron por una hora con anticuerpo secundario anti-goat o anti-rabbit (Santa Cruz) diluido 1:3500 en solución de bloqueo a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas tres veces por diez minutos con TBS-t y se bañaron las membranas

con solución de revelado Immobilion Western (Millipore). Se utilizó el equipo ChemiDoc (BioRad) para obtener una serie de imágenes a distintos tiempos de exposición de cada membrana y se analizaron utilizando el software ImageLab (BioRad) para determinar la densitometría de las bandas.

**Extracción de RNA.** Se hizo extracción de RNA utilizando el reactivo TriPure Isolation Reagent de Roche Applied Science de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1mL del reactivo de extracción por cada pozo de cultivo celular y el pellet se resuspendió en 30 $\mu$ L de agua grado biología molecular (Sigma). Se cuantificó la cantidad de RNA en nanodrop.

**RT-PCR.** Se sintetizó cDNA a partir de RNA mensajero utilizando 3 $\mu$ g de RNA total. Se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Adicionalmente, se añadieron 20U de inhibidor recombinante de ribonucleasas Rnasin (Promega).

**qPCR.** Se hizo qPCR utilizando LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se hizo una reacción de 10 $\mu$ L en placas de 96 pozos que se corrieron en un LightCycler 480 (Roche Applied Science) de acuerdo con el programa templado del fabricante. El valor de  $C_p$ , que significa punto de cruce (Crossing point), se define como el número de ciclo que corresponde al primer máximo matemático de la segunda derivada de la función sigmoide, interpolada a partir de las mediciones que el aparato realiza en cada ciclo de PCR. En un experimento normal de qPCR, nos interesa el valor del ciclo en que la interpolación de los datos a la función sigmoide sobrepasa en umbral arbitrario. El umbral es un valor arbitrario de fluorescencia en el que la segunda derivada de la función interpolada presenta un primer máximo local.

**Diseño de oligonucleótidos.** Los oligonucleótidos para medir la expresión de los genes de nuestro interés fueron diseñados con la herramienta Primer-BLAST, que es una plataforma en línea que acopla las herramientas Primer3 y BLAST. Primer, se introdujo el número de acceso del gen de acuerdo a la base de datos RefSeq, se fijó un rango de 150 a 300 bp de

longitud de amplicón, con  $T_m$  de los oligonucleótidos de  $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y que al menos uno de los oligonucleótidos abarque una unión entre dos exones de manera que no reconozca el DNA genómico ni a los transcritos que no hayan sido procesados completamente. Luego se pidió que hiciera una búsqueda en el genoma del ratón para determinar que el par de oligonucleótidos sea específico para el transcrito del gen que nos interesa. Finalmente se obtuvieron los siguientes oligonucleótidos:

<b>Gen</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>Fndc5</i>	NM_027402	5'-atgaaggagatggggaggaa-3'	5'-gcggcagaagagagctataaca-3'
<i>Myog</i>	NM_031189	5'-ccagtacattgagcgcctac-3'	5'-acgatggacgtaagggagtg-3'
<i>Mef2a</i>	NM_001033713	5'-gagcctcatgaaagcaggac-3'	5'-gaagtctgaggtggcaagc-3'
<i>Casq2</i>	NM_009814	5'-aggcagctgaacactccag-3'	5'-gacgtagggtgggtcttga-3'
<i>Rer1</i>	NM_026395	5'-accggagctgcgagttaca -3'	5'-ggctgtgtaggggtagact -3'
<i>Rpl27</i>	NM_011289	5'-tgttcagggaccagctttg-3'	5'-ccctgtctgtatcgcctc-3'
<i>Rpl41</i>	NM_018860	5'-tctcgtcttagcgcctct-3'	5'-ttcagcctgcgcattctt-3'
<i>Rplp0</i>	NM_007475	5'-agattcgggatatgctgttg-3'	5'-aaagcctggaagaaggaggtc-3'
<i>Tbp</i>	NM_013684	5'-aagagagccacggacaactg-3'	5'-actgaactgctggtgggtca-3'

**Construcción de plásmidos.** Se hicieron tres plásmidos a partir del plásmido Pgl4.10 (Promega) utilizando el protocolo de FastCloning<sup>26</sup>. Se insertaron tres longitudes distintas del promotor del gen *Fndc5* en la región que precede al gen de luciferasa del plásmido.

**Secuenciación de los insertos.** Se secuenciaron los plásmidos construidos para confirmar que la posición y la secuencia de los promotres insertados fuera la correcta. Se hizo PCR con un primer para secuenciación utilizando el kit GenomeLab DTCS (Beckman Coulter). Se hizo electroforesis capilar para determinar la secuencia del PCR utilizando un CEQ 8800 (Beckman Coulter) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

**Transfección de mioblastos.** Se transfectaron mioblastos un día después de la siembra utilizando Lipofectamine LTX (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se transfectaron 500ng de plásmido experimental y 100ng de control de

transfección renilla por pozo. Se indujo diferenciación a miotúbulo por cuatro días antes de medir la actividad de luciferasa.

**Ensayo dual de luciferasa y renilla.** Se utilizó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se midieron 20 $\mu$ L de lisado celular en un luminómetro GloMax 20/20 (Turner BioSystems) de acuerdo con las especificaciones del kit mencionado anteriormente.

**Análisis estadístico.** Se utilizó el análisis estadístico de t de student para casi todas las pruebas estadísticas, tomando como punto de corte  $p \leq 0.05$ . Adicionalmente, se hicieron regresiones lineales para el análisis de rango dinámico al momento de hacer qPCR y para la cuantificación de proteína. También, se hicieron correlaciones de Pearson para determinar la relación que existe entre la expresión de dos genes.

## RESULTADOS

**Análisis de la expresión génica.** Se decidió medir la expresión del gen *Fndc5*, para determinar si existe algún efecto de la genisteína a nivel transcripcional. Para medir la expresión, se utilizó RT-qPCR descrito en Materiales y Métodos. Primero, se hizo un experimento de rango dinámico para estandarizar las condiciones ideales de RT-qPCR antes de analizar las muestras experimentales. Este experimento, nos permite determinar las condiciones de reacción de qPCR óptimas para cada pareja de oligonucleótidos en el contexto experimental de nuestro interés, que para nuestro caso son estímulos con genisteína. De esta forma, se determina la cantidad de RNA mensajero detectable por la técnica, ya que la abundancia de este ácido nucleico puede ser muy variable. También, el rango dinámico nos permite calcular experimentalmente la eficiencia de los oligonucleótidos, la cual es una variable muy sensible durante la qPCR.

El rango dinámico se llevó a cabo haciendo una poza de cDNAs representativo de células diferenciadas, indiferenciadas y estimuladas con genisteína. Es notable que el experimento se debe realizar con una poza de todos los tratamientos experimentales, ya que de lo contrario el resultado podría estar sesgado hacia un tratamiento experimental, no siendo útil para comparar entre tratamientos. Se hicieron 11 diluciones seriadas 1:1 de cDNA en agua grado biología molecular; posteriormente, se hizo qPCR en cada dilución por duplicado de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Como ha sido descrito antes<sup>27</sup>, teóricamente en cada ciclo de PCR que tiene lugar, la cantidad de moléculas de DNA se duplica con respecto al ciclo anterior. De ser así, las diluciones seriadas que son doblemente diluidas con respecto a la dilución anterior, tendrá valores de  $C_p$  consecutivos (para una definición de  $C_p$  consulte Materiales y Métodos). En este caso ideal, si analizamos la relación que existe entre el  $C_p$  y el logaritmo de la concentración inicial de DNA, se observa que los datos describen una línea recta con pendiente -3.3219, y eficiencia de 2, donde la eficiencia de la reacción de PCR está descrita por la ecuación:

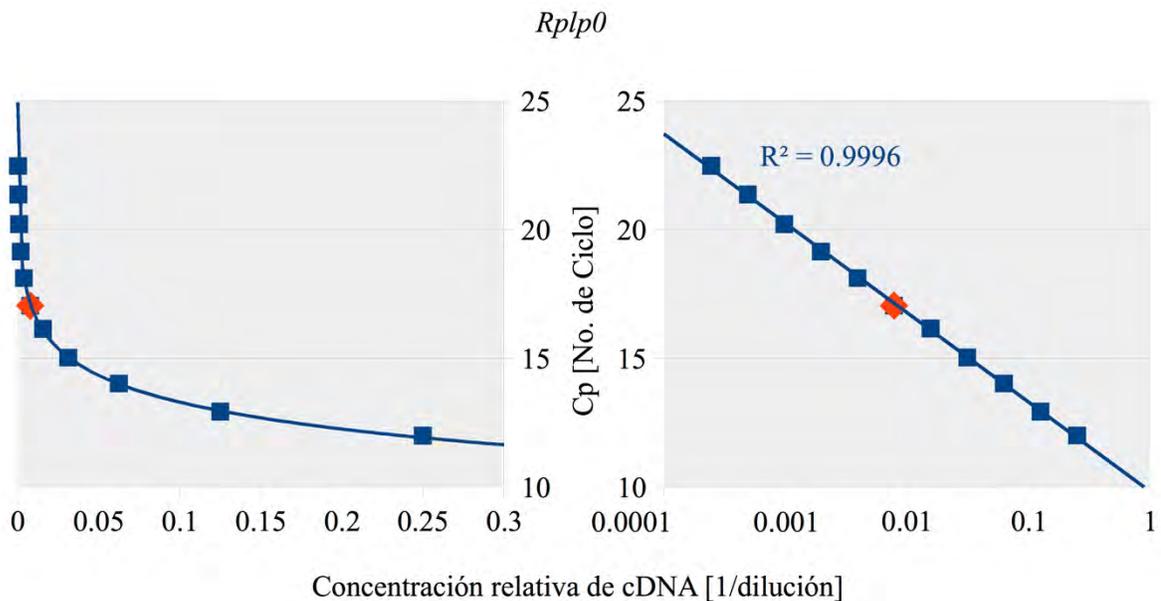
$$E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$$

Esto significa que por cada ciclo que ocurre en la reacción de PCR, la cantidad de DNA se duplica. Es notable que la eficiencia de la reacción de PCR varía de acuerdo a las

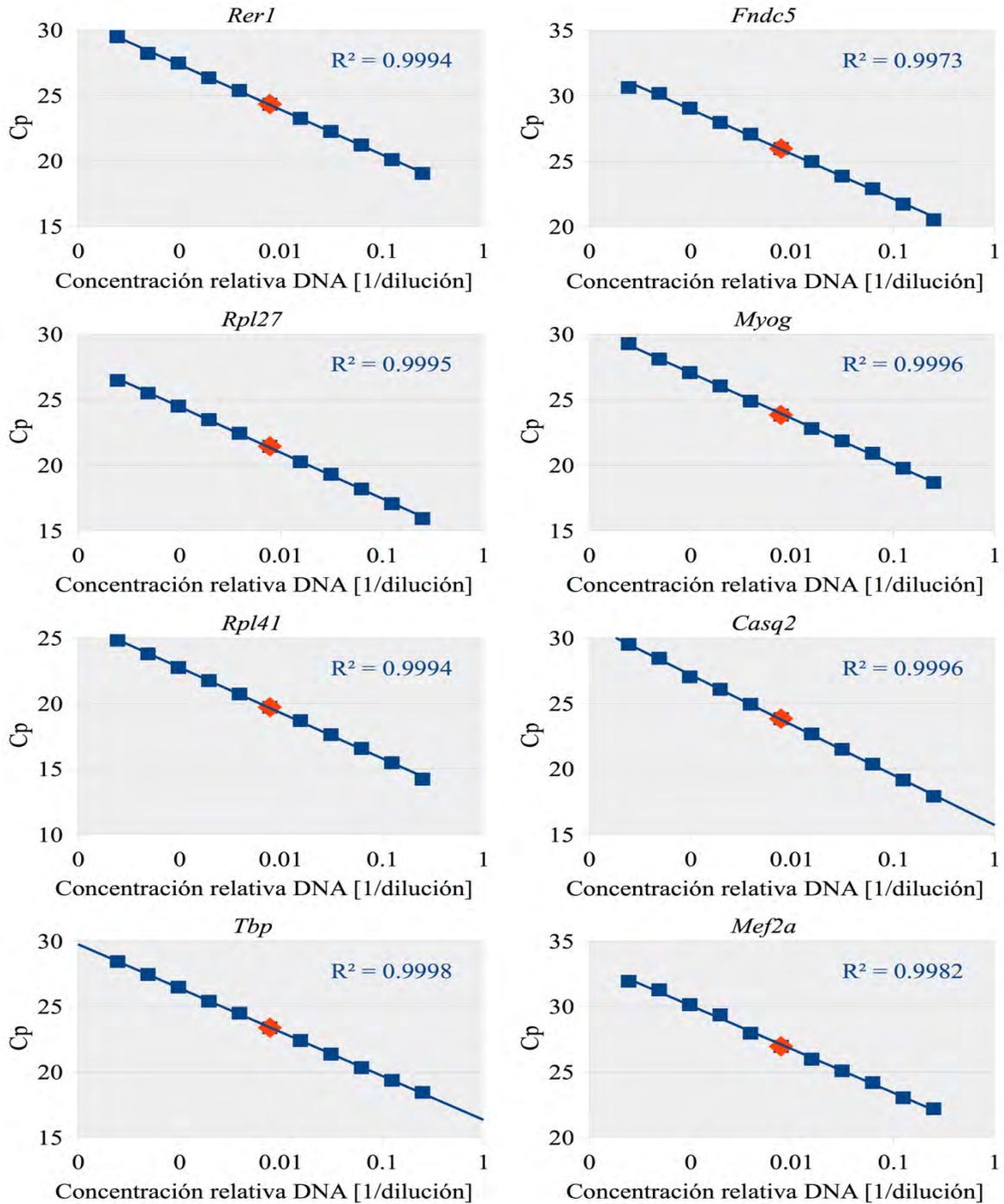
características fisicoquímicas de los oligonucleótidos, por lo que es necesario realizar el análisis de rango dinámico por cada par de oligonucleótidos que se pretende utilizar.

En la figura 2, se muestra la distribución de los datos para el rango dinámico del gen constitutivo *Rplp0*. Las abscisas corresponden a la concentración relativa de cDNA, y en las ordenadas se muestra el valor de  $C_p$ . En el panel de la izquierda se muestran los datos en escala lineal, donde se observa que los valores de  $C_p$  describen una función logarítmica con respecto a la cantidad inicial de cDNA. En el panel de la derecha se muestran los datos con escala logarítmica en las abscisas, lo que transforma esta relación logarítmica en lineal para poder realizar el análisis de rango dinámico descrito como ha sido publicado anteriormente<sup>27</sup>. Se observó para el caso de *Rplp0* que los valores del centro del rango dinámico se ajustan a los valores teóricos ideales, por lo que se decidió utilizar la dilución 1:127 (punto naranja) para hacer la medición individual de qPCR para cada muestra en los distintos tratamientos. Se hizo el mismo análisis para los genes experimentales *Fndc5*, *Myog*, *Casq2* y *Mef2a*; y los genes estructurales *Rer1*, *Rpl27*, *Rpl41* y *Tbp*. En todos los casos se observó un comportamiento similar al de *Rplp0*, como se muestra en la figura 3. Consecuentemente, se decidió utilizar la misma dilución en todos los casos. Antes de proceder a la medición de las muestras experimentales, se realizó un análisis de “Tm Calling” en los rangos dinámicos. Brevemente, este análisis consiste en tomar mediciones de fluorescencia mientras se aumenta la temperatura una vez que haya terminado la reacción de qPCR. En el laboratorio utilizamos SYBR green para medir el incremento de DNA conforme sucede la reacción de PCR. Es notable mencionar que SYBR Green es una molécula fluorescente con un pico de emisión a 533 nm y un pico de absorción a 483 nm; se intercala en el DNA de manera específica por su interacción con el surco menor del DNA. Por la interacción con la estructura del DNA de doble cadena, el SYBR green no detecta un tipo de molécula específica durante la reacción de PCR. Para demostrar que durante la reacción de PCR sólo se sintetizó un tipo de molécula de DNA, se analiza la desnaturalización del producto de la reacción una vez que ésta terminó. Del número de moléculas total sintetizado al final de la reacción se obtendrá un valor de fluorescencia; a medida que se aumenta la temperatura, de acuerdo a la secuencia de nucleótidos de las moléculas sintetizadas, éstas se desnaturalizan con una cinética en particular. En otras palabras, conforme aumentamos la temperatura, la fluorescencia de la muestra decae hasta que la

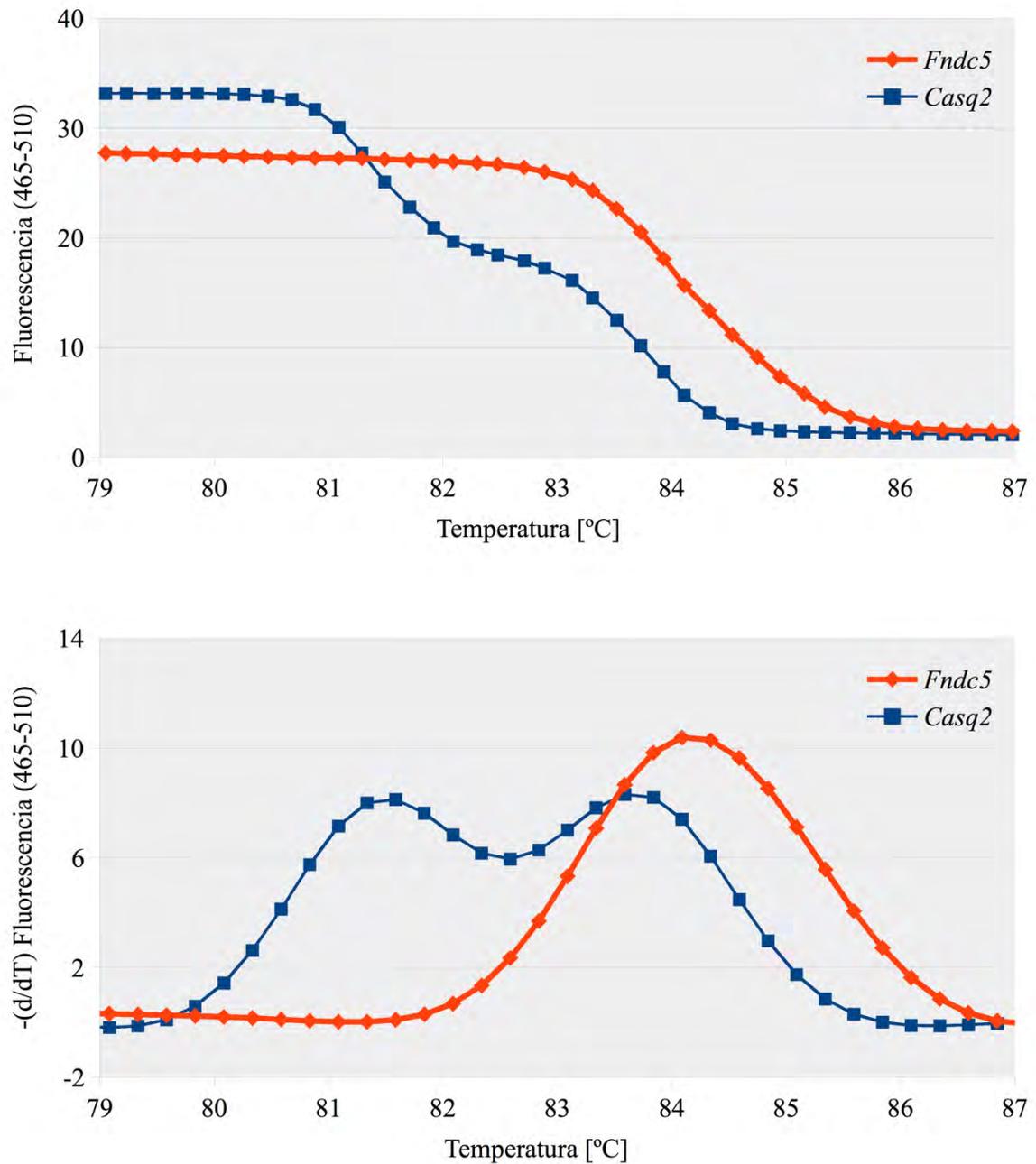
totalidad de moléculas de DNA se haya desnaturalizado. En caso de que la reacción de PCR haya sintetizado más de un tipo de moléculas, se observa que la cinética de desnaturalización de la muestra es multimodal. La figura 4 muestra en el panel superior dos reacciones de PCR que fueron sujetas al análisis de “Tm Calling”, en las abscisas se observa la temperatura y en las ordenadas se muestra en unidades arbitrarias la luz de 533 nm emitida por la muestra tras ser iluminada con luz de 483 nm. Se observa en el caso del gen *Fndc5* que la forma en que decae la fluorescencia con forme aumenta la temperatura es unimodal, lo cual no sucede en el caso de *Casq2*, que claramente es bimodal. Para visualizar los datos del experimento de una forma más intuitiva, el software de análisis transforma las mediciones de fluorescencia a la primera derivada con respecto al tiempo. Esta transformación matemática representa la pendiente de la recta tangente a la función que describe la fluorescencia en función de la temperatura en un punto dado de temperatura. Se observa que en el caso de *Fndc5* el comportamiento es unimodal, lo que significa que durante la reacción de amplificación, sólo se sintetizó un tipo de molécula de DNA. Lo cual no es el caso de *Casq2*, donde observamos que el comportamiento es bimodal, esto significa que hay al menos dos tipos de moléculas de DNA que fueron amplificadas en la



**Figura 2.** Se midió por RT-qPCR el rango dinámico del gen estructural *Rplp0* en una serie de diluciones de una poza representativa de mioblastos, miotúbulos y células estimuladas con genisteína. En el panel izquierdo se muestra la relación que hay entre el Cp y la concentración inicial de cDNA en escala lineal, mientras que en el panel derecho se muestra esta relación en escala semilogarítmica. Se calcula la regresión lineal así como el coeficiente de determinación en el panel de la derecha.



**Figura 3.** Se midió por RT-qPCR el rango dinámico de los genes estructurales *Rer1*, *Rpl27*, *Rpl41* y *Tbp*; y de los genes experimentales *Fndc5*, *Myog*, *Casq2* y *Mef2a* en una serie de diluciones de una poza representativa de mioblastos, miotúbulos y células estimuladas con genisteína. Se muestra la relación del Cp y la concentración inicial de cDNA en escala semilogarítmica. Se calculó la regresión lineal y el coeficiente de determinación en todos los casos.

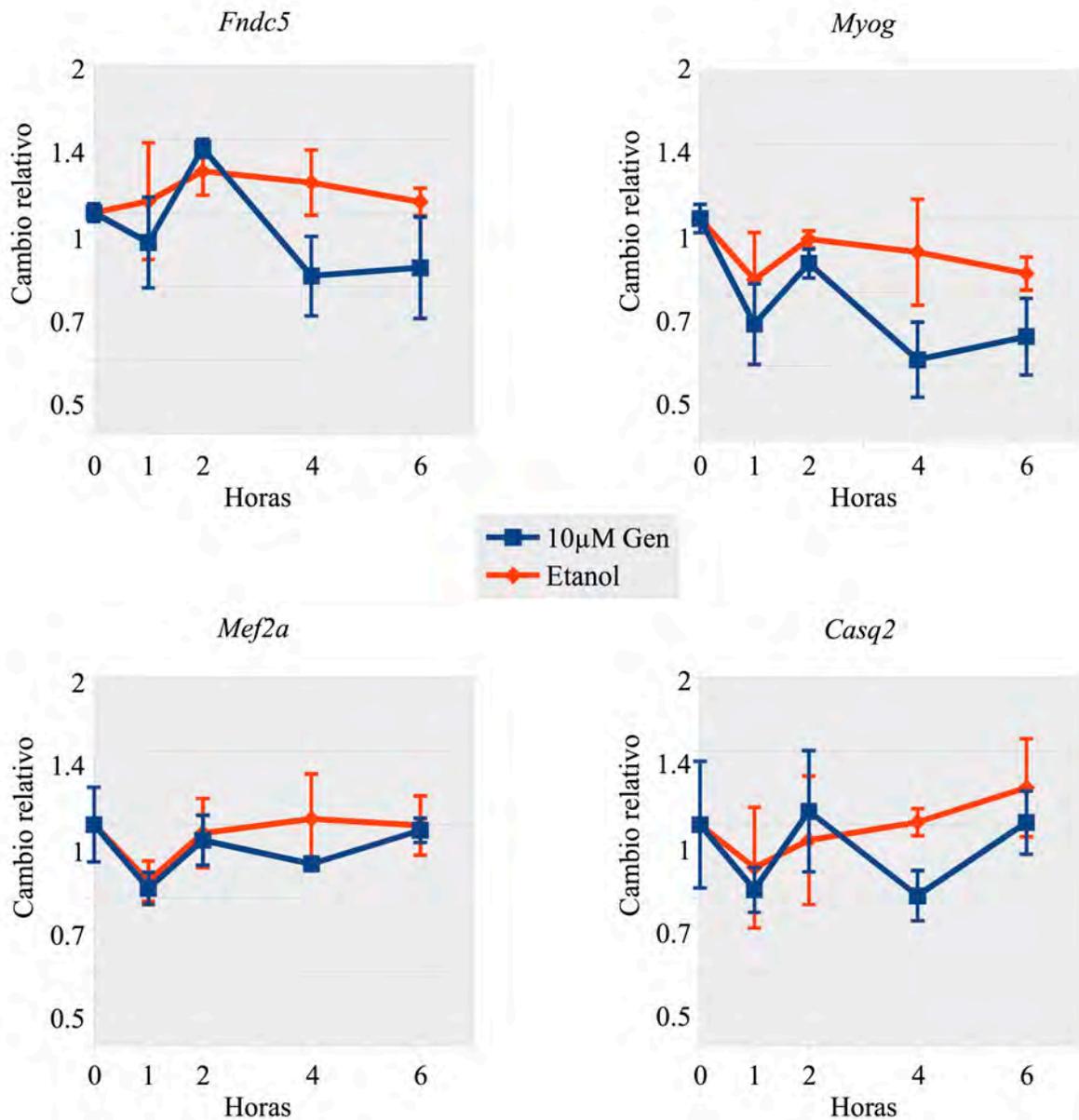
Análisis de Tm calling para *Casq2* y *Fndc5*

**Figura 4.** Se hizo análisis de “Tm Calling” en dos muestras amplificadas en una reacción de qPCR utilizando los primer diseñados para medir la expresión de los *Fndc5* y *Casq2*. En el panel superior se observa cómo decae la fluorescencia de las muestras al ser sometidas a un gradiente de temperatura. En el panel inferior de muestra la primera derivada con respecto a la temperatura de los datos del panel superior.

reacción de PCR, lo que nos da un valor de  $C_p$  que no se puede utilizar para proceder con el análisis de la expresión. Es notable que la medición de *Casq2* que se ejemplifica, se hizo en una muestra muy diluida por lo que la síntesis de una molécula inespecífica se puede deber a una baja afinidad de los oligonucleótidos por sí mismos o por otro cDNA. Cuando se midieron las muestras utilizando la concentración de cDNA óptima determinada por el rango dinámico de *Casq2* se observó un comportamiento unimodal en el “Tm Calling”.

**El efecto de la genisteína en la expresión de *Fndc5* es mínimo.** Se estudió el efecto de estimular células diferenciadas con  $10\mu\text{M}$  de genisteína hasta por 6 horas. Es notable mencionar que se utilizó esta concentración de genisteína de acuerdo a lo reportado en 2005 por Ullman, U.<sup>28</sup>, donde se caracterizó la farmacocinética de la ingesta oral de genisteína en humanos. De acuerdo al trabajo de Ullman y colaboradores, la concentración más alta de genisteína que se observó en plasma fue de  $6.7\mu\text{M}$  ( $1.8\mu\text{g/mL}$  de plasma). Esta evidencia indica que las concentraciones utilizadas en el presente estudio se encuentran en niveles ligeramente superiores a los niveles máximos fisiológicos posibles en humanos. Se observa en la figura 5, que el gen *Fndc5* muestra cambios muy sutiles en la expresión en respuesta al estímulo de genisteína. Se observa que a las 2 horas de tratamiento hay un ligero aumento del 35% con respecto al inicio del curso temporal. La evidencia sugiere que contrario a nuestra hipótesis, la genisteína no tiene efecto sobre la expresión de *Fndc5* en cultivo *in vitro* de miotúbulos. Se estudió también el efecto del tratamiento experimental sobre los marcadores de diferenciación, *Myog* se vio disminuido a lo largo del curso temporal, lo cuál sucede independientemente de la presencia de la genisteína. Nuestros resultados sugieren que el etanol *per se* tiene un efecto inhibitorio en la diferenciación celular en coincidencia con lo que se ha publicado anteriormente<sup>29</sup>. Para el caso de *Mef2a* y *Casq2* las fluctuaciones con respecto al inicio del curso temporal son mínimas haya genisteína o no.

**La genisteína tiene un efecto en la cantidad de proteína *Fndc5* y *PGC1 $\alpha$*  dos horas después de administrar el estímulo.** Se realizó un curso temporal estimulando los miotúbulos diferenciados por cuatro días con  $10\mu\text{M}$  de genisteína hasta por 48 horas. Se utilizaron tres cultivos independientes, haciendo un pozo del lisado de las tres muestras y se



**Figura 5.** Se midió la expresión de los genes *Fndc5*, *Myog*, *Mef2a* y *Casq2* en cultivos de miotúbulos estimulados con 10µM de genisteína hasta por seis horas mediante RT-qPCR. Se utilizaron los genes estructurales *Rplp0*, *Rer1* y *Tbp*. Se hicieron tres cultivos independientes y se hizo análisis de T de student para determinar diferencias significativas entre las células estimulados con genisteína y las células incubadas con el vehículo, ningún resultado fue estadísticamente diferente.

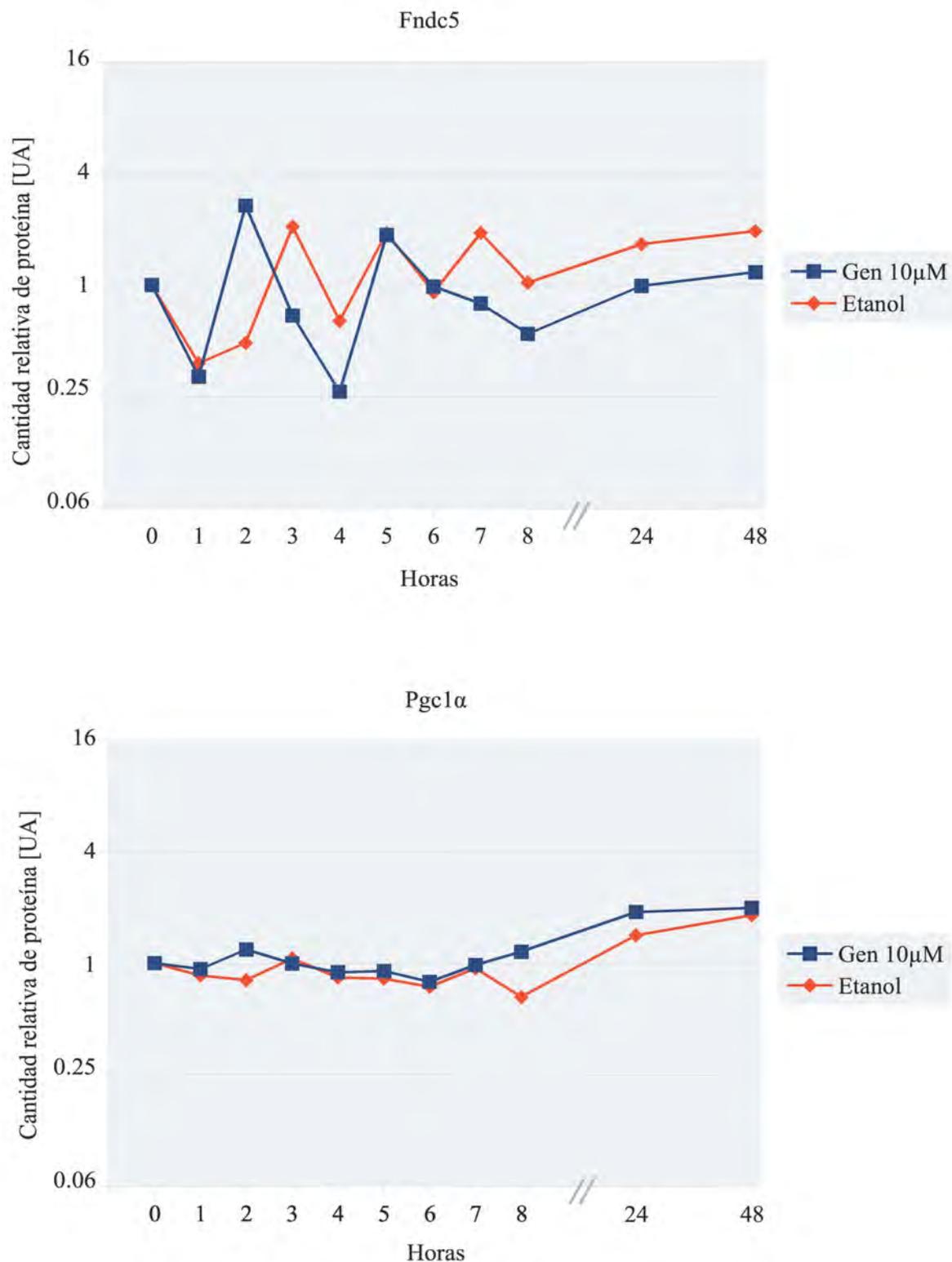
midió por Western blot la cantidad de proteína de *Fndc5*, *Pgc1α* y  $\gamma$ -Tubulina como control de carga.

En la figura 6, se observa que una hora después del tratamiento hay una disminución en la cantidad de *Fndc5* y a las 24 horas los niveles de *Fndc5* se restablecen a comparación con

el inicio del tratamiento. Es notable que el efecto 1 y 24 horas post tratamiento es el mismo entre las condiciones 10 $\mu$ M de genisteína y vehículo. Por lo que se concluye que el fenotipo observado es consecuencia de estimular las células con etanol. No obstante, es posible que la genisteína tenga un efecto sobre la cantidad de proteína Fndc5, pero es tan pequeño que las alteraciones causadas por el etanol en el cultivo lo enmascaran; también, es posible que el etanol condicione a las células de tal forma que éstas sean insensibles a la genisteína, *ergo* incapaces de responder a estímulos de genisteína.

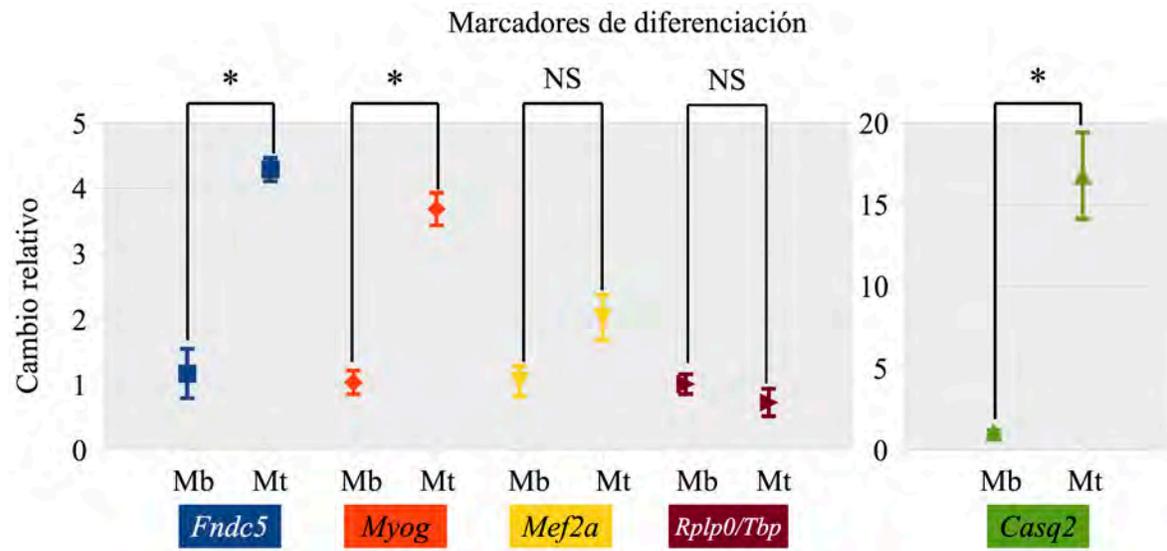
A las 2 horas, se observa una diferencia tenue entre las condiciones 10 $\mu$ M de genisteína y vehículo, ver figura 6. En concreto, la cantidad de proteína Fndc5 aumenta 2.68 veces cuando se estimula con genisteína por dos horas con respecto al inicio del tratamiento; además al mismo tiempo, el vehículo disminuye 0.49 veces con respecto al inicio del experimento. Si se hace la razón aritmética de la condición con genisteína entre el vehículo, se observa que dos horas post tratamiento, el estímulo con genisteína aumenta 5.52 veces la cantidad de proteína con respecto al vehículo. Esta evidencia sugiere que la genisteína tiene un efecto dos horas después del tratamiento; sin embargo, no es posible determinar si el efecto es estadísticamente significativo debido a la forma en que se recolectaron las muestras. Se asume que las mediciones son representativas de tres cultivos independientes, pero la variabilidad biológica no se puede medir, toda vez que se juntaron los lisados celulares en pozas.

Pgc1 $\alpha$  tiene un comportamiento que no muestra cambio a lo largo de las primeras 8 horas de tratamiento; a las 2 horas se observa un ligero incremento de 1.25 veces con respecto al inicio del tratamiento y esta medición es 1.47 veces mayor que el vehículo. No es hasta después de 24 y 48hrs que se observa un incremento de 1.9 y 2 veces respectivamente con respecto al inicio del experimento. Sin embargo, el mismo incremento se observó cuando se administra vehículo al cultivo, lo cual sugiere que el incremento observado es debido al paso del tiempo, el cuál en la línea celular C2C12 induce diferenciación celular *per se*. Este experimento sugiere que es posible que a las 2 horas de estimular con genisteína, haya un cambio en la cantidad de proteína Pgc1 $\alpha$ . No obstante, en el resto de las mediciones no existen cambios en la cantidad de proteína Pgc1 $\alpha$  cuando se estimula el cultivo de miotúbulos con 10 $\mu$ M de genisteína.



**Figura 6.** Se midió por Western blot la cantidad de proteína Fndc5, Pgc1α y  $\gamma$ -Tubulina en pozas de tres cultivos independientes de miotúbulos diferenciados por cuatro días, sin estímulo (0 horas) y durante un curso temporal de hasta 48 horas después de administrar un estímulo de 10  $\mu$ M (azul) de genisteína o etanol como vehículo (naranja). Cada muestra se corrió dos veces en geles independientes y se grafica el promedio de la densitometría de ambas corridas.

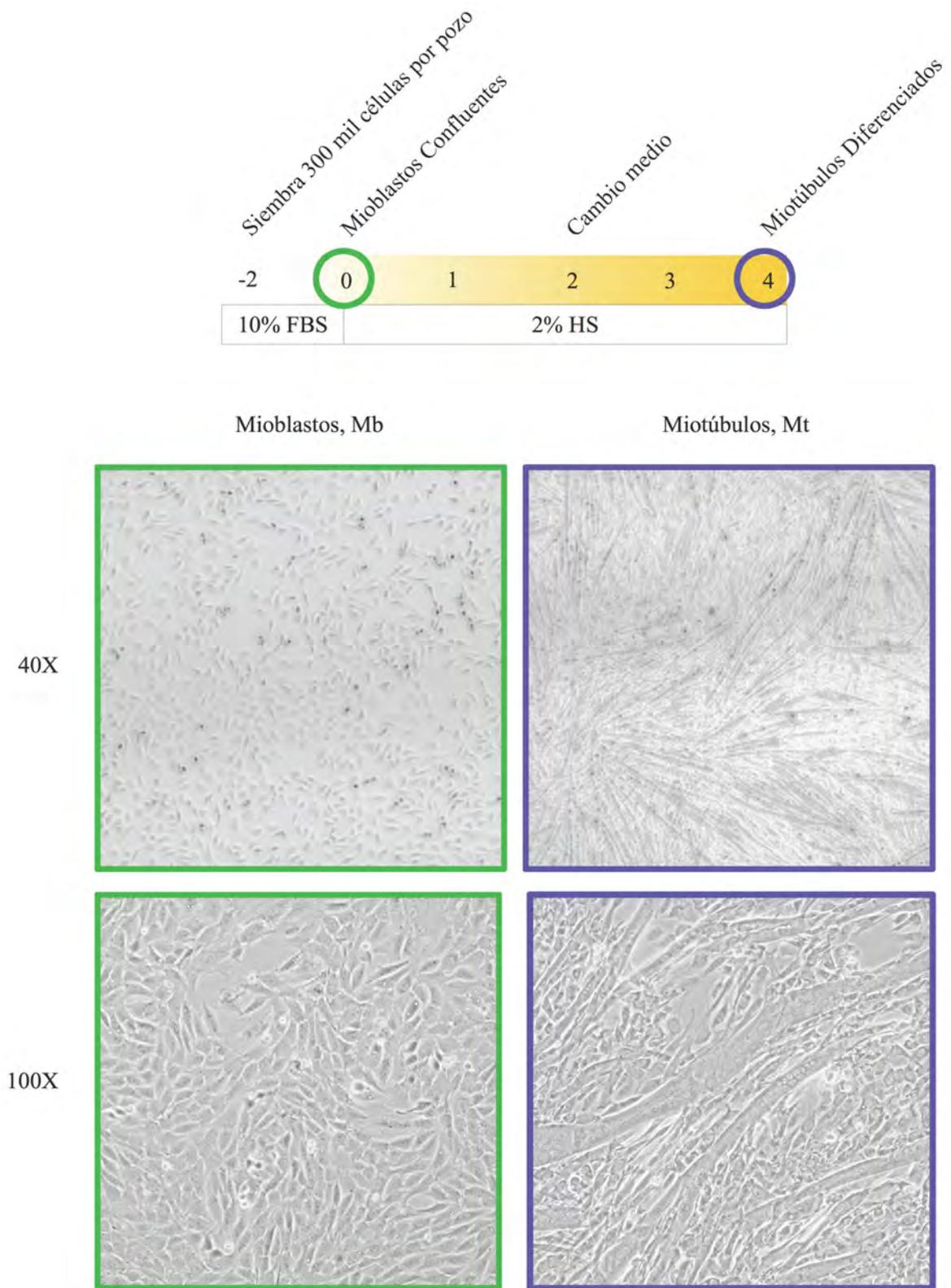
**Evaluación de marcadores de diferenciación.** Para validar el modelo de diferenciación muscular *in vitro*, se midieron los marcadores de diferenciación *Myog*, *Mef2a*, *Casq2*, así como *Fndc5* en cultivos dos días después de la siembra (mioblastos, Mb), y al término del protocolo de diferenciación cuatro días después de cambiar el tipo de suero (miotúbulos, Mt). Contrario a lo que se muestra en la figura 4, se utilizaron las condiciones de qPCR para medir el gen *Casq2* en el que sólo había un producto de amplificación como se observó en el análisis de “Tm Calling” (datos no mostrados). En la figura 7, se observa que todos los genes estudiados, incluyendo *Fndc5*, incrementan con la diferenciación muscular. En contraste con el análisis citológico, la expresión de genes marcadores de la diferenciación nos permite saber que el modelo de estudio corresponde a un cultivo de miotúbulos *in vitro*, y que la respuesta a los tratamientos experimentales puede ser similar a lo que sucede en un músculo esquelético *in vivo*.



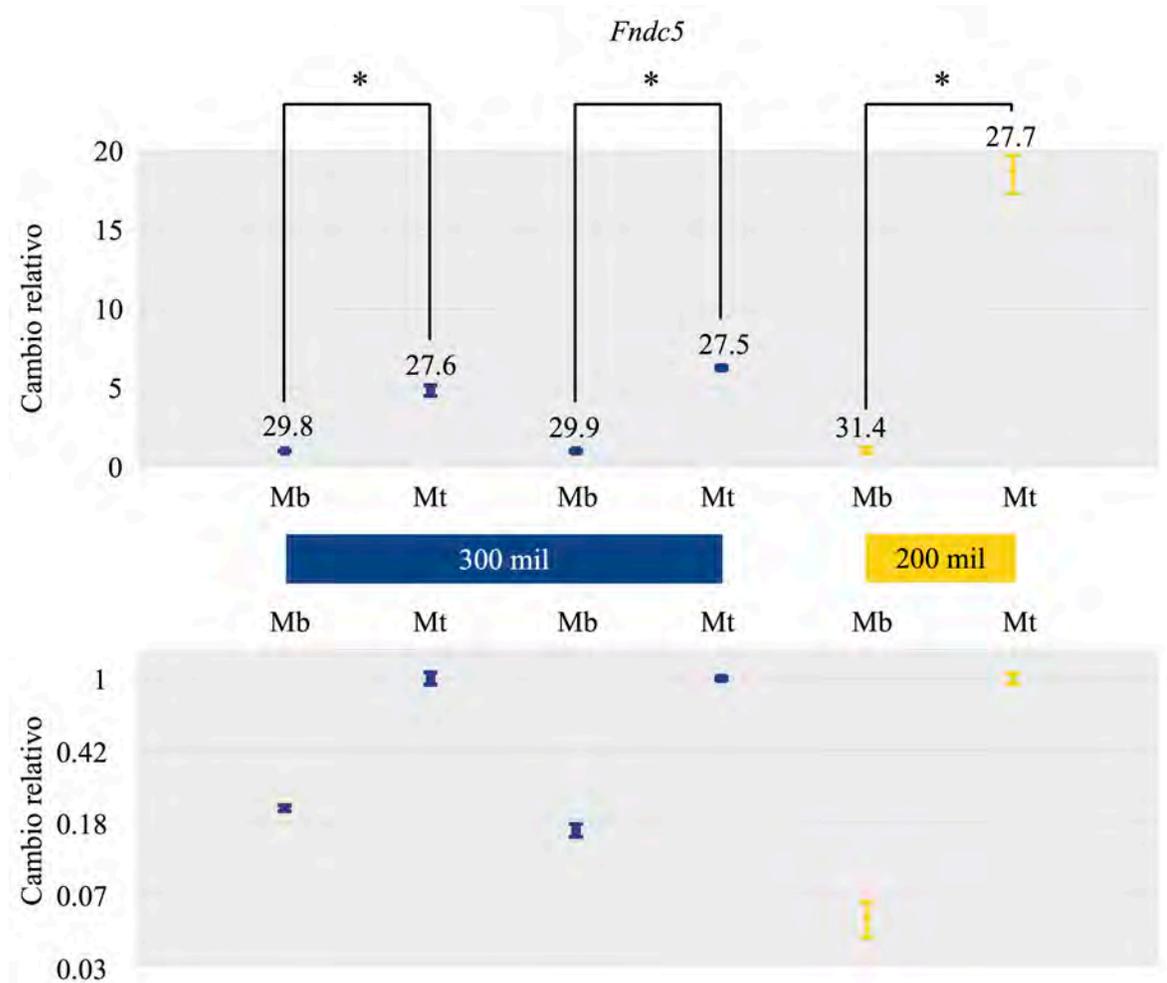
**Figura 7.** Se midió por RT-qPCR la expresión de los genes *Fndc5*, *Myog*, *Mef2a* y *Casq2* en cultivos de mioblastos (Mb) dos días después de la siembra, y en cultivos de miotúbulos (Mt) cuatro días después de inducir diferenciación. Se muestra la expresión de cada uno de los genes normalizada contra la expresión de los genes estructurales *Rplp0* y *Tbp*. También, se muestra el promedio geométrico del cambio en la expresión de los genes estructurales, el cuál no fue significativo entre tratamientos. A excepción de *Rplp0* y *Tbp*, se graficaron los promedios aritméticos de tres cultivos independientes  $\pm$  una desviación estándar; y se hizo análisis de T de student para determinar diferencias significativas \*  $p < 0.05$ , NS = no significativo.

**El perfil de expresión del cultivo depende de la densidad de la siembra.** Después de una serie de experimentos se encontró una particularidad del modelo de diferenciación. Hasta el momento, los experimentos se habían realizado sembrando inicialmente 300 mil células por pozo en placas de 6 pozos. Dos días después, se hacía el cambio a medio de diferenciación, para este momento el cultivo era 95% confluyente. Se consideró mioblasto (Mb) a este cultivo, también referido como día cero. Dos días después, se cambió medio, y posteriormente al cuarto día con respecto al día cero se consideró miotúbulo (Mt), ver figura 8.

En un experimento en particular, se sembraron inicialmente 200 mil células por pozo, asumiendo que al llegar las células a confluencia se observaría el mismo fenotipo que si se hubieran sembrado 300 mil células por pozo. Sin embargo, el perfil de expresión de ambas condiciones de siembra fue diferente. En la figura 9, se observa la expresión de *Fndc5* en cultivos de mioblastos y miotúbulos. De acuerdo con los experimentos previos, los cultivos con 300 mil células iniciales de siembra muestran un incremento de 5 a 6 veces en la expresión de *Fndc5* si comparamos los mioblastos confluentes con los miotúbulos. Sin embargo, cuando se sembraron 200 mil células por pozo se observó que el incremento en la expresión de *Fndc5* de mioblastos a miotúbulos fue de 18.5 veces. Asimismo, el cultivo con 200 mil células iniciales de siembra no mostró diferencias morfológicas en el microscopio con respecto al de 300 mil células iniciales de siembra, ambos cultivos fueron 95% confluentes dos días después de la siembra. Este fenotipo nos hizo revisar con más detalle los niveles de expresión génica, y se encontró que la variación de éstos es mayor en las muestras de mioblastos que en la de miotúbulos. Lo que significa que al día cero, el perfil de expresión entre los cultivos fue distinta. Interesantemente, se observó que todos los cultivos, independientemente de la densidad de siembra llegaron a un nivel de Cp muy similar, lo cuál no es el caso del cultivo de mioblastos. Por ello consideramos mejor normalizar los datos contra la población de miotúbulos como se muestra en el panel inferior de la figura 9. En conclusión, los cultivos con 200 y 300 mil células iniciales, después de 4 días de diferenciación, aunque son diferentes al inicio de la diferenciación, ambos llegan al mismo perfil de expresión de *Fndc5*. Esta evidencia respalda la validez de nuestros experimentos con genisteína, ya que todos ellos fueron hechos en cultivos diferenciados.



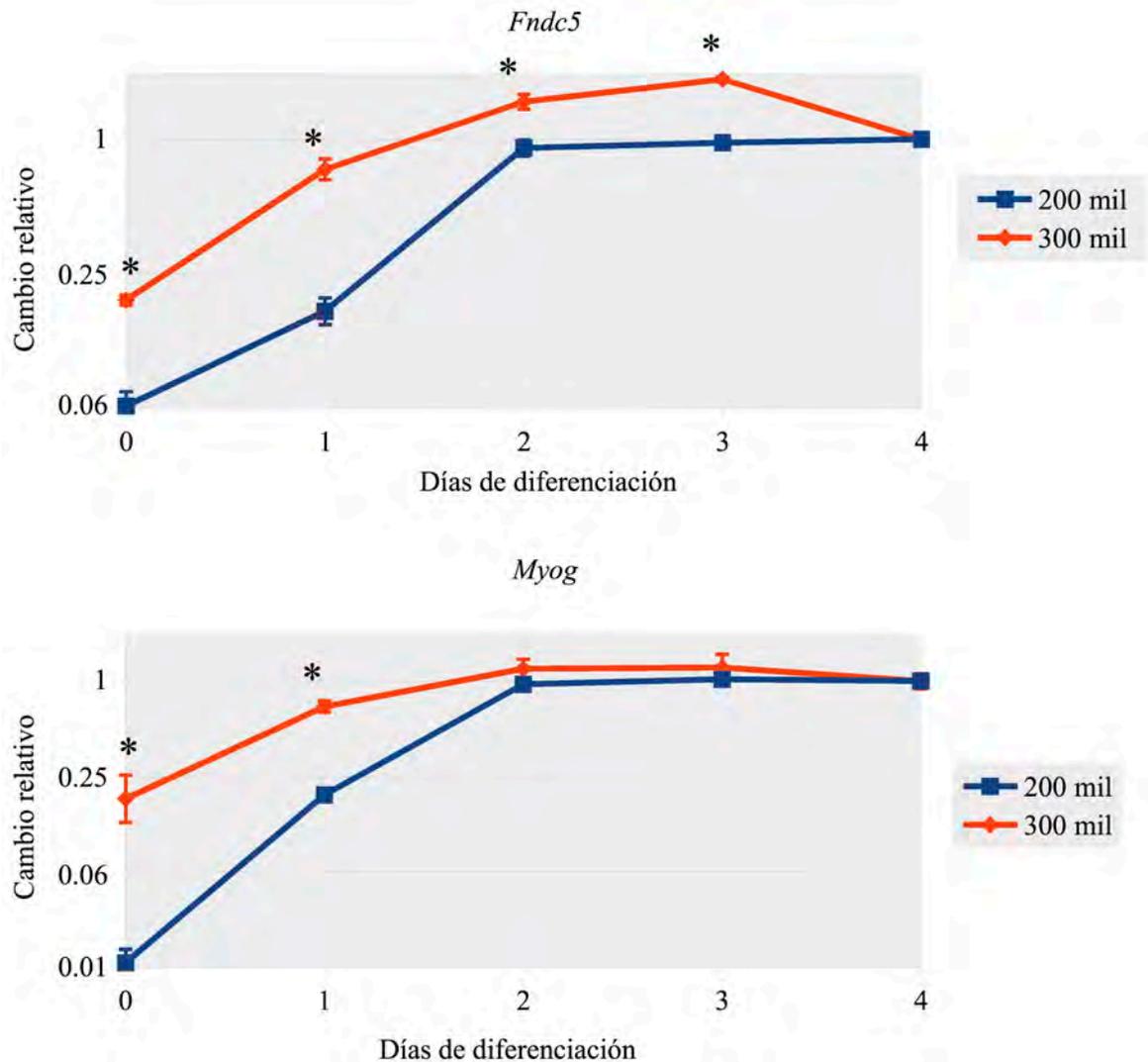
**Figura 8.** Esquema del protocolo de diferenciación muscular estandarizado en el laboratorio, panel superior. Fotografías de cultivos representativos con morfología de mioblastos (izquierda) y de miotúbulos (derecha).



**Figura 9.** Se midió por RT-qPCR la expresión del gen *Fndc5* en cultivos de mioblastos (Mb) dos días después de la siembra, y en cultivos de miotúbulos (Mt) al término del protocolo de diferenciación. Sembrando 200 o 300 mil células por pozo iniciales. En el panel superior los resultados están normalizados contra el cultivo de mioblastos; en el panel inferior la normalización se llevó a cabo contra el cultivo de miotúbulos. Los números colocados arriba de cada medición son valores de Cp representativos de una muestra de la población. Se utilizaron los genes estructurales *Rer1*, *Rpl27* y *Rpl41*. Se hicieron tres cultivos independientes y se hizo análisis de T de student para determinar diferencias significativas entre los cultivos de mioblastos y de miotúbulos \*  $p < 0.05$ .

***Fndc5* tiene un perfil de expresión similar a *Myog*.** Con el ánimo de comprender el curso temporal del incremento en la expresión de *Fndc5* y *Myog* descrito en la figura 9, se midió la expresión de ambos genes diariamente durante el protocolo de diferenciación. Como se observa en la figura 10, el nivel de expresión de ambos genes al día cero depende de la densidad de la siembra. También, es notable la poca variabilidad de las mediciones que corresponde a tres cultivos independientes, así como la significancia de las diferencias entre ambas condiciones de siembra. Curiosamente, la cinética de expresión de *Fndc5* tiene una

gran similitud con un experimento reportado en 2014<sup>20</sup>, donde se caracteriza la expresión de *Fndc5* y *Myog* durante la diferenciación muscular *in vitro* de cultivo primario de mioblastos humanos. El tiempo de diferenciación y la magnitud del incremento son evidentemente diferentes a nuestros resultados, pero llama la atención la similitud de la cinética descrita.



**Figura 10.** Se midió por RT-qPCR la expresión del gen *Fndc5* diaria en cultivos sujetos al protocolo de diferenciación. Se utilizaron los genes estructurales *Rer1*, *Rpl27* y *Rpl41*. Se hicieron tres cultivos independientes y se hizo análisis de T de student para determinar diferencias significativas entre los cultivos de 200 y 300 mil células iniciales, \*  $p < 0.05$ .

**Los programas GeneNetwork, Biomart, Pro-Coffee y Lasagna generan información robusta para un análisis *in silico* del promotor de un gen.** En el laboratorio estamos interesados en conocer los elementos de respuesta del promotor del gen *Fndc5*. Para ello diseñamos una herramienta bioinformática, que utiliza una serie de programas o bases de datos que nos permiten caracterizar *in silico* las regiones regulatorias de DNA de ratón. Primero, se utilizaron datos de transcriptómica provenientes de la base de datos GeneNetwork (<http://gn2.genenetwork.org/>). Para explicar la importancia de comenzar el análisis con esta base de datos, se describe un ejemplo publicado en 2003 por el grupo del Dr. Larsson<sup>30</sup>.

El trabajo buscó entender los factores genéticos que determinan el tamaño de la masa muscular en ratones, particularmente se interesaron en la arquitectura genética responsable por el desarrollo de la masa muscular, que debe incluir a una variedad amplia de genes de acuerdo a los antecedentes del trabajo. Primero, hacen referencia a ejemplos concretos en los que se conoce una relación entre un gen y el tamaño de la masa muscular en ratón. Uno de ellos es el gen que codifica para la hormona Miostatina (*Mstn*), que regula el crecimiento, diferenciación muscular y deposición de grasa en el cuerpo. Es por ello que se observa en el knock out del gen *Mstn* una mayor masa muscular, menor porcentaje de masa grasa en la composición corporal, y un aumento del “browning” del tejido adiposo blanco mediante la síntesis de *Fndc5*<sup>31</sup>.

Otro caso es el de IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), se ha observado que la sobreexpresión del gen que codifica para esta hormona induce hipertrofia muscular en roedores. Asimismo, se encontró que una variante de splicing alternativo de IGF-I actúa como un factor mecánico de crecimiento que favorece el desarrollo de la masa muscular de manera autócrina sobre el músculo esquelético en respuesta a ejercicio intenso<sup>32</sup>.

Sin embargo, el objetivo del trabajo buscaba determinar las regiones genómicas responsable por el tamaño de la masa muscular. Para ello se analizaron las diferencias en músculo de acuerdo al tipo de fibra muscular de la cepa C57BL/6J (B6) y DBA/2J (D2), donde por ejemplo, los cuatro músculos analizados eran de 11 a 34% más pesados en la cepa B6 que en la D2<sup>30</sup>. Posteriormente se analizaron 23 cepas recombinantes endogámicas (cepas BXD) derivadas de la F2 de la cruce entre las cepas B6 y D2. El objetivo fue encontrar los QTLs que afectan el peso de los cuatro músculos analizados. QTL, que

significa Quantitative Trait Locus, corresponde a una región cromosómica que contiene una o más variantes genéticas que modulan la distribución de un fenotipo o tratamiento experimental en una muestra genéticamente diversa de individuos que derivaron de una población endogámica, que en este caso corresponde al tamaño de la masa muscular. En algunos casos es posible que un fenotipo pueda ser consecuencia del efecto de un solo QTL en conjunción con el ambiente; sin embargo, se ha observado con mayor frecuencia que la variación en el fenotipo es poligénica, habiendo influencia de varios QTLs distribuidos a lo largo del genoma. Por lo tanto, la mayoría de los fenotipos son el producto de interacciones complejas entre factores genéticos, epigenéticos, ambientales y estocásticos. El componente fundamental del estudio consistió en correlacionar el tamaño de la masa muscular con alelos repartidos a lo largo del genoma heredados de alguna cepa de las dos cepas progenitoras. Se encontró que los cromosomas 1, 2, 3, 5, 6, 8 y 9 poseen alelos altamente correlacionados con tener un efecto sobre la masa muscular de los ratones. Hoy día, el sitio web de la base de datos GeneNetwork realiza de manera automatizada las correlaciones de acuerdo a un fenotipo de interés y arroja una lista de genes cuya correlación positiva o negativa es altamente significativa.

Para nuestro caso en particular, el fenotipo que nos interesa es la expresión del gen *Fndc5*. Por lo que se buscó en la base de datos una lista de genes cuya expresión se correlacione positivamente con la del gen *Fndc5*. De esta forma, obtenemos genes candidatos que por su perfil de expresión sería lógico que estén regulados por los mismos factores de transcripción por los que está regulado *Fndc5*, ya que cuando éste tiene niveles elevados de transcripción, lo mismo sucede con los genes correlacionados positivamente.

Como se muestra en la tabla 1, se encontraron varios genes cuya expresión se correlaciona positivamente con la de *Fndc5*, para ver un ejemplo vaya a la figura 11. Se tomaron los primeros 67 genes de la lista en orden de significancia estadística y se hizo una compilación de la región que comprende el intervalo [-900, +100] para cada uno de esos genes en ratón, así como sus ortólogos anotados en la base de datos Ensembl en rata, gato, caballo y humano utilizando la herramienta BioMart<sup>33</sup>. Posteriormente, se hicieron alineamientos de las secuencias ortólogas en cada uno de los 10 genes correlacionados y en el gen *Fndc5*, siendo un total 323 genes estudiados, utilizando el programa Pro-Coffee<sup>34</sup> del grupo de herramientas bioinformáticas T-Coffee. Este programa utiliza un método de alineamiento

múltiple de secuencias, que emplea una matriz de sustitución de dinucleótidos construida a partir de alineamientos de sitios de unión a factores de transcripción de la base de datos TRANSFAC<sup>35</sup>. Luego, se utilizó el programa Jalview<sup>36</sup> para visualizar los alineamientos y extraer los valores de similitud para cada posición del alineamiento en los 67 casos de estudio.

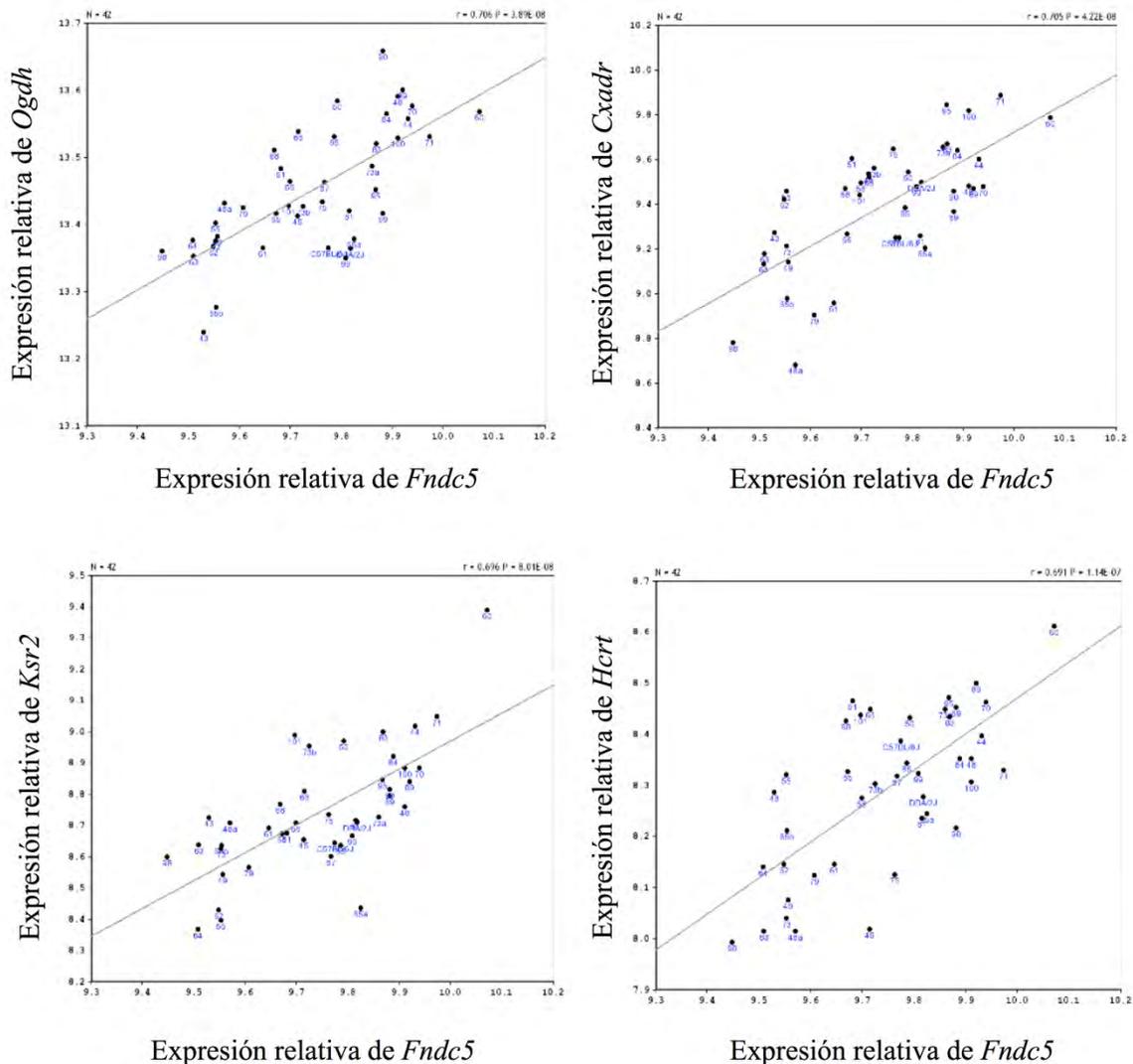
Posteriormente, se escribió un programa en python para extraer las regiones de cada promotor con similitud y longitud de acuerdo a la siguiente tabla:

Experimento	Similitud	Longitud
1	80	10
2	80	15
3	80	20
4	70	10
5	70	30
6	60	50

El objetivo de los seis experimentos fue determinar los fragmentos de cada promotor estudiado en ratón, que cumplen con los mínimos de similitud y longitud de acuerdo al diseño experimental.

Símbolo	Descripción	Cromosoma: Mb	Pendiente	<i>p</i>
<i>Fndc5</i>	Proteína con dominio de fibronectina tipo III 5	Cr4: 128.81	1	0
<i>Ogdh</i>	Oxoglutarato deshidrogenasa	Cr11: 6.24	0.7064	3.89E-08
<i>Cxadr</i>	Receptor del virus y adenovirus coxsackie	Cr16: 78.33	0.7053	4.22E-08
<i>Ksr2</i>	Supresor de la cinasa ras 2	Cr5: 118.15	0.6959	8.01E-08
<i>Hert</i>	Hipocreatina/orexina	Cr11: 100.62	0.6906	1.14E-07
<i>Ly6g6d</i>	Complejo antigénico de linfocitos 6, locus G6D	Cr17: 35.21	0.6879	1.36E-07
<i>Cox10</i>	Proteína del complejo citocromo C oxidasa	Cr11: 63.77	0.6860	1.53E-07
<i>Tmem70</i>	Proteína transmembranal 70	Cr1: 16.65	0.6837	1.78E-07
<i>Ints1</i>	Subunidad 1 del Complejo integrador	Cr5: 140.24	0.6834	1.81E-07
<i>Sdsl</i>	Serina deshidratasa-like	Cr5: 120.90	0.6828	1.88E-07
<i>Fam163b</i>	Miembro B de la familia con similitud de secuencia 163	Cr2: 26.99	0.6804	2.19E-07

**Tabla 1.** Se muestran 10 genes cuya expresión se correlaciona positivamente con la del gen *Fndc5* utilizando la base de datos GeneNetwork. Se muestra el símbolo del gen, la descripción del gen en español, su localización en el genoma, la pendiente de la correlación y el valor de significancia *p*. Es notable cómo al disminuir la pendiente, también disminuye la significancia estadística.



**Figura 11.** Se muestran cuatro ejemplos de la correlación que existe entre la expresión del gen *Fndc5* y la expresión de los genes *Ogdh*, *Cxadr*, *Krs2* y *Hcrt*. Las correlaciones fueron Pearson y se hicieron a partir de la base de datos GeneNetwork utilizando datos de transcriptómica de músculo esquelético de ratones BXD alimentados con dieta control y alta en grasa, n=42.

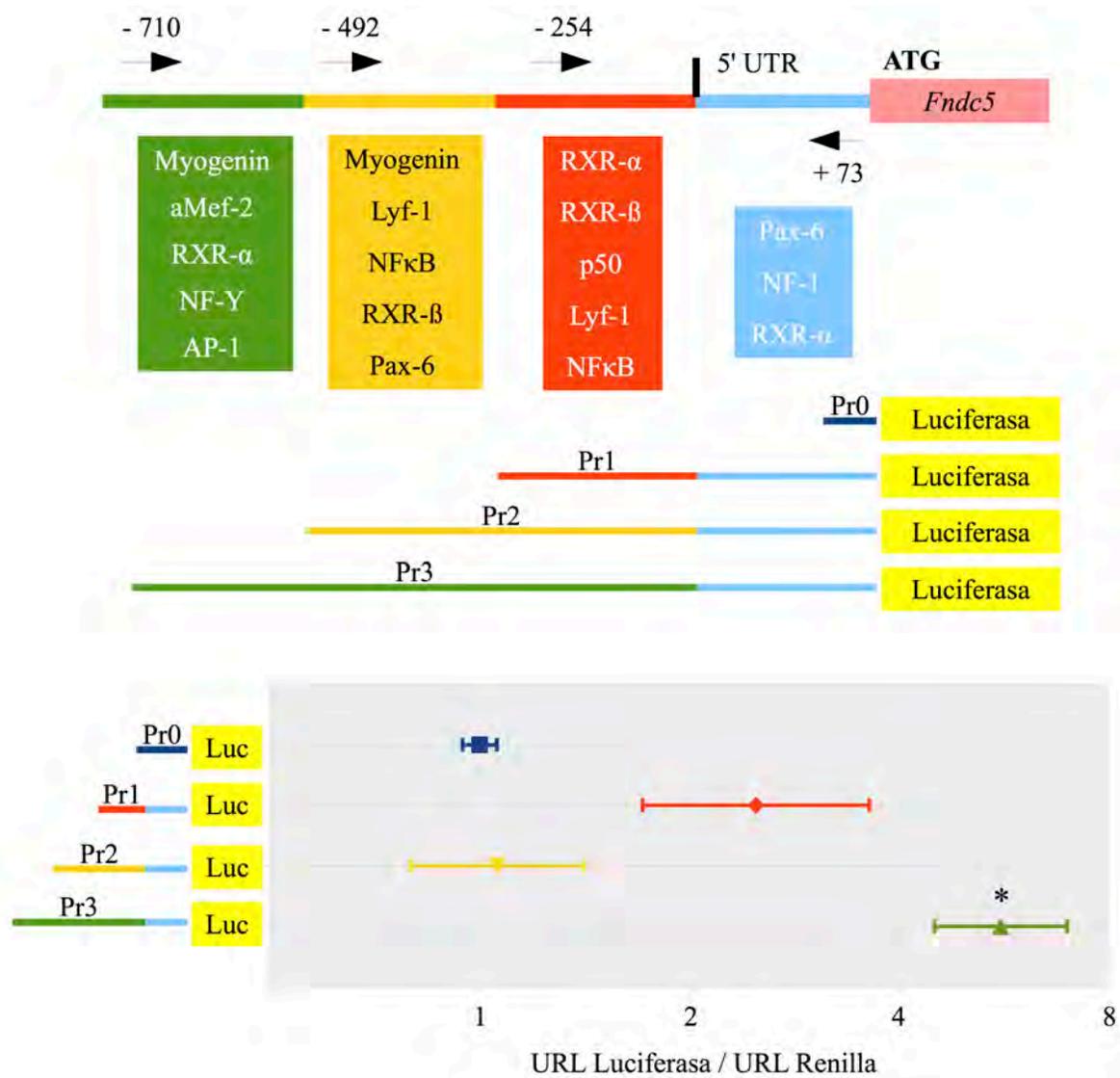
Brevemente lo que el programa hace es evaluar todos los fragmentos posibles del promotor con un mínimo de longitud determinada, y arroja todos aquellos fragmentos que además tienen un valor promedio de similitud de acuerdo con los parámetros del experimento. A continuación se muestran la cantidad de fragmentos que se analizó en cada experimento:

Experimento	1	2	3	4	5	6
Fragmentos	576	339	239	963	277	279

Finalmente, se analizaron los fragmentos con el programa Lasagna<sup>37</sup>, que predice sitios de unión a factores de transcripción. Es relevante mencionar, que este paso del análisis tradicionalmente es el primer acercamiento para caracterizar un promotor *in silico*. Sin embargo, antes de hacer la predicción de sitios de unión, con el procedimiento anteriormente descrito se enriqueció la población de secuencias de DNA con fragmentos conservados en varias especies, cuyo perfil de expresión está correlacionado positivamente con el del gen *Fndc5*, que es nuestro interés principal.

**La expresión del gen *Fndc5* parece ser regulada por Myog durante la miogénesis.** El análisis bioinformático mostró que el promotor de *Fndc5* tiene tres regiones altamente conservadas en las que se encuentran posibles sitios de unión a factores de transcripción que son comunes entre los genes cuya expresión se correlacionó positivamente con la del gen *Fndc5*. En el panel superior de la figura 12 se muestra el diseño experimental con base en los resultados bioinformáticos, se construyeron tres plásmidos con segmentos distintos del promotor del gen *Fndc5*, cada uno con más sitios posibles de regulación que el anterior. Se clonaron los promotores en un vector que contiene el gen reportero de luciferasa, se transfectaron las construcciones en cultivos de mioblastos un día después de la siembra junto con el control de transfección renilla. Se indujo diferenciación, ya que cuando el cultivo es joven la actividad transcripcional de *Fndc5* es baja, ver figura 10. Se midió la actividad de luciferasa y de renilla, se hizo una razón aritmética de luciferasa entre renilla y se normalizaron las muestras contra el vector vacío (Pr0). Se observa en el panel inferior de la figura 12, que el promotor con menor longitud, Pr1, tiene un incremento poco mayor a dos veces la actividad basal del vector vacío. Sin embargo, dada la dispersión de los datos, no podemos concluir que este incremento no se deba al azar. Interesantemente, el vector con la longitud intermedia, Pr2, pierde por completo el poco incremento observado con el Pr1. Esto se puede deber a que en la región que incluye el Pr2 pero no el Pr1 contenga algún sitio inhibitorio de la formación del complejo transcripcional. No es sino el fragmento del promotor más grande, Pr3, que evidentemente muestra un incremento significativo de 5.6 veces con respecto al vector vacío, lo que demuestra la presencia de al menos un elemento de respuesta funcional en cultivo de miotúbulos. Es necesario hacer más experimentos para demostrar qué sitios son responsables por este fenotipo, pero preliminarmente podemos

afirmar que el promotor de *Fndc5* requiere al menos 700 pares de bases río arriba para inducir su expresión en células diferenciadas.



**Figura 12.** El panel superior muestra los resultados del análisis bioinformático, donde los factores de transcripción localizados en cada región corresponden a aquellos que tuvieron una frecuencia alta entre todos los fragmentos analizados y aparecen en cada uno de los experimentos realizados. El panel inferior muestra la actividad de luciferasa en unidades relativas de luz, divididas entre la actividad del control de transfección renilla. Se hicieron siete cultivos independientes y se hizo análisis de T de student para determinar diferencias significativas entre los vectores experimentales y el vector vacío \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la genisteína tiene la capacidad de regular el metabolismo, la expresión de genes y la transducción de señales<sup>3-5,22,38,39</sup>. En nuestro laboratorio se encontró que cuando ésta se administra junto con dieta control a ratones jóvenes, hay un incremento en la señalización del eje músculo-irisina-tejido adiposo, que aumenta el gasto energético favoreciendo la termogénesis en tejido adiposo blanco, como se ha reportado anteriormente<sup>2</sup>. Nos preguntamos si el fenotipo observado es consecuencia de un efecto que la genisteína tiene en el músculo esquelético; sin embargo, la evidencia del efecto directo de la genisteína en células musculares fue poco concluyente. A las dos horas después de estimular con genisteína, se observó un ligero incremento en la cantidad de proteína Fndc5. Pero los experimentos no pudieron determinar si existía un efecto directo de la genisteína en la síntesis de la proteína Fndc5, ni de la proteína Pgc1 $\alpha$ , que es responsable por inducir la síntesis de irisina en músculo *in vivo*.

Consideramos que el efecto de la genisteína en ratones se debe a la interacción fisiológica entre varios órganos, e incluso no descartamos un posible rol de la microbiota intestinal en la modificación de la genisteína, como se ha reportado anteriormente<sup>40</sup>. También, es posible que la genisteína tenga efectos en el sistema nervioso central, aumentando la actividad motriz diaria, y como consecuencia la actividad física de los individuos, lo que activaría la señalización entre el músculo y el tejido adiposo mediada por la irisina. Consideramos que esta línea de investigación es importante para entender la relación molecular que existe entre los compuestos bioactivos y los beneficios que históricamente se han correlacionado con su uso, pero cuyo fundamento se desconoce.

Curiosamente, se observó que la expresión del gen *Fndc5* tiene un patrón similar al de los genes marcadores de la diferenciación muscular *Myog*, *Mef2a* y *Casq2*. Se observó que dos horas después de estimular con genisteína, hubo un ligero incremento en la expresión de *Fndc5*, contrario al efecto inhibitorio que los estímulos tuvieron en los marcadores de diferenciación. Es notable que el efecto que tiene la genisteína en la expresión de los genes medidos fue enmascarado por el etanol absoluto, que se utilizó como vehículo del estímulo y tiene efectos inhibitorios en la miogénesis de la línea celular C2C12<sup>29</sup>. Una aportación notable de este trabajo es que en experimentos subsecuentes con esta línea celular, se evaluará con detalle el volumen de etanol que se utilizará para administrar el estímulo, toda

vez que hemos demostrado que el etanol tiene un efecto en la expresión de los marcadores de diferenciación de la línea celular, así como en la expresión del gen *Fndc5*.

Después de una serie de experimentos, fue muy evidente que el gen *Fndc5* se comporta como un marcador de diferenciación. En el análisis del curso temporal de la expresión de este gen durante la miogénesis, se encontró que la dinámica de la expresión es idéntica que la del gen *Myog*. Por lo que no fue una sorpresa encontrar posibles sitios de unión al factor de transcripción miogenina en el promotor que regula la expresión del gen *Fndc5*. El análisis bioinformático de la región promotora del gen *Fndc5*, evidenció la presencia de tres regiones altamente conservadas con elementos de respuesta a una variedad de factores de transcripción. Como se mencionó anteriormente, la presencia de dos elementos de respuesta al factor de transcripción miogenina llamó particularmente la atención; la presencia de estos elementos puede explicar el perfil de expresión del gen *Fndc5* durante la miogénesis. En experimentos subsecuentes, se demostró que un fragmento del promotor que contiene un sitio de respuesta al factor de transcripción miogenina, es responsable por la inducción del gen en respuesta a la diferenciación celular. Esta evidencia apoya la hipótesis de que miogenina regula positivamente la expresión del gen *Fndc5*. También, se encontró evidencia de que hay una región del promotor que contiene elementos inhibitorios de la formación o procesividad del complejo transcripcional. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para concluir el mecanismo mediante el cual la miogénesis regula la expresión del gen *Fndc5*.

En la base de datos Ensembl, se encuentra anotado 89 pares de bases río arriba del gen *Fndc5*, la presencia del gen *Gm15906*, que codifica para un RNA largo no codificante intergénico. La existencia de este gen fue determinada por análisis de transcriptómica en ratón hecho por el proyecto Human and Vertebrate Analysis and Annotation (HAVANA), por lo que su función no ha sido determinada. Al momento sólo se ha identificado su existencia, por lo que es posible que regule de alguna forma la expresión del gen *Fndc5*. No se ha confirmado si existen ortólogos de este gen aún, por lo que no se sabe si existe un mecanismo de regulación exclusivo en ratón, o los ortólogos del gen *Fndc5* son precedidos en otras especies por un gen que codifica para un RNA largo también.

El estudio del gen *Fndc5* y la proteína que codifica, que da origen a la mioquina irisina tiene grandes promesas para el futuro. En el contexto actual de obesidad que se vive a nivel

mundial, desarrollar tecnología que nos permita aumentar el gasto energético de los individuos, sin que su calidad de vida se vea afectada es muy atractivo. El caso de la irisina llama la atención debido a la profunda reconfiguración que esta tiene en el tejido adiposo. Si entendemos de qué manera se induce la síntesis y secreción de la mioquina, podremos brindar a la población un plan estructurado que mejorará su composición corporal y dará una mejor esperanza de vida.

## **PRESPECTIVAS**

Como experimento inmediato se propone realizar ChIP para demostrar que miogenina se unen a la región del promotor del gen *Fndc5* que abarcan el intervalo [-492, -710]. Posteriormente, se sugiere la construcción de un plásmido en el que con mutaciones puntuales se perturbe esta interacción. Finalmente se propone hacer ensayos donde se contranfecten los plásmidos generados en este proyecto con un plásmido que sobreexpresa el gen *Myog*, lo cuál aumentaría la cantidad de miogenina en la célula, haciendo evidente la regulación que este factor de transcripción ejerce en el gen *Fndc5*.

## **REFERENCIAS**

1. Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* **17**, 162–184 (2013).
2. Boström, P. *et al.* A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463–8 (2012).
3. Li, J. *et al.* Genistein: The potential for efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **32**, 535–540 (2013).
4. Luo, L. J. *et al.* Genistein regulates the IL-1 beta induced activation of MAPKs in human periodontal ligament cells through G protein-coupled receptor 30. *Arch. Biochem. Biophys.* **522**, 9–16 (2012).
5. Palacios-González, B. *et al.* Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 132–140 (2014).
6. Scharner, J. & Zammit, P. S. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet. Muscle* **1**, 28 (2011).

7. DeFronzo, R. A. *et al.* The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* **30**, 1000–1007 (1981).
8. Mahoney, D. J., Parise, G., Melov, S., Safdar, A. & Tarnopolsky, M. A. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* **19**, 1498–500 (2005).
9. Louis, E., Raue, U., Yang, Y., Jemiolo, B. & Trappe, S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **47306**, 1744–1751 (2007).
10. Rowland, L. A., Bal, N. C. & Periasamy, M. The role of skeletal-muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biol. Rev.* **90**, 1279–1297 (2015).
11. Pozos, R. S., Israel, D., McCutcheon, R., Wittmers, L. E. & Sessler, D. Human studies concerning thermal-induced shivering, postoperative ‘Shivering’, and cold-induced vasodilation. *Ann. Emerg. Med.* **16**, 1037–1041 (1987).
12. Taylor-Burt, K. R., Monroy, J., Pace, C., Lindstedt, S. & Nishikawa, K. C. Shiver me titin! Elucidating titin’s role in shivering thermogenesis. *J. Exp. Biol.* jeb.111849– (2015). doi:10.1242/jeb.111849
13. Hughes, D. a, Jastroch, M., Stoneking, M. & Klingenspor, M. Molecular evolution of UCP1 and the evolutionary history of mammalian non-shivering thermogenesis. *BMC Evol. Biol.* **9**, 4 (2009).
14. Barberá, M. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* **276**, 1486–1493 (2001).
15. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
16. Liang, H. & Ward, W. F. PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 145–51 (2006).
17. Sabourin, L. a & Rudnicki, M. a. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* **57**, 16–25 (2000).
18. Zammit, P. S., Partridge, T. A. & Yablonka-Reuveni, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* **54**, 1177–1191 (2006).
19. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* **93**, 23–67 (2013).
20. Huh, J. Y., Dincer, F., Mesfum, E. & Mantzoros, C. S. Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans. *Int. J. Obes. (Lond)*. **38**, 1538–44 (2014).
21. Fleming, J. A. & Kris-Etherton, P. M. Macronutrient Content of the Diet: What Do We Know About Energy Balance and Weight Maintenance? *Curr. Obes. Rep.* 8–13 (2016). doi:10.1007/s13679-016-0209-8
22. Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A. & Löwik, C. W. G. M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J. Biol. Chem.* **278**, 962–967 (2003).
23. Bamford, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* **91**, 355–358 (2004).
24. Feingold, E. *et al.* The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* **306**, 636–640 (2004).
25. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent

- diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
26. Li, C. *et al.* FastCloning : a highly simplified , purification-free , sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnol.* **11**, 92 (2011).
  27. Pcr, R. T. & Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in. **29**, 16–21 (2001).
  28. Ullmann, U., Metzner, J., Frank, T., Cohn, W. & Riegger, C. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of single ascending doses of synthetic genistein (Bonistein) in healthy volunteers. *Adv. Ther.* **22**, 65–78 (2005).
  29. Arya, M. A. *et al.* Notch Pathway Activation Contributes to Inhibition of C2C12 Myoblast Differentiation by Ethanol. *PLoS One* **8**, (2013).
  30. Lionikas, A. *et al.* Genetic architecture of fast- and slow-twitch skeletal muscle weight in 200-day-old mice of the C57BL / 6J and DBA / 2J lineage. *Physiol. Genomics* 141–152 (2003).
  31. Shan, T., Liang, X., Bi, P. & Kuang, S. Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1-Fndc5 pathway in muscle. *FASEB J.* **27**, 1981–1989 (2013).
  32. Goldspink, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J. Anat.* **194 ( Pt 3)**, 323–34 (1999).
  33. Yates, A. *et al.* Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* **44**, D710–D716 (2016).
  34. Erb, I. *et al.* Use of ChIP-Seq data for the design of a multiple promoter-alignment method. *Nucleic Acids Res.* **40**, (2012).
  35. Wingender, E. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Brief. Bioinform.* **9**, 326–332 (2008).
  36. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
  37. Lee, C. & Huang, C. H. LASAGNA-search: An integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *Biotechniques* **54**, 141–153 (2013).
  38. Shih, C. H. *et al.* Genistein, a competitive PDE1-4 inhibitor, may bind on high-affinity rolipram binding sites of brain cell membranes and then induce gastrointestinal adverse effects. *Eur. J. Pharmacol.* **643**, 113–120 (2010).
  39. Goto, T., Kim, Y. II, Takahashi, N. & Kawada, T. Natural compounds regulate energy metabolism by the modulating the activity of lipid-sensing nuclear receptors. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 20–33 (2013).
  40. Matthies, a., Loh, G., Blaut, M. & Braune, a. Daidzein and Genistein Are Converted to Equol and 5-Hydroxy-Equol by Human Intestinal Slackia isoflavoniconvertens in Gnotobiotic Rats. *J. Nutr.* **142**, 40–46 (2012).