



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

B.E. Julio César Almanza Pérez.

**INFLUENCIA DE LA GLICINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE ADIPOCINAS DE
RATÓN: ESTUDIO *IN VIVO* E *IN VITRO***

Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Dra. Rebeca García Macedo

Asesores:

Dr. Miguel Cruz López
Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda

México D.F.

Marzo 2007

Comite tutorial

Co-directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C
Lab. de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
aaasj2@prodigy.net.mx

Dra. Rebeca García Macedo

Investigadora asociado C
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
CMN SXXI. IMSS
gamareb@yahoo.es

Asesores:

Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular A
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades.
CMN SXXI. IMSS
mcruzl@yahoo.com.

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda

Profesor asociado C
Jefe del Laboratorio de Toxicología
Dpto. de Farmacología. Fac. de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
casam@servidor.unam.mx

Jurado:

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor titular C
Jefe del Laboratorio de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
rrr@xanum.uam.mx

“El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32”.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social en colaboración con en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los Dres. Francisco Javier Alarcón Aguilar y Rebeca Garcia Macedo. El trabajo de investigación fue apoyado por el FOFOI en el proyecto 2005/1/1/045. El alumno Julio César Almanza Pérez recibió apoyo de CONACYT, número de registro 192901, y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, matrícula No. 99091931.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada Influencia de la glicina sobre la expresión de adipocinas de ratón: estudio *in vivo* e *in vitro*. Con fecha 22 de Marzo de 2007.”

Dr. Rubén Román Ramos

(Presidente)

Profesor titular C
Jefe del Laboratorio de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
rrr@xanum.uam.mx

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda

(Secretario)

Profesor asociado C
Jefe del Laboratorio de Toxicología
Dpto. de Farmacología. Fac. de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
casam@servidor.unam.mx

Dr. Miguel Cruz López

(Vocal)

Investigador titular A
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades.
CMN SXXI. IMSS
mcruzl@yahoo.com.mx

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Maciel, mi amada esposa.

Por hacerme dulce y agradable este largo viaje de la vida. Gracias por darme motivos para seguir creciendo.

A mis Padres.

Por darme ese ejemplo tan maravilloso, que es el nunca darme por vencido, y apoyar todos los sueños que desde niño he tenido.

A mis hermanas y sobrinos.

Por brindarme siempre su calidez de familia y expresarme todo su amor.

A mis tutores y asesores.

Quienes me han instruido con paciencia y me han obsequiado parte de su conocimiento sin pedirme nada a cambio. Permítanme satisfacerlos con la correcta aplicación y divulgación de los mismos.

A mis amigos y compañeros.

Por permitirme compartir con ustedes experiencias personales y científicas. Gerardo, Francisco Alarcón, Fausto, Luís, Selene, Gabriel, Eduardo.

A mis compañeros de generación.

Por convivir y trabajar conmigo durante el arduo camino que se recorre en la búsqueda de esta pequeña gloria. Viridiana, Cristóbal, Erika, Julio Brito, Alejandro.

A los profesores y compañeros del Laboratorio de Farmacología.

Dr. Rubén Román, Dr. Francisco Alarcón, Dr. José L. Flores; gracias por permitirme ser parte de los alumnos que integran este equipo. Así mismo, les agradezco sus observaciones tan acertadas.

A la UIM en Bioquímica.

En especial al Dr. Cruz y su gran plantilla de investigadores que siempre tuvieron tiempo y paciencia para ayudarme a resolver alguna duda. Dra. Rebeca, Dra. Clara, Dra. Margarita Diaz, Dra. Genoveva, Dr. Adan, Dra. Margarita, Dra. Reyna, Dr. Daniel, Dra. Karina, Dra. Catalina, Dra. Ma Elena, Dra. Ana Lucia y al resto de los integrantes.

Al Dr. Jesús Kumate.

Por ser un ejemplo de lucha y trabajo constante, pero sobre todo por apoyar a aquellos jóvenes científicos y estudiantes que tienen deseos de superación.

A la fundación IMSS.

Por las facilidades otorgadas para que la UIM en BQ adquiriera el equipo, sin el cual los experimentos de este trabajo no hubiesen sido posibles.

ÍNDICE

Pag.

Resumen	
Abstract	
1. Introducción	
1.1 Citocinas	
1.2 Citocinas y su relación con el tejido adiposo	
1.2.1 El tejido adiposo	
1.2.2 Moléculas secretadas por el tejido adiposo	
1.3 Adipocinas	
1.3.1 Factor de Necrosis Tumoral tipo alfa (TNF- α)	
1.3.2 Interleucina 6 (IL-6)	
1.3.3 Adiponectina (AdipoQ)	
1.3.4 Resistina	
2. Antecedentes	
2.1 Obesidad.....	
2.2 Diabetes	
2.3 Glicina	
2.3.1 La glicina como una alternativa terapéutica	
2.3.1 Avances científicos sobre glicina	
2.4 Obesidad experimental por glutamato monosódico (Ob/GMS..	
3. Justificación	
4. Hipótesis	
5. Objetivos	
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos particulares	
6. Materiales y métodos	
6.1 Reactivos	
6.2 Diseño experimental	

7. Resultados
8. Discusión
9. Conclusiones
10. Referencias bibliográficas

RESUMEN

Uno de los principales problemas de salud en México es la diabetes mellitus tipo 2 (DT2). La obesidad o el sobrepeso son factores de riesgo para desarrollar DT2. Existe una relación muy importante entre estas patologías ya que se caracterizan por generar un estado de inflamación crónica que se manifiesta como un incremento de marcadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), la proteína C reactiva y elevación en los niveles plasmáticos del angiotensinógeno, ocasionando el desarrollo de complicaciones vasculares. Particularmente las complicaciones macrovasculares presentes en los estados de obesidad y en los pacientes con DT2.

Existen diversas alternativas terapéuticas para el tratamiento y control de estas enfermedades. Se ha demostrado que la glicina, un aminoácido con propiedades antiinflamatorias, disminuye la expresión de IL-6 y TNF- α y aumenta la de IL-10 en cultivos de células de Kupffer.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la glicina sobre la expresión de los genes de las adipocinas IL-6, TNF- α , resistina (proinflamatorias) y adiponectina (antiinflamatoria) en células 3T3-L1 de ratón y sobre las concentraciones plasmáticas de las mismas en ratones obesos.

Los experimentos se realizaron en cultivos de fibroblastos de ratón (línea 3T3-L1), los cuales fueron diferenciados a adipocitos y mantenidos bajo condiciones de alta concentración de glucosa durante el proceso de diferenciación; adicionando glicina a dosis de 10 mM. Al finalizar el tratamiento se cuantificaron los niveles de expresión del RNAm de las adipocinas mencionadas. Por otro lado, la glicina se administró durante 30 días (dosis de

0.1 g/Kg en el agua de beber) a un modelo de ratones con obesidad experimental inducida con la administración neonatal de glutamato monosódico (ratón Ob/GMS) a partir de las 14 semanas de edad. Al finalizar el tratamiento se cuantificaron los niveles plasmáticos de las adipocinas.

Los resultados muestran que la glicina, además de aumentar significativamente los niveles de la adiponectina, reduce la IL-6 y la resistina ($P < 0.05$), tanto en los niveles de expresión cuantificados por RT-PCR tiempo real como en los niveles plasmáticos de las proteínas. Además, en las células tratadas con glicina se logró detectar disminución significativa en los niveles de expresión de $\text{TNF-}\alpha$ ($P < 0.05$).

Por lo anterior se puede concluir que la glicina tiene efecto antiinflamatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*. Con estas evidencias experimentales se pueden plantear nuevas investigaciones referentes al balance energético que se da entre moléculas encargadas de la regulación de citocinas, principalmente aquellas implicadas en el estado inflamatorio característico de los individuos obesos y pacientes con diabetes tipo 2. Además, es importante destacar el valor terapéutico que la glicina podría tener en el tratamiento y control de los pacientes con DT2 ya que estos resultados apuntan a que se trata de una alternativa útil para controlar el proceso inflamatorio y disminuir el desarrollo de sus complicaciones vasculares.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the major health problems in Mexico. Overweight and obesity are risk factors for development of DT2. Both conditions have an important link because they are characterized by producing a chronic inflammation state that it is manifested by an increase of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor type alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein, contributing for the development of vascular complications. Particularly the macrovascular complications in obesity state and type 2 diabetic patients.

There are several therapeutic alternatives for treatment and control of these diseases. It has been showed that glycine, has anti-inflammatory properties, reduces gene expression of IL-6 and TNF- α , and augments IL-10 in cultures of Kupffer cells.

The aim of the present research was to determine the effect of glycine on the gene expression of the adipokines IL-6, TNF- α , resistin (pro-inflammatory cytokines) and adiponectin (anti-inflammatory) in 3T3-L1 mouse cells line, and on the plasma concentrations of the same in obese mice.

3T3-L1 cells were cultured and differentiated to adipocytes under high (25.5 mM) and low (5.5mM) glucose, and treated with 10mM glycine in DMEM supplemented with 10% bovine fetal serum. At the end of the treatment, the RNAm gene expression levels of the adipokines were quantified. The other model used was of mice with obesity induced by neonatal administration of monosodium glutamate (Ob/GMS mouse). At 14th weeks of age, lean and Ob/GMS mice were treated with glycine during 30 days (dose of 0.1 g/kg in beverage) and the plasmatic levels of the adipokines were quantified at last of the treatment.

The results show that glycine significantly increases adiponectin, reducing IL-6 and resistin ($P < 0.05$), expression levels quantified with RT-PCR in real time end by ELISA. Furthermore, in glycine treated cells group was detected a significant reduction in the expression of TNF- α ($P < 0.05$). In conclusion, the glycine has anti-inflammatory effect in vitro and in vivo. With these experimental evidences, we can to propose new investigations in respect with the energetic balance mainly associated a permanent chronic inflammation character of the obese patients. Moreover, it is necessary to highlight the potential therapeutic value of the glycine in the treatment and control of the DT2 patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Citocinas

La respuesta que ejerce un ser vivo ante el ataque de un agente extraño, tal como una bacteria o un virus, está mediada por dos procesos biológicos conocidos como inmunidad natural (o innata) e inmunidad específica. Los efectores de ambos tipos de inmunidad están regulados por proteínas llamadas citocinas (Abbas *et al.*, 1991).

Las citocinas son sintetizadas por diferentes células del sistema inmune durante la fase efectora de la inmunidad natural o de la específica, sirven para regular la respuesta inmune inflamatoria. En la inmunidad natural los metabolitos microbianos, como los lipopolisacáridos (LPS), estimulan directamente a los fagocitos mononucleares para secretar citocinas. En contraste, las citocinas derivadas de linfocitos T se producen en respuesta al reconocimiento de regiones específicas del antígeno (Abbas *et al.*, 1991; Thomson, 1994).

Las citocinas son moléculas sintetizadas *de novo*, es decir, su síntesis se inicia mediante la transcripción de nuevos genes en diversos tipos celulares y pueden actuar en diferentes células, produciendo distintos efectos, es decir, son pleiotrópicas. Su síntesis puede modificarse por otras citocinas, actuando como antagonistas o en forma sinérgica. Por su función, pueden ser clasificadas en cuatro grandes rubros: mediadoras de inmunidad natural, reguladoras de la activación linfoide, crecimiento y desarrollo, activadoras de células inflamatorias no-específicas, así como estimuladoras del crecimiento y diferenciación de leucocitos (Abbas *et al.*, 1991).

1.2 Citocinas y su relación con el tejido adiposo

Las citocinas que se producen en los linfocitos T se les conoce como linfocinas (Abbas *et al.*, 1991), mientras que las citocinas que se producen en el tejido adiposo se conocen como adipocinas (Bloomgarden, 2003). Estas últimas estimulan la secreción de factores que tienen un papel importante (local, periférico y central) en una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la asimilación de alimento, balance energético, acción de insulina, metabolismo de lípidos, homeostasis y regulación de la presión sanguínea (Wang *et al.*, 2005).

Es frecuente que una misma célula utilice la propia citocina que secreta (acción autocrina), aunque también puede suceder que esta misma citocina actúe en una célula vecina (acción paracrina) o, como las verdaderas hormonas, que una célula sea estimulada por una citocina vía circulación sistémica (acción endocrina) (Abbas *et al.*, 1991).

1.2.1 El tejido adiposo

En años recientes se ha demostrado que el tejido adiposo (TA) no sólo es un tejido de almacenamiento de grasa sino que tiene función reguladora autocrina, paracrina y endocrina que, además de participar en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo de lípidos, también actúa en procesos proinflamatorios y antiinflamatorios (Lin *et al.*, 2005; Bloomgarden *et al.*, 2003).

El TA es un órgano que realiza funciones metabólicas; está formado de tejido conectivo irregular denso, el cual consiste predominantemente de adipocitos. Los adipocitos son células capaces de almacenar grasa en forma de triacilgliceridos (TGs) asociados de forma libre dentro de una matriz de fibras de colágeno. Existen dos variedades de TA identificables por la estructura de sus células, por su localización, color, inervación, vascularización y funciones. El TA blanco, común o unilocular y el TA pardo o multilocular. Este último está formado por células que contienen numerosas gotitas lipídicas (multilocular) y

su color se debe a la elevada cantidad de mitocondrias. El tejido pardo está especializado en la producción de calor y tiene un papel importante en la fisiología de los animales que hibernan. En la especie humana, la cantidad de este tejido sólo es significativa en el recién nacido, en el que ejerce una función auxiliar de termorregulación (Junqueira y Carneiro, 1987).

1.2.2 Moléculas secretadas por el tejido adiposo

El TA sintetiza y libera gran variedad de compuestos peptídicos y no peptídicos, estableciendo una red molecular de comunicación entre sus propias células y con las de otros tejidos. Este grupo de sustancias secretadas por el tejido adiposo se enlistan en la Tabla 1 (González et al., 2002).

Tabla 1. Moléculas secretadas por el tejido adiposo

Moléculas	Proceso bioquímico en el que participan
1. Lipoprotein lipasa (LPL) 2. Proteína estimuladora de acilación (ASP) 3. Proteína que se une a ácidos grasos (FABP) 4. Apolipoproteína E (apo E)	Metabolismo de los triglicéridos
1. Proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP) 2. Proteína que se une a retinol (RBP)	Metabolismo del retinol y del colesterol
1. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) 2. Factores con función endocrina como hormonas esteroides, angiotensinógeno	Coagulación sanguínea
1. Receptor activado por proliferadores de peroxisoma gamma (PPAR-γ) 2. Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) 3. Factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) 4. Hormona de crecimiento (GH)	Regulación de la celularidad del tejido adiposo
1. Adipocinas *Factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF α) *Interleucina uno (IL-1) *Interleucina 6 (IL-6) *Resistina *Adiponectina (AdipoQ) *Leptina	Regulan diversos procesos: sensibilidad a insulina, metabolismo de lípidos y carbohidratos, homeostasis energética, etc.
1. Proteína agouti 2. Monobutirina 3. Factor de crecimiento de fibroblasto (FGF-2) 4. Prostaglandinas (PGI₂, PGF₂α, PGE₂).	Moléculas de secreción del tejido adiposo

1.3 Adipocinas

Entre las citocinas sintetizadas por el TA se encuentran: leptina, adiponectina, TNF α , IL-6, y resistina. Estas tres últimas están relacionadas con la generación de resistencia a la insulina, así como con las complicaciones de tipo macrovasculares y microvasculares que se presentan en los pacientes con diabetes y/u obesidad (Fasshauer y Paschke, 2003).

1.3.1 TNF- α

El TNF- α es una citocina producida principalmente por monocitos, linfocitos, miocitos y TA. Ejerce su efecto a través de dos receptores de membrana: TNFR1 (p60) y TNFR2 (p80), mientras que las fracciones solubles de su receptor son sintetizadas y secretadas por el TA y contribuyen a la concentración circulante de las mismas. De hecho, el RNAm del receptor 2 se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo de sujetos obesos y se ha relacionado con el índice de masa corporal (IMC) y el índice de cintura cadera (ICC) (Hotamisligil *et al.*, 1997; Fernández-Real *et al.*, 1998).

El TNF- α es considerado un regulador importante de la sensibilidad a la insulina. Estudios *in vivo* han demostrado que el TA de roedores obesos con resistencia a la insulina producen significativamente mayor cantidad de TNF- α y la neutralización de éste produce un aumento en la captación de glucosa en respuesta a la insulina. Por otro lado, también se ha visto que en la obesidad se encuentra aumentado el TNF- α asociado a la membrana, por un defecto en el procesamiento a su forma soluble que parece ser capaz de generar resistencia a la insulina localmente y alterar de forma autocrina la biología del adipocito (Hotamisligil *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2002).

1.3.2 IL-6

La IL-6 es una citocina de aproximadamente 26 KDa (212 residuos de aminoácidos) que es sintetizada por el tejido adiposo, fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y otras células en respuesta a otras citocinas, como IL-1 y TNF α (cuya expresión está aumentada en la obesidad), tal y como ocurre en el propio TA (Kern *et al.*, 2001; Mohamed-Ali *et al.*, 1997). La producción y concentración de IL-6 circulante se asocia significativamente con el IMC y otras medidas de adiposidad (Recasens *et al.*, 2004).

El receptor de IL-6 contiene un dominio que une a la inmunoglobulina (Ig) y pertenece a la superfamilia de las IGg's (Abbas *et al.*, 1991). Dentro de las modificaciones post-traduccionales de esta citocina se incluyen glicosilaciones y fosforilaciones en el dominio amino terminal. Así mismo, promueve la síntesis de varias proteínas plasmáticas, como fibrinógeno, para contribuir con la fase de respuesta inflamatoria aguda, y puede funcionar como el principal factor de crecimiento de células β y como coestimulador de células T y timocitos (Thomson, 1994).

1.3.3 Adiponectina

Es otro miembro de las adipocinas, también llamado Adipo Q o Acrp30, proteína de 244 aminoácidos, se encuentra circulante como trímero o hexámero de alto peso molecular (Schulze *et al.*, 2004) y es sintetizada específicamente por el TA. Tiene efecto antiinflamatorio (Wang *et al.*, 2005) y está relacionada con el metabolismo de lípidos, particularmente con niveles altos de colesterol de alta densidad (HDL) y bajos niveles de triglicéridos. La adiponectina en condiciones normales se encuentra abundantemente en el plasma sanguíneo (30 μ g/ml) y la disminución de sus concentraciones plasmáticas está asociada con enfermedades ligadas a la obesidad, incluyendo las de arteria coronaria y diabetes tipo 2 (DT2) (Ouchi *et al.*, 2004, Cruz *et al.*, 2004). Se ha observado que la expresión de los RNAm de esta citocina se encuentra disminuida en

humanos y ratones obesos, así como en algunos modelos de diabetes lipoatrófica. El tratamiento agudo de ratones con esta citocina disminuye la resistencia a la insulina, la concentración de ácidos grasos libres y el contenido de triglicéridos de músculo e hígado (Saltiel y Kahn, 2001). Se ha encontrado que una reducción del 21% del IMC es seguida de un aumento en 42% de la concentración de adiponectina, sugiriendo que los cambios en la sensibilidad a la insulina pueden regular las concentraciones de adiponectina (Yamauchi *et al.*, 2001).

1.3.4 Resistina

La resistina es la hormona peptídica más recientemente descubierta, la cual es secretada por los adipocitos. Pertenece a la familia de proteínas secretoras y liberadoras conocidas como moléculas asociadas a resistina (RELMS), y sintetizadas en zonas de inflamación. La proteína está constituida por 114 aminoácidos y la proteína humana presenta 59% de homología con la del ratón. Algunos autores sugieren que la resistina puede causar resistencia a la insulina; que es la pérdida parcial de la sensibilidad a la misma, a pesar de que se incrementa su secreción para tratar de disminuir los niveles de glucosa en sangre. La resistina recombinante promueve la resistencia a la insulina a nivel sistémico cuando es administrada a ratones y disminuye el transporte de glucosa en las células de TA, mientras que el anticuerpo de resistina produce un efecto contrario (Saltiel y Kahn, 2001; Shojima *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2005). Estudios recientes han reportado que tanto la expresión de resistina como sus concentraciones en suero se encuentran aumentadas en la obesidad y en la DT2, siendo capaz de disminuir el transporte de glucosa en los adipocitos, pero estudios subsecuentes no han confirmado aún esos hechos, por lo que el papel potencial de la resistina aún no es claro (Saltiel y Kahn, 2001; Shojima *et al.*, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1 *Obesidad*

La obesidad es una condición crónica caracterizada por un exceso de grasa corporal. Es común definirla como el índice de masa corporal superior a 30, el cual se obtiene a partir de un modelo matemático que correlaciona positivamente con el contenido de grasa corporal. Su etiología incluye factores genéticos y/o ambientales (Arterburn y Hitchcock, 2001).

La obesidad y la diabetes melitus tipo 2 (DT2) frecuentemente se asocian con resistencia a la insulina (RI), que es la alteración central del síndrome metabólico (SM). La modificación de la función de la insulina parece ser consecuencia de un estado de inflamación sistémica de bajo grado. Aunque muchos de los detalles por los que la obesidad es capaz de generar RI no se conocen, parece que la clave está en la función alterada del tejido adiposo (TA) "incrementado e inflamado", como órgano secretor de adipocinas (Recasens *et al.*, 2004).

La obesidad tiene una correlación positiva con la RI y el aumento de concentración de marcadores inflamatorios vasculares. Concentraciones elevadas de varias citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-18, TNF- α , así como de Proteína C reactiva (PCR) y leptina, se han asociado con indicadores de aumento de masa grasa (peso, índice de masa corporal, aumento en el perímetro de cintura) y con factores de riesgo cardiovascular, sugiriendo que el TA contribuye a la producción de estas citocinas. También se ha propuesto que el TA pueda actuar como modulador de sustancias antiinflamatorias (Recasens *et al.*, 2004).

2.2 Diabetes

La DT2 se caracteriza por alta concentración de glucosa plasmática persistente (hiperglucemia) debida a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, afectando al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y generando hiperlipidemia y glucotoxicidad (Rivera-Dommarco *et al.*, 2002). Esta última altera diversas vías de señalización, debido a: i) activación de la proteína cinasa de tipo C (PKC), ii) vía del diacilglicerol, iii) aumento del metabolismo de las hexosas, iv) la glucosilación no enzimática con incremento en la formación de productos avanzados de glucosilación (AGEs), y v) aumento en la vía de los polioles. Todos estos mecanismos coinciden en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) por la cadena respiratoria y por la NAPH oxidasa (Reusch, 2003).

La glucotoxicidad induce procesos proinflamatorios que culminan con complicaciones micro y macrovasculares. Las primeras son causantes de la nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas, que son la causa del 40% de todos los casos de insuficiencia renal y de ceguera. Se ha estimado que en el curso de la enfermedad hasta el 70% de los diabéticos sufre alguna forma clínica de neuropatía (Singelton *et al.*, 2003). Las complicaciones macrovasculares se asocian con el incremento en el riesgo de padecer enfermedad aterosclerótica y se encuentran relacionadas con la hipertensión y dislipidemias (Aronson y Rayfield, 2002). Estas complicaciones pueden anteceder al diagnóstico y declaración de la DT2 hasta por 8 años e incluyen a la enfermedad isquémica del corazón, infarto cerebral e insuficiencia arterial de las extremidades inferiores (Stern, 1996).

La DT2 es una de las patologías en donde la participación de las adipocinas contribuye al deterioro del endotelio. En la actualidad se consideran marcadores bioquímicos importantes debido a que las complicaciones relacionadas con la DT2 y la obesidad están asociadas con la secreción

alterada de algunas de estas moléculas (leptina, TNF- α , IL-6, adiponectina y resistina), que contribuyen al daño vascular y a la resistencia a la insulina. De hecho, las concentraciones en plasma de IL-6 y adiponectina se emplean como indicadores de la predisposición a presentar DT2 (Fasshauer y Paschke, 2003, Cruz *et al.*, 2004). Estudios recientes realizados en pacientes con DT2 y en modelos celulares de adipocitos (fibroblastos 3T3-L1 de ratón) bajo condiciones de resistencia a la insulina que simulan las condiciones presentes en la diabetes, se ha encontrado que tanto las concentraciones en plasma de TNF- α , IL-6 y resistina en pacientes diabéticos, así como los niveles de RNAm en cultivos celulares, se encuentran más elevados al compararlos con los de individuos sanos y en condiciones de normalidad para los modelos celulares (Rotter *et al.*, 2002; Senn *et al.*, 2002; Shojima *et al.*, 2002; Wellen y Hotamisligil, 2003). Por el contrario, la adiponectina está disminuida, considerándose una citocina antiinflamatoria importante (Hu *et al.*, 1996; Weyer *et al.*, 2002).

Para el control del paciente diabético se cuenta con varias alternativas terapéuticas, dependiendo de las concentraciones de glucosa y el grado de obesidad que presenten los pacientes. Fundamentalmente se prescriben medicamentos hipoglucemiantes, cambio en el régimen alimenticio (mayor consumo de vegetales y menos carbohidratos simples) e incremento en la actividad física (ADATDNRHI, 1999; Nathan, 1998).

El principal objetivo de los tratamientos es disminuir o controlar las concentraciones elevadas de glucosa. La mayoría de los pacientes desarrollan complicaciones durante la evolución de la enfermedad, motivo por el cual muchas de las investigaciones se han enfocado a desarrollar terapias que no sólo corrijan la hiperglucemia sino que también disminuyan el estrés oxidante y modifiquen el metabolismo de los lípidos (Haffner, 1998). Así mismo, es importante controlar la presencia de componentes que desencadenan el proceso inflamatorio y la resistencia a la acción de la insulina. La glicina, un

aminoácido considerado un nutriente antioxidante y protector celular, representa una alternativa para aminorar el estado inflamatorio que se presenta en la obesidad y la DT2, impidiendo concomitantemente el desarrollo de sus complicaciones micro y macrovasculares (Matilla *et al.*, 2002).

2.3 Glicina

2.3.1 La glicina como una alternativa terapéutica

La glicina es el aminoácido más simple, no esencial, cuyo grupo lateral es un hidrógeno; se forma a partir del dióxido de carbono y del amoniacó por la acción de la glicina sintetasa, que es una enzima cuyo cofactor es el fosfato de piridoxal. También se puede formar a partir de la L-serina por la acción de la serina-hidroximetil-transferasa.

Este aminoácido se ha asociado con efectos benéficos en varios estados patológicos como los siguientes: choque inducido por hemorragia o endotoxinas, reducción en la concentración de alcohol en el estómago y aumento en la recuperación de la hepatitis producida por el alcohol, disminución del daño inducido por fármacos hepatotóxicos e inhibición de la apoptosis, disminución de la nefrotoxicidad originada por la ciclosporina A (fármaco inmunosupresor), prevención de hipoxia y de la formación de radicales libres, siendo útil en varias enfermedades asociadas con procesos inflamatorios, ya que disminuye la formación de citocinas, tales como sepsis, quemaduras y hemorragias, debido a que promueve la activación de macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios como las citocinas, que desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria progresiva. En general, la glicina es un aminoácido considerado como un nutriente antioxidante y protector celular (Matilla *et al.*, 2002).

La glicina desempeña un papel importante en la estructura de ciertas proteínas y puede participar en varias funciones celulares como modificador

biológico. Las funciones están asociadas con su pequeño tamaño y con la falta de un grupo lateral de mayor tamaño que podría afectar las características físicas de este aminoácido por impartirle carga, hidrofobicidad u otras limitaciones estructurales (Matilla et al., 2002).

2.3.2 Avances científicos sobre glicina

Dos protocolos de investigación registrados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS han obtenido resultados interesantes sobre el uso de la glicina como tratamiento para la DT2. En los pacientes tratados con glicina se ha demostrado que el porcentaje de la hemoglobina glucosilada (A1C) disminuye hasta 1.1% con respecto al placebo. Otro estudio en ratas con diabetes experimental inducida por administración de estreptozotocina, mostró disminución en el porcentaje de A1C de 2% y aumento de la actividad de enzimas antioxidantes al administrar la glicina. Esta acción es importante, ya que varias investigaciones muestran que cuando la A1C disminuye 1% en pacientes diabéticos se reducen los indicadores de complicaciones hasta en 35% y las muertes relacionadas con diabetes en 25% (UKPDS, 1998). De igual modo se ha observado ligera disminución en la concentración de glucosa en sangre en el modelo experimental, después del tratamiento con glicina (Alvarado-Vásquez *et al.*, 2003). Otros estudios realizados en el laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana, han demostrado que el tratamiento crónico con glicina a ratones genera disminución de A1C, aumento en la sobrevivencia de estos animales y efecto antioxidante ya que aumenta los niveles de glutatión y disminuye las concentraciones de malondialdehído en diferentes tejidos. Este último marcador de estrés oxidativo es considerado uno de los productos más importantes de lipoperoxidación. De igual forma, en cultivos de adipocitos con resistencia a la insulina se ha observado que disminuye la expresión de IL-6, citocina que es considerada un marcador importante de inflamación.

Para entender los mecanismos biológicos de la acción de la glicina se han realizado experimentos con cultivos de líneas celulares secretoras de insulina. La presencia de este aminoácido induce la secreción de insulina (Mc Clenaghan *et al.*, 1996). Por otro lado, en un cultivo primario de adipocitos de ratón tratado con glicina se observó que inhibe la captación de glucosa y, al parecer, la acción es sobre el sistema de transporte de glucosa, sin embargo, aún no es claro el mecanismo (Traxinger y Marshall, 1989).

De manera general, el efecto promovido por la glicina en procesos proinflamatorios y de estrés se considera benéfico. En células del sistema inmune, células de Kupffer y de origen endotelial tratadas con LPS (inductor de inflamación), el tratamiento con glicina inhibe la producción de TNF- α e induce la respuesta antiinflamatoria por la expresión de IL-10. El mecanismo por el cual la glicina modula estos efectos al parecer se encuentra relacionado con su receptor, el cual es un canal de cloro transmembranal formado por un complejo pentamérico. Al unirse la glicina a su receptor, se activa el influjo de iones cloro, lo que provoca la hiperpolarización de la membrana regulando la entrada de calcio. De esta forma se bloquea la producción de citocinas que dependen del incremento de la concentración de calcio intracelular. Con base en estas observaciones se plantea que la glicina pudiera ser utilizada en el tratamiento de cualquier enfermedad con un componente antiinflamatorio (Zhong *et al.*, 2003; Yamashina *et al.*, 2001).

2.2.1 Obesidad experimental por glutamato monosódico (Ob/GMS)

Uno de los modelos de obesidad en ratones es el inducido por neurointoxicación con glutamato monosódico (GMS). Estos animales desarrollan obesidad severa en la edad adulta debido a que la administración neonatal de esta sal produce daños severos en neuronas circunventriculares, como es el caso de la región arcuato hipotalámica, reduciendo el número de células hasta en un 75% y, por tanto, disminuyendo las concentraciones del

neuropéptido Y (Elefteriou *et al.*, 2003). El efecto neurotóxico del GMS, el cual culmina con la muerte neuronal, se atribuye al efecto excitatorio mediado por sus receptores específicos, cuya concentración incrementada en la vecindad neuronal crea un estado de continua despolarización, con un incremento sostenido de la permeabilidad membranal, un influjo pasivo de agua y un notable aumento de las concentraciones de Ca^{+2} intracelular, dando lugar a la excitabilidad y a la muerte neuronal. Estos hechos afectan funciones homeostáticas, tales como la reproducción y principalmente el peso corporal, ya que los animales neurointoxicados con GMS presentan un aumento en el peso corporal que no puede ser atribuido a la mayor ingesta de alimento, al parecer es un desbalance metabólico que culmina con obesidad severa (Campos-Sepulveda *et al.*, 2002).

Hirata y colaboradores (1997) trataron ratas neonatas machos de la cepa Wistar con 4 g/kg de GMS; a los 3 meses de edad se evaluó la resistencia a la insulina por medio de una prueba de tolerancia a la glucosa (clamp): inyectaron 0.75 g/kg de glucosa en la vena yugular y demostraron que las ratas obesas por la administración de GMS (Ob/GMS) tienen resistencia a la insulina. Otro estudio corroboró los resultados anteriores, concluyendo que la resistencia a la insulina se genera a los 4 meses de vida en las ratas Ob/GMS (de Mello *et al.*, 2001). Dolnikoff y colaboradores (2001), realizó estudios de tolerancia a la glucosa con ratas Ob/GMS a los 30 días de vida, observó que a esa edad, el peso corporal de las ratas disminuía, lo cual lo asoció con una concentración baja en los niveles de la hormona del crecimiento (GH). Así mismo, se determinó que la obesidad de estos animales es de tipo hipofágica. Un decremento en la disponibilidad de productos lipolíticos en el hígado podría explicar la disminución de los niveles de triglicéridos en plasma presentes en estas ratas obesas con un mes de edad. También observaron que los niveles del transportador de glucosa GLUT4 disminuyen en el tejido adiposo del epidídimo de ratas Ob/GMS. Los datos anteriores sugieren que las ratas

obesas de un mes de edad pueden presentar hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En resumen el modelo de obesidad inducido por GMS, puede ser un modelo excelente para estudiar el papel del proceso inflamatorio, resistencia a la insulina y evaluar alternativas terapéuticas potenciales para el control y prevención de la obesidad, la DT2 y sus complicaciones.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar DT2; ambas enfermedades están acompañadas de un proceso inflamatorio, el cual genera una desregulación en los adipocitos, produciendo altos niveles de citocinas proinflamatorias y bajos de anti-inflamatorias. Una de las alternativas para tratar de disminuir las complicaciones micro y macrovasculares en la obesidad y en la DT2 es la administración de glicina a los pacientes, ya que se ha determinado en diferentes modelos que su administración puede mejorar tanto el estado inflamatorio como el estrés oxidativo característicos de ambas patologías. Por lo anterior, resulta de gran relevancia conocer si la glicina modifica la síntesis y secreción de las citocinas de adipocitos en cultivo bajo condiciones de hiperglucemia y en ratones Ob/GMS.

Si el efecto producido por la glicina en ambos modelos se traduce en una disminución en la expresión de las proteínas proinflamatorias, como se ha demostrado en las células Kupffer, podría evitar a largo plazo la aparición de las complicaciones micro y macrovasculares derivadas del estrés metabólico y del proceso inflamatorio. Por lo tanto, puede ser una alternativa adicional al tratamiento farmacológico que contrarreste las complicaciones generadas por la hiperglucemia.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que la glicina modifica el estado inflamatorio en células del sistema inmune, por lo tanto debe regular la expresión de las adipocinas de ratón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la administración de la glicina sobre la expresión de adipocinas en células 3T3-L1 y sobre las concentraciones séricas de las mismas en ratones obesos.

5.1 Objetivos particulares

1. Establecer los siguientes modelos de estudio.
 - Cultivos de fibroblastos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos.
 - Modelo de obesidad en ratón, inducida por la administración de GMS (Ob/GMS).
2. Estandarizar los métodos de análisis de la expresión de adipocinas por RT-PCR
3. Determinar el efecto de la glicina sobre la expresión del RNAm de las adipocinas IL-6, resistina, TNF- α y adiponectina en cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos.
4. Estandarizar los métodos de análisis para determinar las concentraciones plasmáticas de las adipocinas pro y antiinflamatorias por ELISA.
5. Determinar el efecto de la glicina sobre las concentraciones plasmáticas de las adipocinas IL-6, TNF- α , resistina y adiponectina en ratones Ob/GMS.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium de GIBCO BRL, Grand Island NY. USA).
- Placas de cultivo CORNING de seis pozos.
- Suero fetal bovino (SFB) qualified (GIBCO).
- Metilhidroxibutilxantina (SIGMA, St. Louis, MO).
- Dexametasona (SIGMA, St. Louis, MO).
- Insulina bovina (SIGMA, St. Louis, MO).
- TriPure (Roche, Mannheim. Germany).
- Cloroformo (MERK).
- Isopropanol (MERCK).
- Etanol ABS (MERCK).
- Agua libre de RNAsas (Promega, Madison Wi. USA).
- Kit DNAsaQ (Promega, Madison Wi. USA).
- Bromuro de etidio (Biorad).
- Buffer de carga (10X Biorad).
- Kit DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim. Germany).
- Agarosa (Promega, Madison Wi. USA).
- L-ácido glutámico monohidratado GMS (Sigma-Aldrich).
- Glicina (Gibco BRL, Grand Island NY. USA).
- Tiras reactivas para determinar glucosa (Acutrend sensor, Roche).

- Tiras reactivas para determinar Colesterol total, Triglicéridos (Tg), Ácido úrico, Creatinina, Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), Transaminasa glutámico pirúvica (TGP) (Reflotron, Roche).
- Cuantificador de hemoglobina glucosilada (DCA 2000 Roche).
- Rojo Oleoso (Científica Mexicana).
- Kit Retrotranscripción IqpromII (Promega, Madison Wi. USA).
- Kit ELISA Mouse Adiponectina (R&D systems, Minneapolis USA).
- Kit ELISA Mouse Resistina (R&D systems, Minneapolis USA).
- Kit ELISA Mouse IL-6 (PIERCE, Rockford, IL. USA).
- Kit ELISA Mouse TNF- α (PIERCE, Rockford, IL. USA).
- Kit ELISA Mouse Insulina (LINCO Research, Missouri USA).

6. 2 Diseño experimental

A) Experimentos

Los modelos que se utilizaron en este proyecto de investigación son el de fibroblastos de ratón diferenciados a adipocitos de la línea celular 3T3-L1, y el de ratones con obesidad inducida por la administración de GMS, modelos en los cuales no se ha estudiado aún el papel de la glicina en la expresión de adipocinas (Fashauer *et al.*, 2001; de Carvalho-Papa *et al.*, 2002).

Cultivos celulares

Los adipocitos se diferenciaron a partir de fibroblastos precursores conocidos como preadipocitos. Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón se cultivaron a confluencia a 37° C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de cultivo con medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”) (8 X 10⁵ células por pozo), con glucosa en las concentraciones que se indicarán más adelante, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (0.1mM), gentamicina, complementado con 10% de suero fetal bovino. Dos días después de la confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos fue inducida con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM), dexametasona (DX, 0.25 µM) e insulina (5 µg/ml) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina (5 µg/ml), sin MIX, sin DX y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio sin suplemento de insulina se reemplazó cada dos días. Las células fueron usadas para experimentación los días 0 y 8 de diferenciación, en este último más del 95% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, presentando una forma circular-oval con depósitos de grasa en forma de pequeñas vacuolas y en las que está reportado que el transporte de glucosa mediado por insulina es el máximo (Fashauer *et al.*, 2001).

También en los días 0, 2, 4, y 8 de diferenciación se determinaron los niveles de expresión del RNAm del receptor activador de proliferación de peroxisomas tipo gama (**PPAR- γ**) por RT-PCR, que es considerado como un marcador de diferenciación y su expresión debe aumentar con el grado de diferenciación de los adipocitos. Para ello se usó la siguiente secuencia de oligonucleotidos (Forward 5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3'; Reverse 5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3').

a) **Cultivos testigo.** La línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 se cultivó en medio DMEM con 10% de suero fetal de ternera (SFT) en dos concentraciones de glucosa: 5.5 mM (baja concentración de glucosa) y 25.5 mM (hiperglucemia o alta concentración de glucosa), bajo estas mismas condiciones se indujo la diferenciación y se conservaron hasta el día 8. Estos cultivos fungieron como testigo de ambas condiciones experimentales.

b) **Cultivos con baja concentración de glucosa mas glicina (LG+).** Se realizaron cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos en condiciones de baja concentración de glucosa (5.5 mM) igual que el grupo testigo, únicamente que éstos se trataron con glicina 10 mM.

c) **Cultivos con alta concentración de glucosa mas glicina (HG+).** Se realizaron cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos en condiciones de alta concentración de glucosa (25.5 mM) como se indicó anteriormente, solamente que aquí se trataron con glicina 10 mM.

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento y la expresión de las adipocinas se analizó a los 0 y 8 días de diferenciación. El tratamiento con glicina se inició desde el momento en que las células se propagaron en los pozos y durante todo el proceso de diferenciación. Después

de la incubación en las condiciones experimentales arriba indicadas, se procedió a extraer y cuantificar el RNA total.

Tinción con rojo oleoso

Los fibroblastos 3T3-L1 se cultivaron en cajas de 12 pozos y se diferenciaron durante 8 días. Las células se tiñeron durante las cuatro etapas principales de diferenciación: fibroblasto (T0), preadipocito (T2), adipocito inmaduro (T4) y adipocito maduro (T8). Para ello, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS estéril y frío, se adicionaron 200 µl de solución de rojo oleoso (rojo oleoso al 0.5% en isopropanol al 60%) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Enseguida se lavaron con PBS y se observaron al microscopio. Se obtuvieron fotografías de las diferentes tinciones celulares.

B) Extracción del RNA total

Para la extracción del RNA total se utilizó el método descrito por el proveedor Invitrogen del reactivo TRIZOL (método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987). Después de los tratamientos indicados en el diseño experimental, las células 3T3-L1 (1×10^6) se lisaron en 1 ml de TRIZOL en campana de flujo laminar. Se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, después de centrifugar a 17,350 x g durante 10 minutos a 4° C, al sobrenadante se le adicionó 200 µl de cloroformo por cada ml de TRIZOL, agitando manualmente por un minuto, se dejó en reposo 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 17,350 x g, 15 minutos 4° C, a la fase acuosa se le agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y se incubó en hielo durante 20 minutos. Enseguida, se centrifugó a 17,350 x g, 10 minutos a 4° C, se aspiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml etanol al 75%, se agitó en el vórtex y centrifugó a 17,350 x g, 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se aspiró y se lavó con 250 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 17,350 x g, por 5 minutos a 4° C. El precipitado se resuspendió en agua libre de RNasas, se calentó a 55°

C por 10 minutos y se incubó por 10 minutos a 37° C con DNasa Q, se le adicionó agua libre de Rnasas y 500 µl de TRIZOL. Una vez que transcurrieron 3 minutos de reposo, el RNA se reextrajo como ya se indicó anteriormente. Al final, el RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -70° C, hasta su utilización para las reacciones de RT-PCR. Para cuantificar y determinar la pureza del RNA se determinaron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm (RNA y proteínas, respectivamente). La integridad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer de electroforesis Tris-borato/EDTA (TBE) y teñidos con bromuro de etidio, se tomó una alícuota de 0.5 µg de muestra y 2 µl de buffer de carga, se separó a 75-80 V por 45 minutos. La imagen se observó bajo luz ultravioleta y se capturó en un analizador de imágenes Gel Doc (BioRad).

C) Cuantificación de las adipocinas por RT-PCR en tiempo real

Transcripción en reversa (RT)

La reacción de transcripción en reversa (RT), se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa ImProm II a partir de 2 µg de RNA total de las células 3T3-L1; también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5µg/µl) que están formados por seis nucleótidos, éstos se unen aleatoriamente al RNA para su retrotranscripción. Un volumen total de 20 µl de reacción se incubó en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, con el siguiente programa de ciclos: inicio 25° C por 5 minutos, seguido por la extensión a 42° C por 55 minutos y, por último, se detuvo la reacción inactivando la enzima calentando a 70° C por 15 minutos y enfriando a 4° C por 5 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa en “tiempo real” (PCR)

El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master plus SYBR Green 1” para cada una de las adipocinas: IL-6,

adiponectina, resistina y TNF- α , el factor de transcripción PPAR- γ y para β -actina como gen de normalización. El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo, usando iniciadores normales de PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA emitiendo fluorescencia. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ l contenía 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM.

Las muestras se amplificaron en el LightCycler 2.0 de Roche utilizando capilares de borosilicato de 20 μ l. Se siguió un programa de amplificación para SYBR Green con un primer segmento de 10 min a 95°C para la preincubación de la enzima, un segundo segmento de amplificación constituido por 35 ó 40 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95°C por 10 seg a una rampa térmica de 20°C por seg; un alineamiento a 61°C por 7 seg a una rampa térmica de 20°C por seg; una amplificación a 72°C por 10 seg a una rampa térmica de 20°C por seg. La adquisición de la fluorescencia se realizó de manera sencilla al terminar este ciclo de PCR.

Se realizó un programa por el análisis de temperatura de fusión (melting) para verificar la amplificación específica, que consiste en el seguimiento de la desnaturalización lenta del producto final de amplificación, donde se obtiene el punto en el que la pérdida de la fluorescencia refleja la T_m del producto específico de amplificación. El programa consistió de una desnaturalización a 95°C con una rampa térmica de 20°C por seg, un realineamiento a 65°C durante 15 seg, a una rampa térmica de 20°C por seg; y por último, una desnaturalización lenta hasta 95°C a una rampa térmica de 0.1°C por seg y se cuantificó la fluorescencia de manera continua (Fasshauer et al., 2001a;

Fasshauer et al., 2001b; Fasshauer et al., 2002; Fasshauer et al., 2003a; Fasshauer et al., 2003b).

Posteriormente se verificó la especificidad de los productos del PCR mediante el corrimiento de los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 2. Oligonucleotidos usados para la cuantificación de la expresión de las adipocinas.

Molécula	Secuencia de oligonucleotido
IL6	Forward 5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'
	Reverse 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'
Adiponectina	Forward 5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3'
	Reverse 5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
Resistina	Forward 5'-GTACCCACGGGATGAAGAACCG-3'
	Reverse 5'-GCAGAGCCACAGGAGCAG-3'
TNF-α	Forward 5'-CCTCCCTGTCATCAGTTCTA-3'
	Reverse 5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
PPAR-γ	Forward 5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3'
	Reverse 5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3'

Como sonda de normalización se utilizó **β -actina** (Forward 5'-CCAGGGTGTGATGGTGGGAATG-3' Reverse 5'-CGCACGATTTCCCTATCAGCTG) (Fashauer et al., 2001a; Strey et al., 2003).

Se estandarizaron las reacciones para cada uno de los iniciadores y se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ para cuantificar la expresión.

D) Experimentos *in vivo*

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa CD-1 con un peso aproximado de 25-35 g obtenidos del bioterio de la UAM-I. Dichos ejemplares fueron cruzados a razón de tres hembras por un macho obteniendo hembras preñadas, las cuales fueron distribuidas por separado, con alimento y agua *ad libitum*. Una vez nacidas las crías, a las de una camada se le administró solución salina (grupo testigo) y al resto GMS por vía subcutánea para inducir obesidad (grupo experimental).

Existen pocos reportes sobre la resistencia a la insulina en ratones Ob/GMS, aunque son diversos en cuanto a la edad en que los animales generan tal resistencia (Hirata *et al.*, 1997; de Mello *et al.*, 2001; Dolnikoff *et al.*, 2001). Por ello, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa orales (PTGO) a las 14 (3 ½ meses) y 18 (4 ½ meses) semanas de edad en los animales. Las PTGO se realizaron mediante la administración de glucosa (2 g/kg de peso corporal al inicio) y la cuantificación de sus niveles en sangre en aparatos Acutrend Sensor (Roche) a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de la administración inicial de glucosa. Se realizaron determinaciones plasmáticas de insulina (Lynco Research) al t=0, a los 30 y 150 minutos

A las 14 semanas de vida de ambos grupos de ratones (sanos y Ob/GMS), se cuantificaron los niveles en sangre de colesterol total, triglicéridos, ácido úrico, creatinina, transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) con el sistema Reflotrón (Roche) y hemoglobina glucosilada (A1C) con el sistema DCA 2000 (Roche).

Grupos experimentales

a) **Ratones sanos.**

A ratones recién nacidos se les administró solución salina isotónica por vía subcutánea en dosis de 0.01 ml/g de peso corporal, el segundo, cuarto, sexto, octavo y décimo día postnatal. Catorce semanas después de la administración de la solución salina, se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 5 ratones cada uno:

I. Grupo **control sano (H. Gly-)**

A los animales de este grupo se les mantuvo con acceso libre de agua y alimento.

II. Grupo **sano tratado con glicina (H. Gly+)**

Este grupo tuvo acceso libre de alimento pero con un tratamiento de glicina por 30 días a partir de las 14 semanas de edad, la cual fue administrada en dosis de 0.1 g/kg de peso corporal, la administración fue *per os* en el agua de beber. Para tal efecto se les determinó el consumo de agua en 24 h con la finalidad de colocar las dosis exactas en los bebederos.

b) **Ratones obesos Ob/GMS.**

A los ratones recién nacidos se les administró glutamato monosódico (GMS; Sigma Co.) por vía subcutánea a razón de 2 g/kg de peso corporal disuelto en solución salina al segundo y cuarto día postnatal, y 4 g/kg de peso corporal, el sexto, octavo y décimo día postnatal. Se mantuvieron con acceso libre de agua y alimento (Nakayama *et al.*, 2003; Remke H. *et al.*, 1988).

Catorce semanas después de la administración de GMS, se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 5 ratones cada uno:

I. Grupo **control obeso (Ob/GMS. Gly-)**

A los animales de este grupo se les mantuvo con acceso libre de agua y comida.

II. Grupo **obeso tratado con glicina (Ob/GMS. Gly+)**

Este grupo tuvo acceso libre de alimento pero con un tratamiento de glicina por 30 días a partir de las 14 semanas de edad, la cual fue administrada en dosis de 0.1 g/kg de peso corporal, *per os* en el agua de beber. Para tal efecto se les determinó el consumo de agua en 24 h con la finalidad de colocar las dosis exactas en los bebederos.

A las 18 semanas de vida de ambos grupos de ratones (sanos y Ob/GMS), nuevamente se cuantificaron los niveles en sangre de colesterol, triglicéridos, ácido úrico, creatinina, transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) con el sistema Reflotrón (Roche) y hemoglobina glucosilada (A1C) con el sistema DCA 2000 (Roche).

E) Concentraciones plasmáticas de adipocinas

Al finalizar los 30 días de tratamiento con glicina, los animales se anestesiaron con éter y se obtuvo la sangre del tronco de cada animal por punción cardíaca. A partir de esta muestra, se obtuvo el suero para la cuantificación de las adipocinas.

Las citocinas se cuantificaron a partir del suero del ratón por el método de ELISA, con estuches comerciales de IL-6 y TNF- α (Pierce), adiponectina, resistina y leptina (R & D Systems), siguiendo el procedimiento descrito en la hoja técnica. La concentración de insulina se determinó con estuches comerciales (Linco Research Inc.) siguiendo el protocolo del proveedor.

F) Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba complementaria de Duncan para evaluar las diferencias entre los grupos. La significancia estadística fue del 95%, con una $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

Diferenciación de los fibroblastos de la línea 3T3-L1 a adipocitos

La línea celular 3T3-L1 se diferenció de fibroblastos a adipocitos mediante un “coctel” de diferenciación que incluye insulina, acetato de dexametasona y metilisobutilxantina. Los adipocitos 3T3-L1 se caracterizaron por tener acumulación de grasa en múltiples vesículas lo que se denomina multilocular. Las vesículas son visibles al microscopio óptico de campo claro y la diferenciación se consideró exitosa cuando más del 95% de las células adquirieron este fenotipo. En la Figura 1 se muestra la línea celular antes y después de la diferenciación.

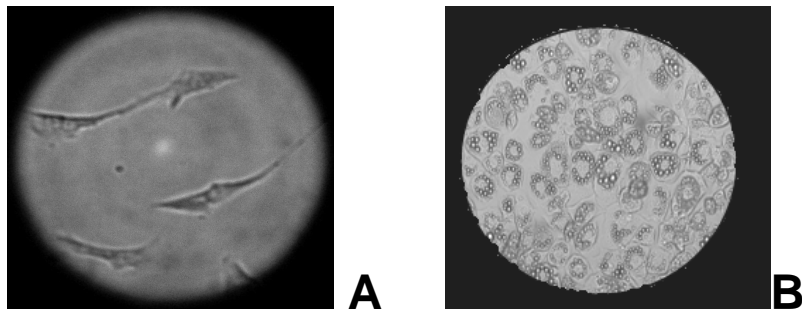


Figura 1. Diferenciación de las células 3T3-L1. La línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 cultivados en DMEM con 10% de SFB se diferenció durante 8 días como se indica en Material y Métodos. Se muestran en estado A) fibroblasto (40x) y B) adipocito (10x) con acumulación característica de gotas de grasa.

Así mismo, se realizó la tinción con rojo oleoso para observar las cuatro etapas de la diferenciación (Figura 2). Otro de los parámetros evaluados para considerar exitosa la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos fue la expresión del receptor activador de proliferación de peroxisomas de tipo gama (PPAR- γ), la expresión de este gen aumentó conforme progresa la diferenciación (Figura 3).

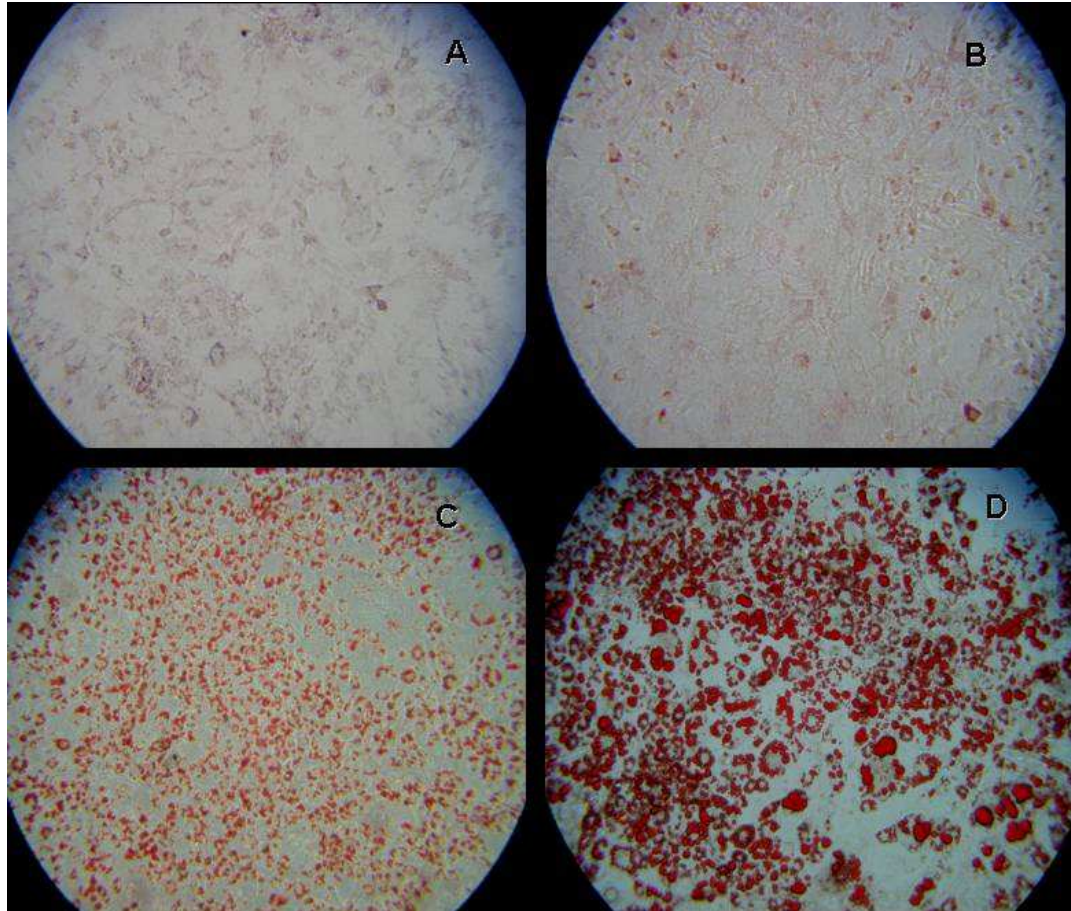


Figura 2. Etapas de diferenciación de las células 3T3-L1. La línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 se cultivó en DMEM con 10% de SFB y glucosa 25.5 mM y se diferenció por 8 días. Las células se tiñeron con rojo oleoso. En la fotografía se muestran los cuatro estados de diferenciación A) fibroblasto, B) preadipocito, C) adipocito inmaduro y D) adipocito maduro. Todas las fotografías se tomaron con aumentos 10x.

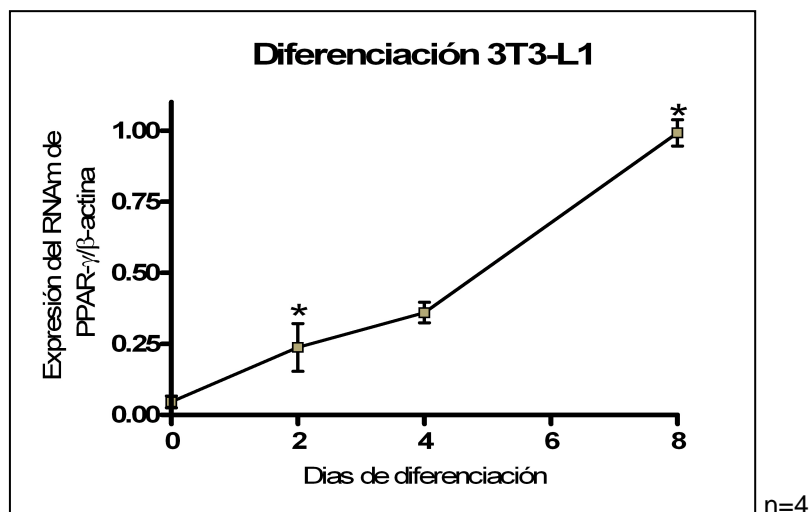


Figura 3. Expresión de PPAR- γ a lo largo de 8 días de diferenciación, Este factor de transcripción es considerado como marcador de diferenciación, el proceso presenta cuatro etapas principales: fibroblasto (T0), preadipocito (T2), adipocito inmaduro (T4) y adipocito maduro (T8 días).

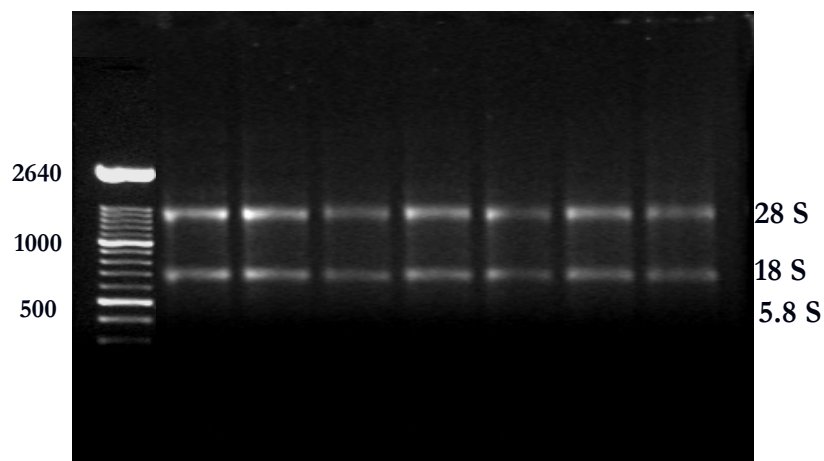


Figura 4. Integridad del RNA. Se presentan varias muestras representativas de RNA's aislados de los cultivos celulares y analizados en gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio.

Al inicio y a los 8 de diferenciación se realizó la extracción del RNA total de los cultivos por medio de la metodología descrita en material y métodos. La integridad del RNA aislado se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En la Figura 4 se presentan muestras representativas del RNA total aislado de los adipocitos. Se pueden apreciar las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S, sin ningún tipo de degradación, lo cual permitió continuar con los experimentos subsecuentes.

RT-PCR

Para estandarizar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la síntesis de DNA de cadena lineal se realizó la retrotranscripción de 2 RNA's independientes, probando 3 diferentes concentraciones de $MgCl_2$: 2 mM, 4 mM y 6 mM. A partir de los cDNA's sintetizados, se realizaron los estudios de PCR en tiempo real de β -actina para establecer la mejor concentración de la sal. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 5, en ella se logra apreciar que la amplificación de β -actina fue a los 17 ciclos y a los 18 ciclos con el primero y el segundo cDNA, respectivamente, siendo la concentración de 4 mM de $MgCl_2$ la óptima para la retrotranscripción.

Se evaluó la linealidad de los ensayos para cuantificar la expresión del RNAm de las diferentes adipocinas mediante reacciones de PCR en tiempo real. Los experimentos se realizaron por duplicado y al menos en dos corridas con dos cDNA independientes, que se obtuvieron de adipocitos 3T3-L1 sin tratamiento, y con diluciones seriales del cDNA (1:5, 1:50, 1:500, 1:5000 ó 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Los genes que se analizaron fueron: β -actina, IL-6, resistina, adiponectina y PPAR- γ , empleando SYBR Green como reportero de fluorescencia (Figura 6). Para el caso de TNF- α se realizó una curva con diluciones seriales del producto de amplificación de un primer ensayo ($1:1 \times 10^6$, $1:10 \times 10^6$, $1:100 \times 10^6$ y $1:1 \times 1000^6$) ya que la cantidad de expresión de este gen es mínima, como lo muestra la amplificación después del ciclo 30.

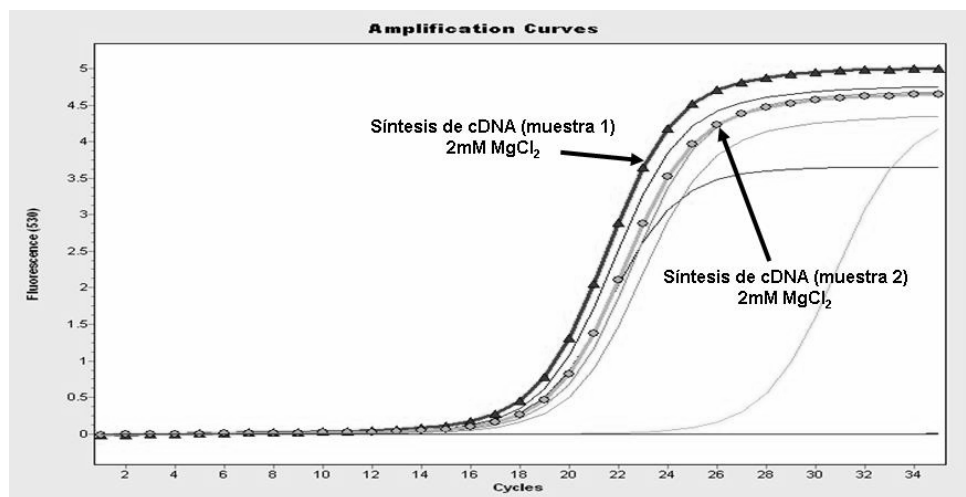


Figura 5. Concentración óptima de MgCl₂ en la reacción de PCR. Se muestra la amplificación de β -actina a partir de 2 cDNA's sintetizados con 2 mM, 4 mM y 8 mM de MgCl₂. Se observa que 2 mM de MgCl₂ es la concentración óptima para la síntesis de DNA de una sola hebra.

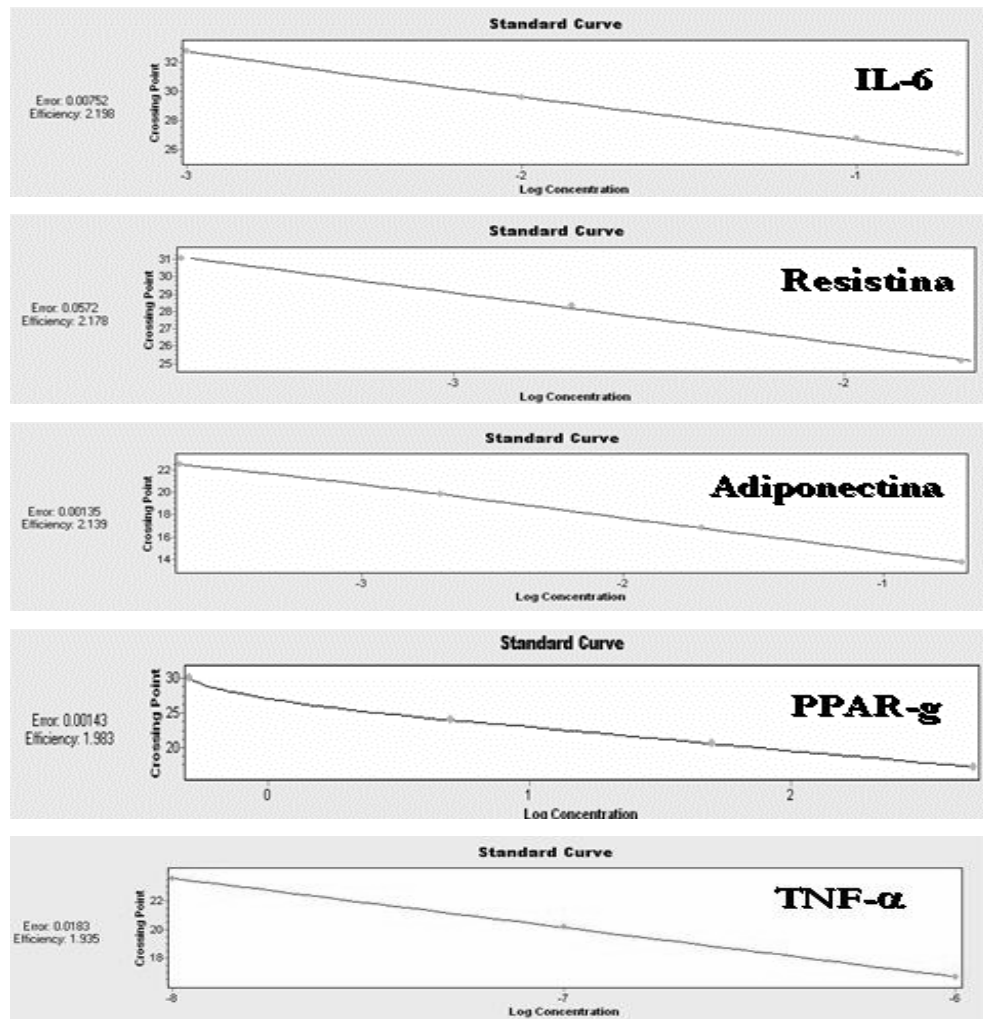


Figura 6. Linealidad en la expresión del RNAm. Se muestra la amplificación de los genes que codifican para: β -actina, IL-6, Resistina, Adiponectina, PPAR- γ y TNF- α , las gráficas se obtuvieron mediante diluciones seriales del cDNA y amplificados por PCR en tiempo real. La eficiencia de cada curva estándar fue de alrededor de 2.0 y el error menor o igual a 0.05.

La especificidad de la reacción se evaluó por el tamaño de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% y por medio del análisis de la temperatura de disociación (melting). En la Figura 7 se presenta la pureza de los productos de PCR y los pesos moleculares para cada gen estudiado. Así mismo, en el análisis melting se observó un solo pico para cada uno de los productos de amplificación con SYBR Green.

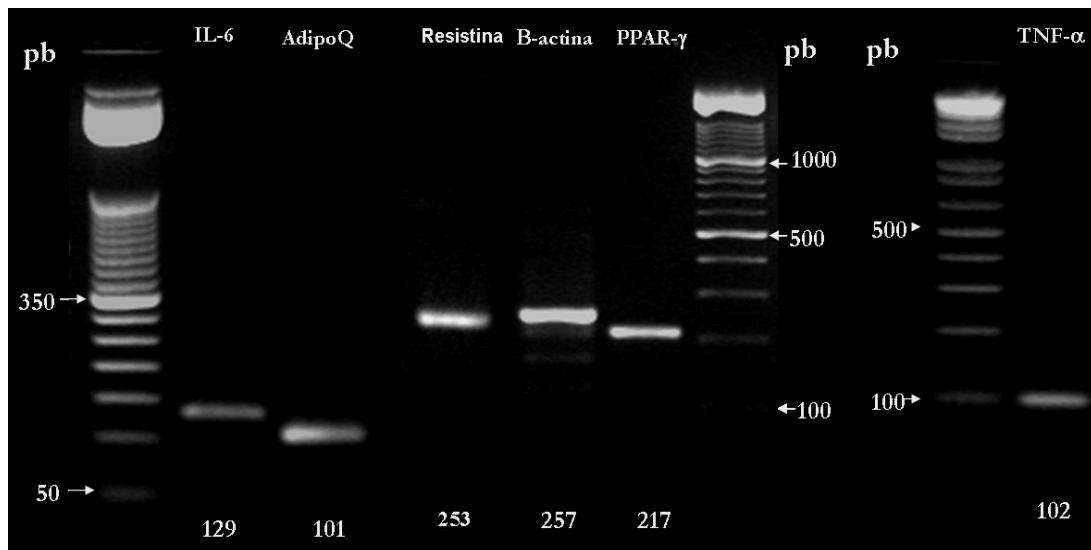


Figura 7. Especificidad de los productos de PCR en tiempo real.

Se presentan muestras representativas de los productos de reacción de PCR, separados en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio, en donde se observan los productos correspondientes a IL-6 (129pb), adiponectina (101pb), resistina (253pb), β -actina (257pb), PPAR- γ (217pb), y TNF- α (102pb).

Tratamientos de las células 3T3-L1 con glicina

Una vez estandarizados los cultivos celulares y su diferenciación se prosiguió a tratar los cultivos correspondientes con glicina. Se establecieron cultivos con alta concentración de glucosa (25.5 mM) sin y con tratamiento de glicina denominados HG- y HG+, respectivamente. Así mismo, se establecieron cultivos con baja concentración de glucosa (5.5 mM) en el medio de incubación,

sin y con tratamiento de glicina denominados LG- y LG+, respectivamente. La dosis de glicina utilizada fue de 10 mM, que fue establecida previamente mediante una curva dosis-respuesta. En la Figura 8 se muestra el resultado de la expresión de IL-6 en condiciones de HG y LG en tres diferentes dosis de glicina (5 mM, 10 mM y 15 mM), eligiéndose la dosis de 10 mM para tratamientos subsecuentes.

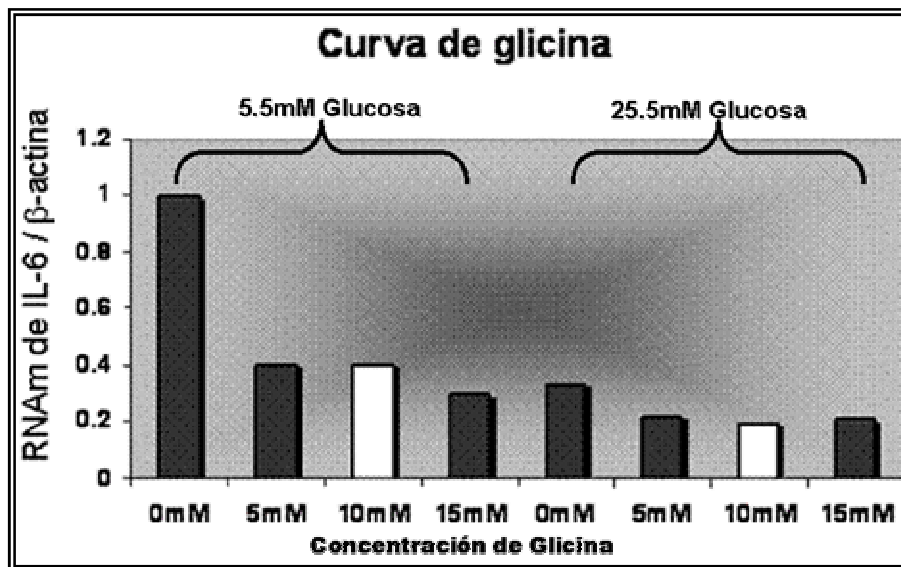
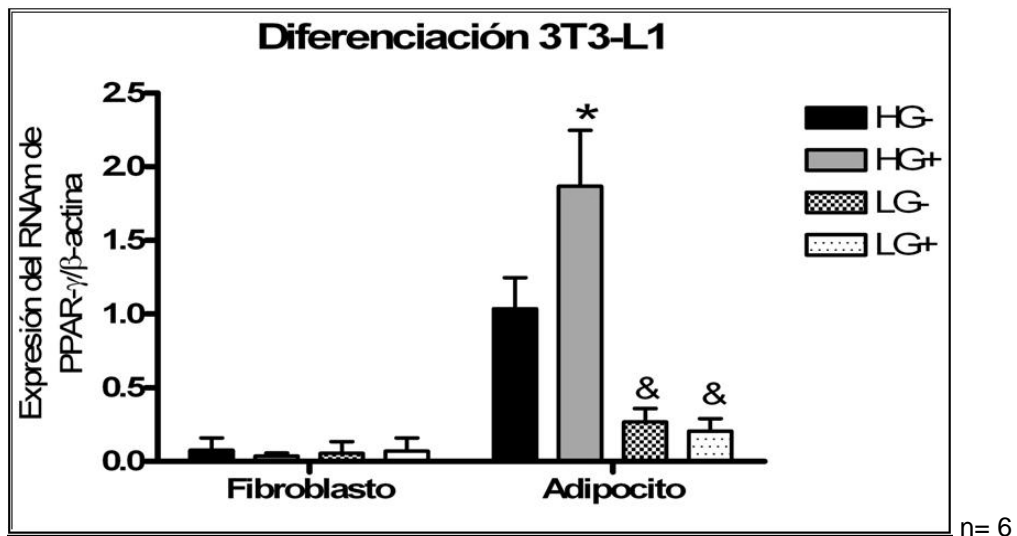


Figura 8. Expresión de IL-6 en células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de glicina. Las células se trataron con tres dosis de glicina, en condiciones de baja concentración de glucosa (5.5 mM) y alta concentración de glucosa (25.5 mM). Se observa que la concentración óptima de glicina en estos cultivos es de 10 mM.

El PPAR- γ es un indicador importante de diferenciación en los adipocitos y su expresión aumenta conforme avanza la diferenciación (Figura 3). Sin embargo, en cultivos de fibroblastos (T0) con baja concentración de glucosa, en presencia y en ausencia de glicina no se expresa PPAR- γ , comparado con los de alta concentración de glucosa en el estado de adipocito (T8), en los cuales

se incrementa su expresión, tanto en presencia como en ausencia de glicina. Además, se observa que en los cultivos de baja concentración de glucosa existe baja expresión de este gen, e incluso llega a ser muy similar a la expresión de los fibroblastos. Esto hace suponer que bajo esta condición las células no se diferencian a adipocitos. Este hecho se corrobora con la tinción con rojo oleoso, ya que los cultivos diferenciados en condiciones de baja concentración de glucosa presentan un fenotipo distinto a los de alta concentración de glucosa, pues en ellos existe una leve acumulación de gotas de grasa que concuerda con la baja expresión de PPAR- γ (Figuras 9 y 10).



Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

& Diferencia significativa con respecto al calibrador ($p < 0.01$)

Figura 9. Expresión de PPAR- γ en células 3T3-L1. Se determinó la expresión de PPAR- γ en cultivos fibroblastos (T0) y adipocitos (T8) tratados con 10 mM de glicina en condiciones de alta concentración de glucosa (HG) y baja concentración de glucosa (LG).

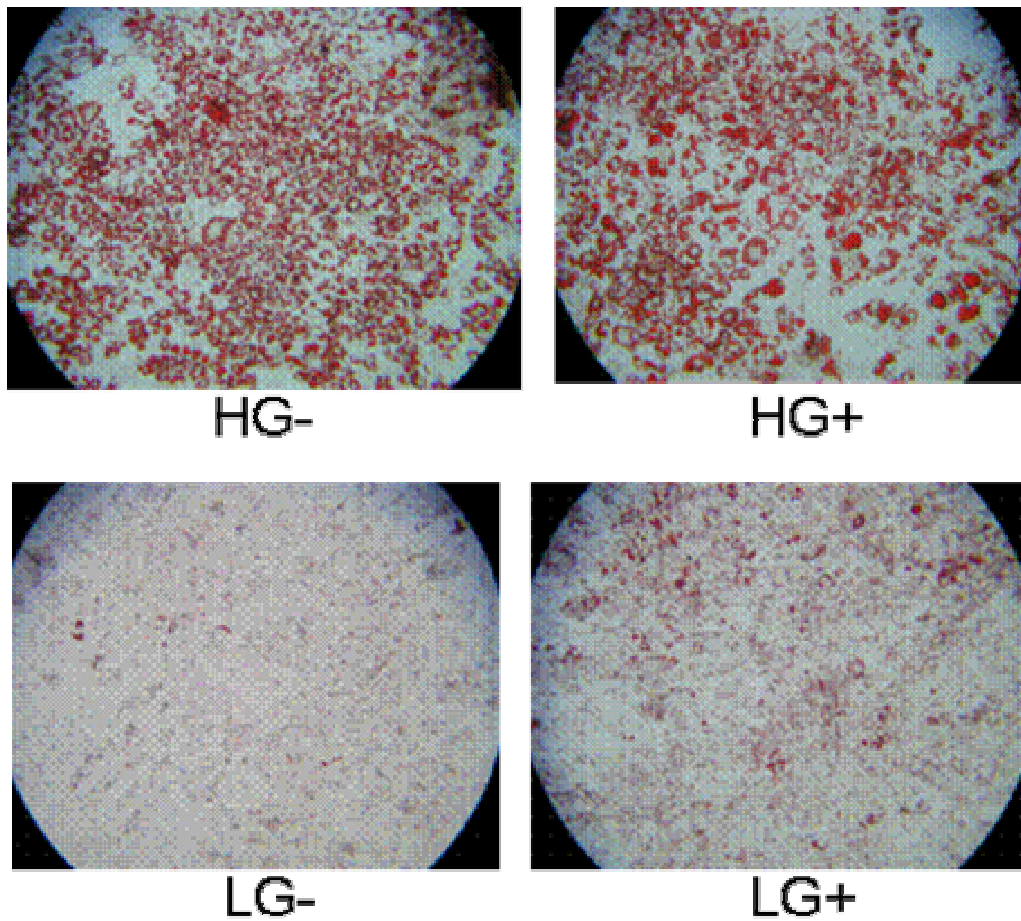


Figura 10. Diferenciación de las células 3T-L1 en presencia de glicina. La línea celular de ratón 3T3-L1 se cultivó en DMEM con 10% de SFB y se diferenciaron por 8 días, en diferentes condiciones de glucosa: alta concentración de glucosa (25.5 mM) sin glicina (HG-), alta concentración de glucosa con tratamiento de 10 mM de glicina (HG+), baja concentración de glucosa (5.5 mM) sin glicina (LG-) y baja concentración de glucosa con tratamiento de 10 mM de glicina (LG+). Las células se tiñeron con rojo oleoso.

Expresión de las adipocinas en cultivos de fibroblastos y adipocitos

La expresión de IL-6 se evaluó en estado de fibroblasto al día 0 de diferenciación con tratamiento de glicina 10 mM. En la Figura 11 se observa que el tratamiento con glicina 10 mM disminuye la expresión de IL-6 hasta en un 50% en condiciones de alta concentración de glucosa; el mismo fenómeno se presenta en los cultivos con baja concentración de glucosa tratados con glicina. En este caso la expresión de IL-6 disminuyó 38% y tales reducciones fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

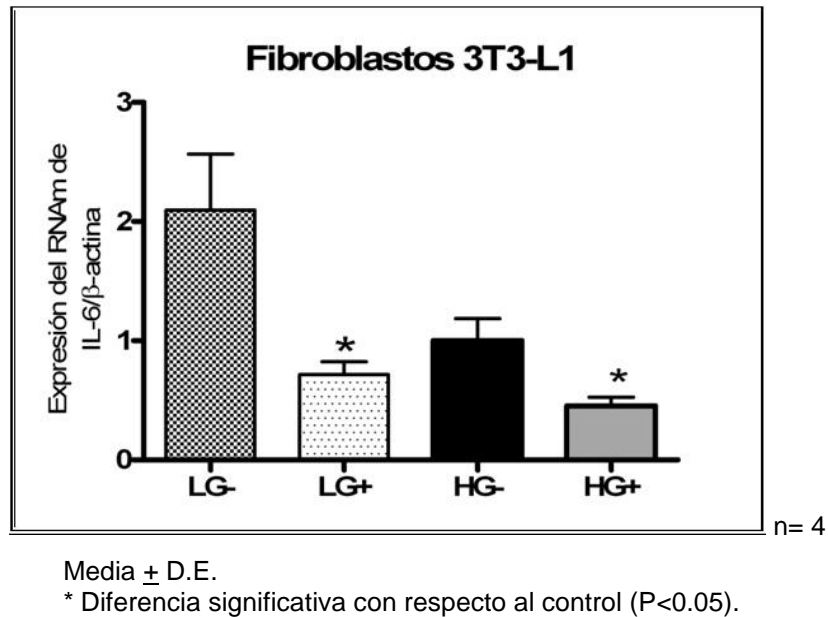
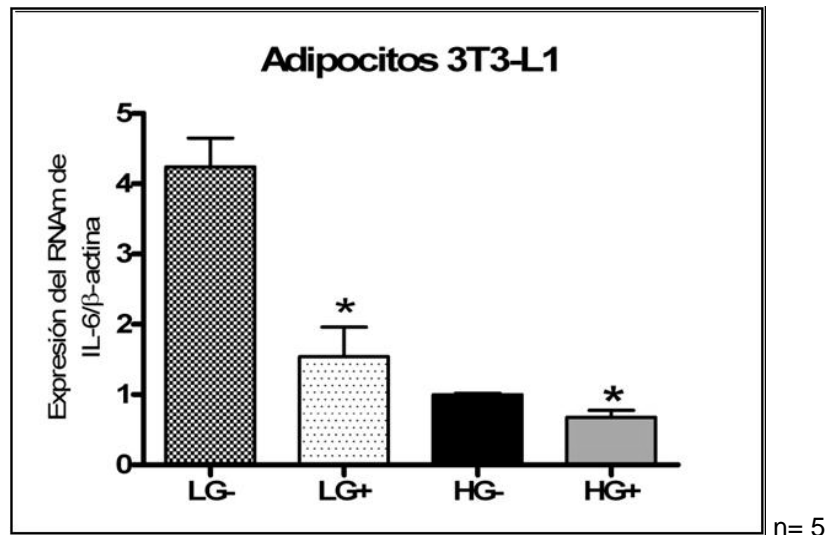


Figura 11. Expresión del RNAm de IL-6 en fibroblastos. Las células 3T3-L1 se trataron con 10 mM de glicina, en condiciones de alta (HG) y baja concentración de glucosa (LG). Antes de la diferenciación se cuantificaron los niveles de expresión del RNAm.

Un efecto similar se puede apreciar con los adipocitos (día 8); en los cultivos con baja concentración de glucosa IL6 se expresa más que en los de alta concentración de glucosa y el tratamiento con 10 mM de glicina genera reducciones estadísticamente significativas en la expresión de esta adipocina (Figura 12). Al comparar las Figuras 11 y 12 que corresponden a la expresión de IL-6 en células en estado de fibroblasto y en estado de adipocito, respectivamente, se puede apreciar que existe mayor expresión de esta citocina al finalizar la diferenciación (adipocito) en las cuatro condiciones de cultivo. En ambas etapas de diferenciación se logra observar una clara disminución en la expresión cuando los cultivos fueron tratados con glicina.



Media ± D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$).

Figura 12. Expresión del RNAm de IL-6 en adipocitos. Las células 3T3-L1 se cultivaron y se diferenciaron de fibroblastos a adipocitos, en presencia y en ausencia de 10 mM de glicina, en condiciones de alta (HG) y baja concentración de glucosa (LG). Se cuantificaron los niveles de expresión del RNAm.

La expresión de resistina en estado de fibroblasto se presenta en la Figura 13, en este caso, el tratamiento con glicina 10 mM ejerce su efecto reduciendo la expresión de esta citocina en estos cultivos con alta concentración de glucosa ($P < 0.05$), pero en cultivos con baja concentración de glucosa la expresión se mantiene constante. Sin embargo, en estado de adipocito los cultivos en alta concentración de glucosa presentan mayores niveles de expresión que los de baja concentración de glucosa y no se detectó ningún cambio significativo en la expresión de esta citocina por la presencia de glicina (Figura 14).

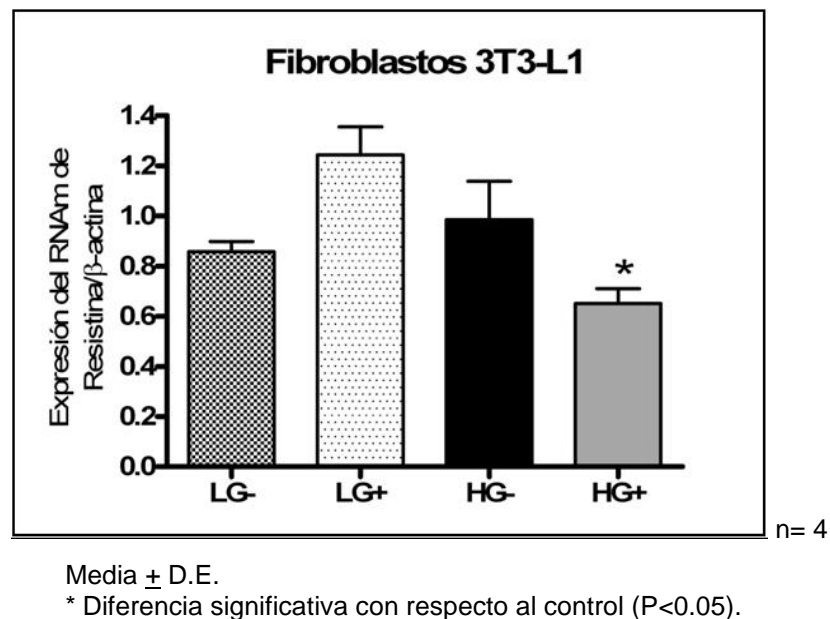


Figura 13. Expresión del RNAm de resistina en fibroblastos. Los fibroblastos (T0) tratados con 10mM de glicina se cultivaron en condiciones de alta (HG) y baja concentración de glucosa (LG). La expresión del RNAm se cuantificó antes de la diferenciación.

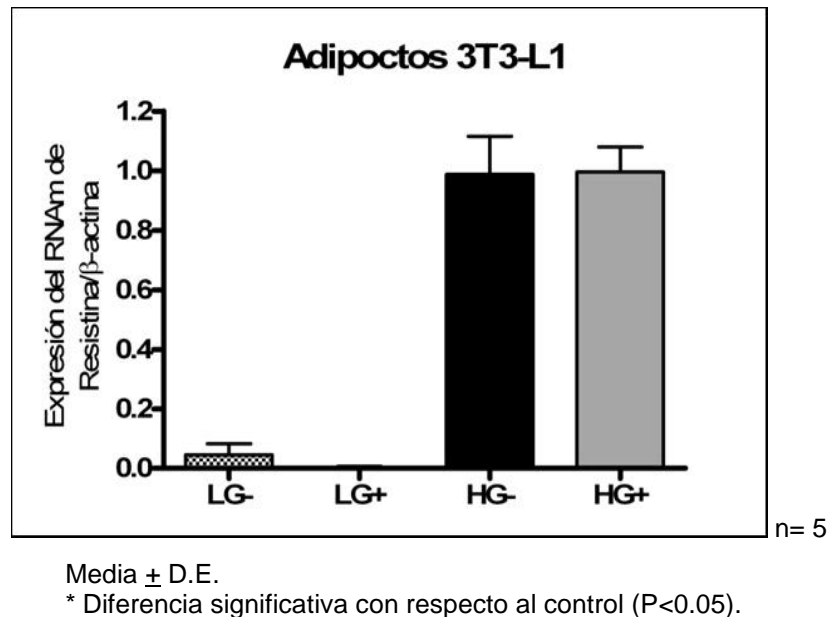
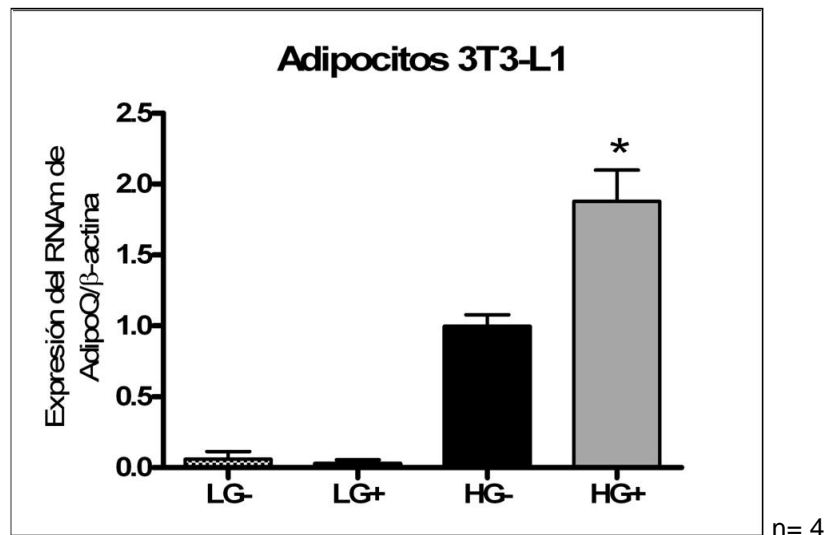


Figura 14. . Expresión del RNAm de resistina en adipocitos. Las células se cultivaron y diferenciaron (T8) en presencia y ausencia de 10mM de glicina en condiciones de alta (HG) y baja concentración de glucosa (LG). Los niveles de expresión del RNAm se cuantificaron en células diferenciadas.

En la Figura 15 se puede apreciar la expresión de adiponectina en estado de adipocito, en los cultivos tratados con glicina 10 mM. Se observa que el tratamiento con glicina induce un aumento en la expresión de esta citocina hasta en un 60%. Sin embargo, la expresión de adiponectina que existe en cultivos con baja concentración de glucosa es muy escasa comparada con la de alta concentración de glucosa y el tratamiento con glicina no induce modificaciones visibles en su expresión. La expresión de adiponectina en cultivos de fibroblastos es escasa, pues en los cultivos de baja concentración de glucosa que fueron pobremente diferenciados, según el marcador de diferenciación y su citología, la expresión de esta citocina es muy baja.



Media ± D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$).

Figura 15. Expresión del RNAm de adiponectina en adipocitos.

Las células 3T3-L1 (T8) se trataron con 10 mM de glicina, se cultivaron y diferenciaron en condiciones de alta (HG) y baja concentración de glucosa (LG), después de este proceso, se cuantificaron los niveles de expresión del RNAm.

Los niveles de expresión de $\text{TNF-}\alpha$ en estado de fibroblasto se muestran en la Figura 16, en donde se puede observar que aparentemente sus niveles disminuyen en cultivos de alta concentración de glucosa tratados con glicina. Sin embargo, sus niveles de expresión son bajos. Para aumentar los niveles de expresión, se trataron los cultivos con lipopolisacárido (LPS) y los niveles de expresión aumentaron considerablemente, pero no se observó ningún cambio significativo inducido por glicina. En estado de adipocito los niveles de expresión son muy semejantes y no se producen cambios significativos en presencia de glicina (datos no mostrados).

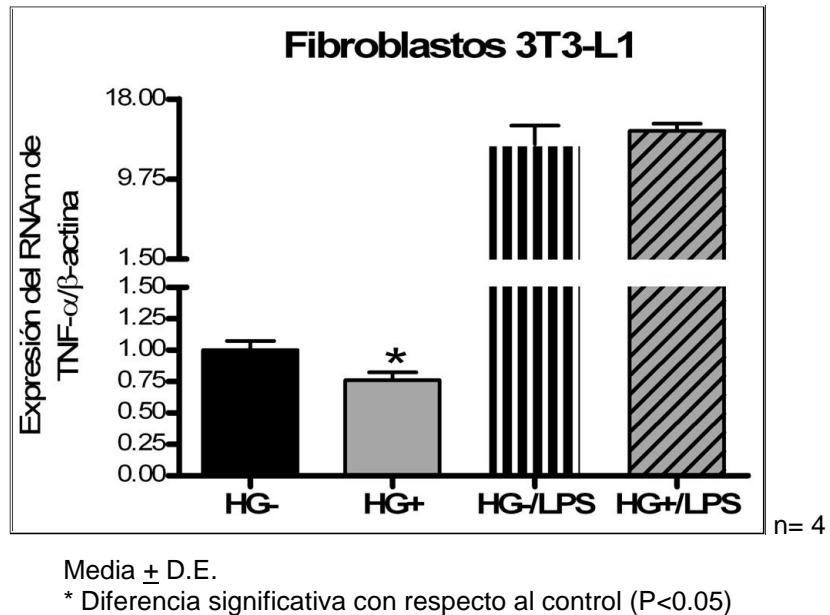


Figura 16. Expresión del RNAm de TNF- α , en fibroblastos. Las células se trataron con 10 mM de glicina en condiciones de alta concentración de glucosa (25.5 mM), en presencia y ausencia de lipopolisacárido, Se observa que este compuesto aumenta considerablemente la expresión de TNF- α .

Inducción de obesidad en ratones por el tratamiento con glutamato monosódico (Ob/GMS).

Se estandarizó la neurointoxicación con GMS en ratones de la cepa CD-1 para inducir obesidad desarrollada en la edad adulta. Una de las principales características anatómicas típicas de éste modelo es el acortamiento del cuerpo y de la cola, así como la ganancia en peso corporal y volumen. Tales características se pueden apreciar en la Figura 17, en donde se observa que el animal Ob/GMS llega a pesar hasta el doble que un animal sano.

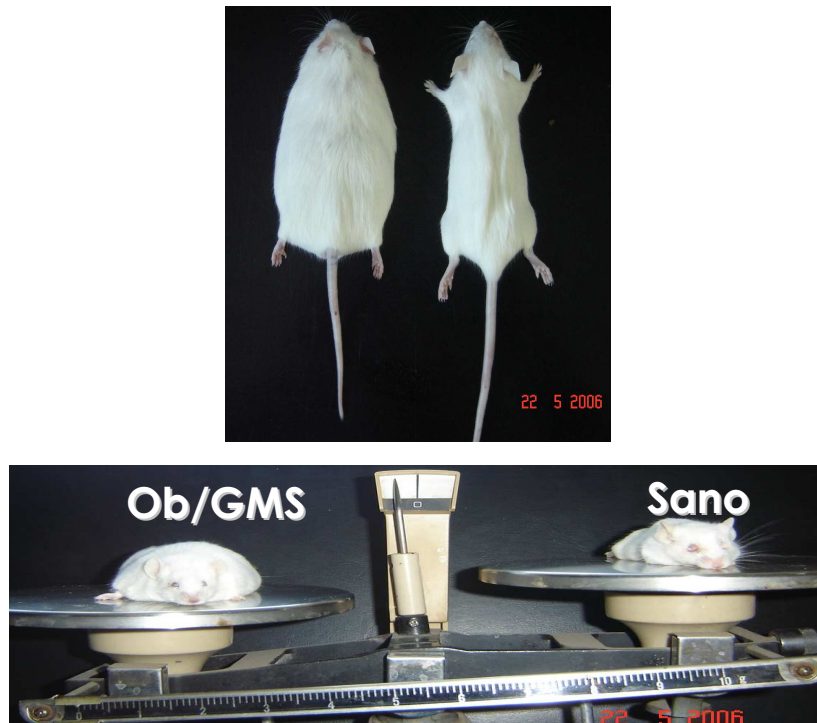


Figura 17. Ratones neurointoxicados con GMS a las 18 semanas de edad. En la fotografía se muestran un ratón sano y un ratón Ob/GMS con características singulares, como el acortamiento del cuerpo y de la cola, así como la ganancia de peso.

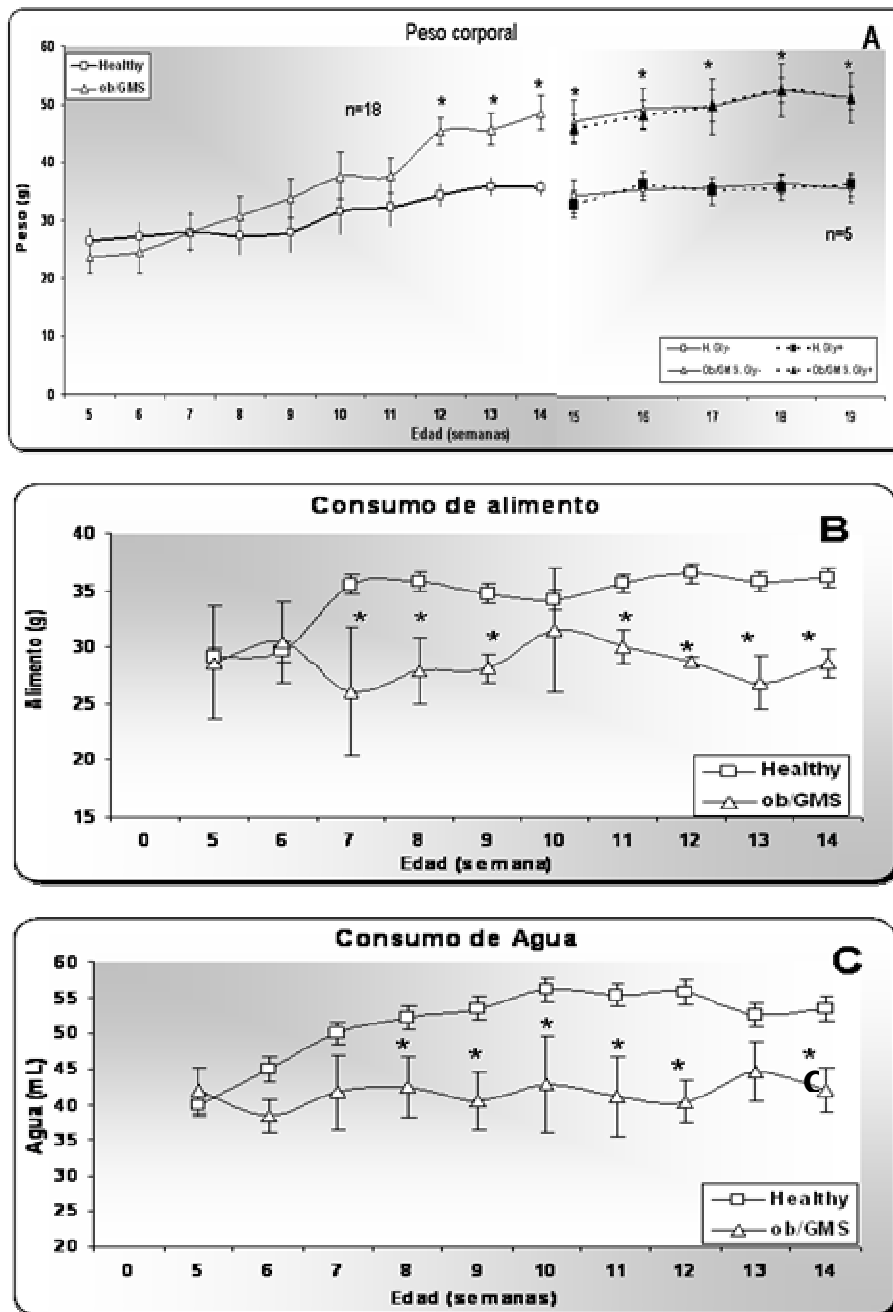
A lo largo de 18 semanas se cuantificó el peso corporal, el consumo de alimento y el consumo de agua. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18. Se puede resaltar que el incremento en peso sucede a partir de la semana 7, es decir, a un mes de haber recibido la administración de GMS, sin embargo las diferencias se hacen significativas hasta las 12 semanas de edad y a partir de este punto el incremento en peso se mantiene constante (Figura 18A).

Por otro lado, se determinó que los ratones Ob/GMS consumen menos alimento (Figura 18B) e incluso menos agua (Figura 18C) que los animales sanos. Así, su obesidad no se debe a un incremento en la tasa de alimentación y puede ser considerada de tipo hipofágica.

Se cuantificaron diversos parámetros bioquímicos a las 14 y 18 semanas de edad, tanto en ratones sanos como en Ob/GMS. En la Tabla 3 se pueden apreciar los valores promedio y la desviación estándar obtenidos de ambos grupos de animales, los cuales no presentan mucha variación entre ellos, aunque las dos transaminasas evaluadas se encuentran en menor cantidad en los ratones Ob/GMS. A las 18 semanas de edad, estos valores no sufrieron modificaciones importantes (datos no mostrados).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos (M \pm D.E.) evaluados a las 14 semanas de edad.

Animales estudiados	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Ácido urico (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	A1C (%)
Sanos	110.2 \pm 9.5	95.2 \pm 33.3	<2.0	<0.500	9.2 \pm 6.2	16.7 \pm 11.7	4.04 \pm 0.7
Ob/GMS	112.5 \pm 11.6	95.2 \pm 29.2	<2.0	<0.500	<2.25	<2.65	3.96 \pm 0.4

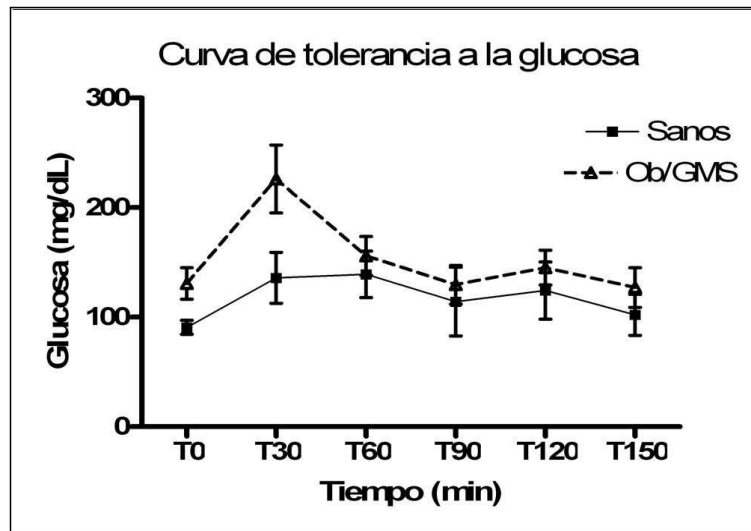


Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

Figura 18. Características de los ratones neurointoxicados con GMS. Peso corporal (A), consumo de alimento (B) y consumo de agua (C) de ratones Ob/GMS y sanos a lo largo de 18 y 14 semanas de edad.

Los resultados de las PTGO realizadas a las 14 y 18 semanas se muestran en las Figuras 19 y 20. Así mismo, se determinaron las concentraciones plasmáticas de insulina de 3 animales de cada grupo seleccionados al azar en diferentes tiempos durante el transcurso de la prueba de tolerancia a la glucosa. Se puede observar que los ratones sanos tratados con glicina (H Gly+) presentan mayor nivel de insulina ($P < 0.05$) que los no tratados, mientras que los ratones obesos (Ob/GMS) presentan hiperinsulinemia, aún sin glicina, lo que es característico de la resistencia a la insulina. Los que recibieron glicina muestran tendencia a incrementar sus niveles de insulina (Figura 21).

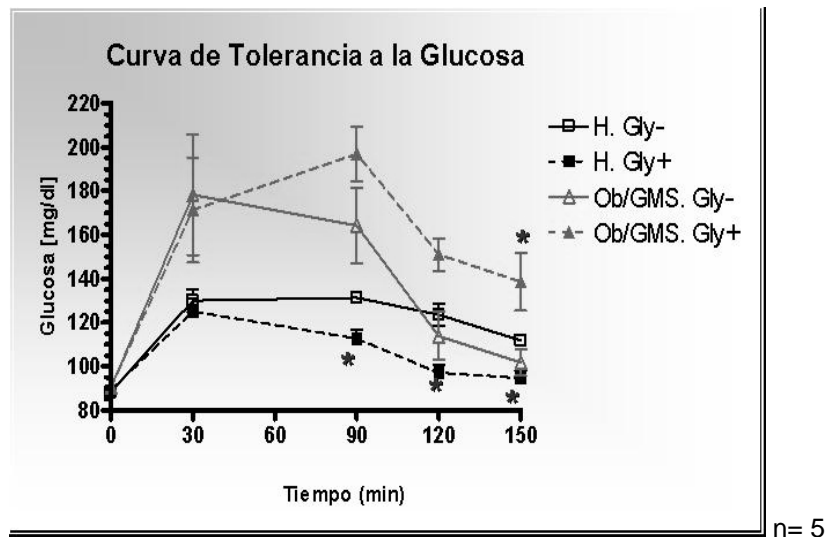


n= 18

Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

Figura 19. Curva de tolerancia a la glucosa. A los ratones sanos y Ob/GMS de 14 semanas de edad, se les determinó la concentración de glucosa plasmática a diferentes tiempos después de una carga de 2 g/kg de glucosa.

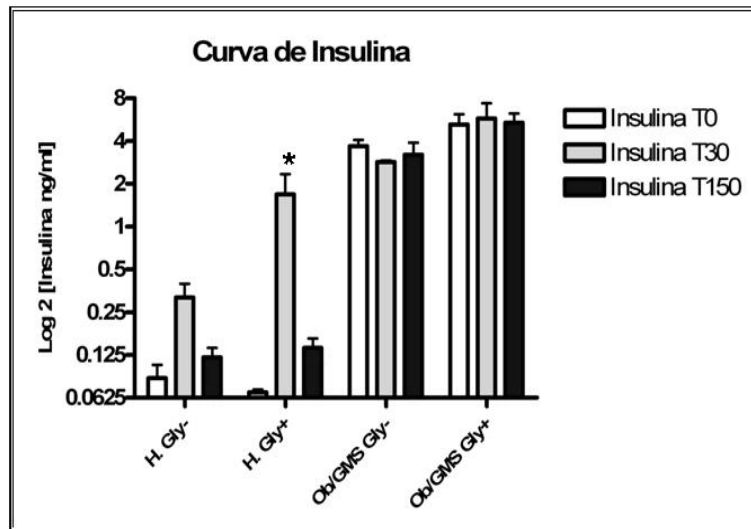


Media \pm S.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

Figura 20. Curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos y Ob/GMS a las 18 semanas de edad. La determinación se realizó como se indicó en la Fig. 19.

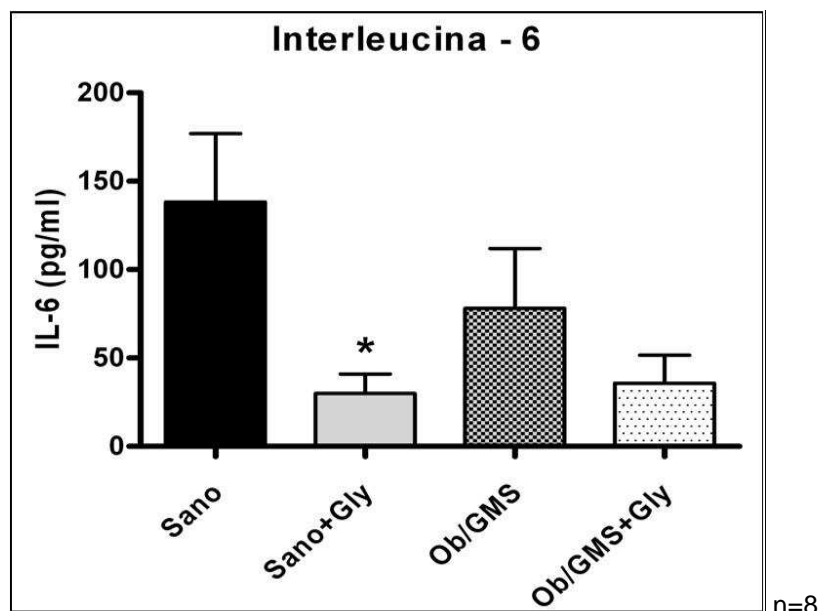
Los niveles plasmáticos de las diferentes citocinas estudiadas se cuantificaron por el método de ELISA. En la Figura 22 se muestran las concentraciones plasmáticas de IL-6, en donde se puede apreciar que tanto el grupo de animales sanos como el de obesos tratados con glicina presentan concentraciones plasmáticas bajas con respecto a su control. Sin embargo, también se logra apreciar que los niveles de IL-6 son más elevados en los grupos de animales sanos que en los obesos. Un efecto similar se observa en los niveles plasmáticos de resistina, aparentemente los animales sanos tienen mayores concentraciones plasmáticas que los obesos y el tratamiento con glicina disminuye las concentraciones de esta citocina en el grupo obeso. No obstante, en el grupo sano tratado con glicina sólo se aprecia una tendencia a disminuir (Figura 23).



Media \pm S.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

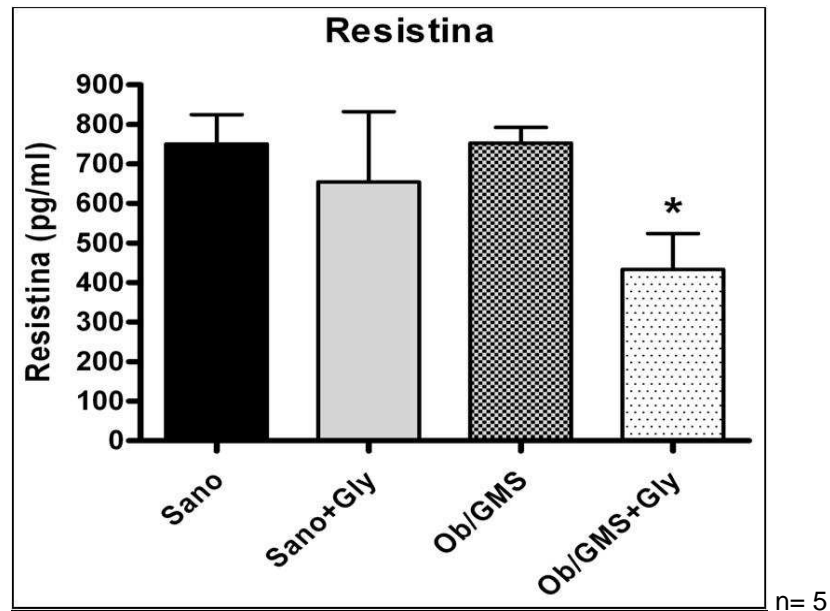
Figura 21. Niveles plasmáticos de insulina durante el curso de la curva de tolerancia a la glucosa. A los ratones sanos y Ob/GMS de 18 semanas de edad, se les determinó la concentración plasmática de insulina en los diferentes tiempos después de una carga de 2 g/kg de glucosa.



Media ± D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control (P<0.05)

Figura 22. Concentraciones plasmáticas de IL-6 en ratones sanos y Ob/GMS. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de la citocina en los ratones con 18 semanas de edad, sanos y Ob/GMS, después de 30 días de la administración oral de glicina, a dosis de 0.1 g/kg de peso corporal.

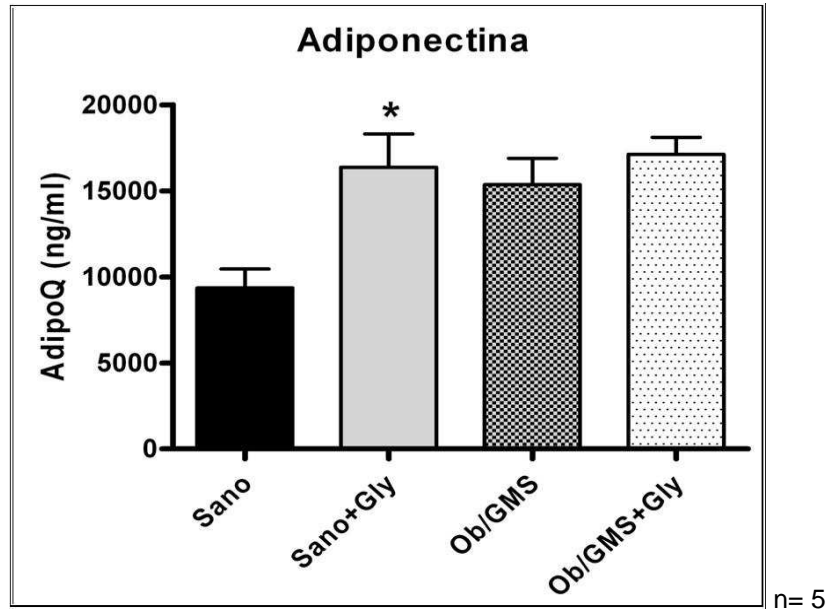


Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

Figura 23. Concentraciones plasmáticas de resistina en ratones sanos y Ob/GMS. La determinación de la citocina se realizó a los ratones bajo las mismas condiciones indicadas en la Fig. 22.

Al cuantificar las concentraciones plasmáticas de adiponectina se observa que los animales sanos tratados con glicina presentan mayores concentraciones plasmáticas de la citocina con respecto a su control. Sin embargo, los animales obesos también tienen niveles elevados aún sin tratamiento con glicina. Tales datos se muestran en la Figura 24. Los niveles plasmáticos de $\text{TNF-}\alpha$ son muy similares en los cuatro grupos y presentan una gran variabilidad sin efecto aparente en los grupos tratados con glicina (Figura 25).

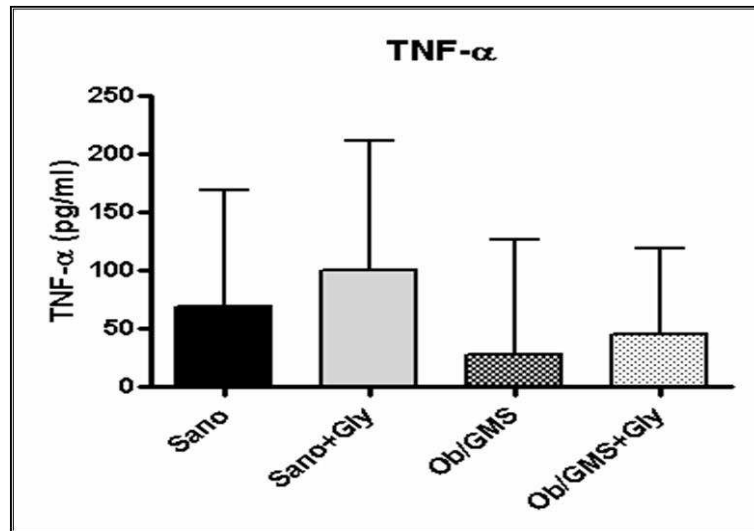


Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$)

Figura 24. Concentraciones plasmáticas de adiponectina en ratones sanos y Ob/GMS. La determinación de la adipocina se realizó en las condiciones ya indicadas en la Fig. 22.

Al finalizar el estudio con los animales tratados con glicina (18 semanas de edad), se obtuvieron muestras sanguíneas de cada uno de ellos y se sacrificaron para pesar los órganos más importantes: corazón, páncreas, pulmón, riñón, hígado y bazo. Tales resultados se muestran en la Figura 26.

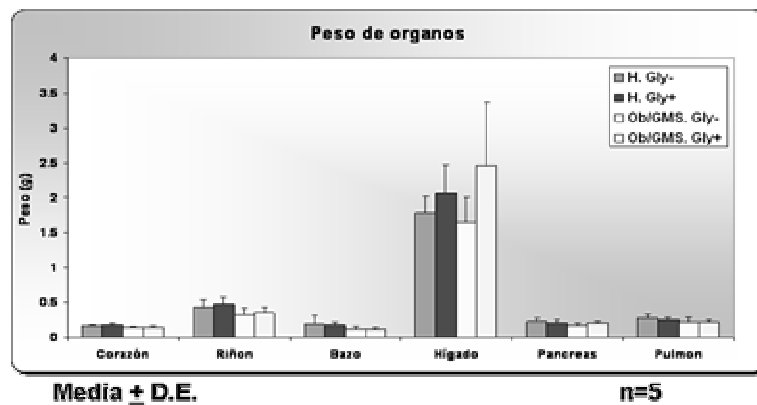


n= 5

Media \pm D.E.

* Diferencia significativa con respecto al control (P<0.05)

Figura 25. Concentraciones plasmáticas de TNF- α en ratones sanos y Ob/GMS. La determinación de la citocina se realizó bajo las mismas condiciones indicadas en la Fig.22.



Media \pm D.E.

n=5

Figura 26. Peso de diferentes órganos en los ratones sanos y Ob/GMS. Los animales se sacrificaron a las 18 semanas de edad, después de 30 días de administración con glicina a dosis de 0.1 g/kg, los órganos se disectaron y se cuantificó su peso.

8. DISCUSIÓN

En el transcurso de esta investigación se evaluó a la glicina como un agente antiinflamatorio, empleando como modelo *in vitro* células en cultivo de la línea de fibroblastos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos y como modelo *in vivo* animales obesos por la administración de GMS. El primer modelo se estudió en condiciones que tratan de simular la DT2 que se presenta en el humano (con hiperglucemia) y el segundo en condiciones de obesidad, esto con el fin de contribuir al conocimiento de ambas enfermedades, así como continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para su control.

Los adipocitos de la línea de fibroblastos 3T3-L1 son un modelo de tejido adiposo blanco; entre los cambios característicos en la diferenciación se observó la acumulación de gotas de grasa, congruente con la información que existe sobre esta línea celular (Gregoire *et al.*, 1998). Se detectó un aumento en los niveles de expresión del factor de transcripción PPAR- γ , durante el avance de la diferenciación, que comprende cuatro etapas principales (fibroblasto, preadipocito, adipocito inmaduro y adipocito maduro). Tales etapas fueron evidentes con acumulación de lípidos, que se evidenciaron con la tinción con el colorante rojo oleoso. Por otro lado, en los cultivos en condiciones de baja concentración de glucosa (LG) se observó una expresión muy baja de PPAR- γ después de ocho días de diferenciación, lo cual concuerda con la escasa acumulación de gotas de grasa en estos cultivos (Figura 10), concluyendo que existe baja diferenciación en ellos ya que los niveles de este gen son similares a los presentes en estado de fibroblasto. Lo anterior se correlaciona con la extremadamente baja expresión de adiponectina en estos cultivos, confirmando lo ya reportado, que PPAR- γ regula la expresión de adiponectina (Gustafson *et al.*, 2003).

Una de las principales aportaciones de este trabajo es la demostración de un incremento significativo en la expresión de adiponectina (citocina antiinflamatoria) debido al tratamiento con glicina en los adipocitos. Lo anterior es una evidencia más de las propiedades de la glicina como agente antiinflamatorio. Debido a que las concentraciones plasmáticas de adiponectina se han reportado mas bajas en pacientes obesos y con DT2, comparada con sujetos sanos y delgados (Cruz *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2001), nuestros datos sugieren que la administración de glicina a ese tipo de pacientes ayudaría a aminorar su estado inflamatorio y las consecuencias subsecuentes.

Por otro lado, en estos cultivos se detectó un descenso de los niveles de expresión de IL-6, tanto en estado de adipocito como en fibroblasto, que se puede correlacionar con la actividad antiinflamatoria que tiene la glicina. En los cultivos con baja concentración de glucosa (LG+), se demostró que la glicina disminuyó significativamente la expresión de IL-6, con reducciones significativas en estado de fibroblasto ($P < 0.05$). Cabe señalar que en este estado las células están poco diferenciadas, como lo muestran los bajos niveles de expresión de PPAR- γ , lo que sugiere que, además de la participación del factor de transcripción Nf- κ B en la regulación de IL-6, también puede intervenir otra vía aún no explorada (Wulster-Radcliffe *et al.*, 2004; Fasshauer *et al.*, 2003a; Fasshauer *et al.*, 2003b).

Se considera que la resistina se comporta como una citocina proinflamatoria (Fasshauer y Paschke, 2003). El tratamiento con glicina disminuye la expresión de su RNAm en los cultivos en condiciones de alta concentración de glucosa ($P < 0.05$), no así en los de baja concentración de glucosa. Se puede inferir, que el posible efecto que genera el aminoácido sobre esta citocina sólo se da en condiciones de hiperglucemia y/u obesidad, debido a que en estas condiciones patológicas se posee mayor número de adipocitos; en cambio, en condiciones de baja concentración de glucosa o normoglucémicas

se tiene un buen número de fibroblastos, además de tener un equilibrio dinámico entre la cantidad de fibroblastos y de adipocitos.

Los niveles de expresión de TNF- α son muy bajos en esta línea celular, a pesar de ello se logró observar que la glicina provoca un ligero descenso en los niveles de expresión, lo cual es muy importante ya que es considerada como una de las citocinas proinflamatorias, con niveles elevados en sujetos obesos (Cruz *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2001). Tal efecto antiinflamatorio de glicina sobre esta citocina es indetectable cuando a los cultivos celulares se les trató con lipopolisacárido (LPS), un potente inductor inflamatorio, por lo que los niveles de expresión son muy similares entre los cultivos con y sin tratamiento con glicina tratados con LPS.

En relación a los estudios con ratones Ob/GMS, se encontró que presentan obesidad severa en la edad adulta y determinamos que a partir de los 4 ½ meses desarrollan intolerancia a la glucosa, como lo reportan Mello y col. (2001); además, desde los 3 ½ meses detectamos alteración en la curva de tolerancia a la glucosa, la cual se agrava a los 4 ½ meses. Así mismo, se logró confirmar que este modelo presenta hiperinsulinemia, como lo había descrito Hirata y col. (1997), Dolnikoff y col. (2001) y Nagata y col. (2006). Con estos datos se puede suponer que los animales son resistentes a la insulina debido a que las concentraciones plasmáticas de insulina son altas comparadas con las del control, y se consideran éstas como un indicio de resistencia a la insulina (Sanchez-Recalde y Kaski, 2001).

Al cuantificar los parámetros bioquímicos, las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos no se encontraron fuera de rango de normalidad e incluso son muy parecidas a las de los ratones sanos. Por su parte, parámetros como la creatinina y el ácido úrico también están en rangos normales al igual que en el grupo sano, los únicos parámetros que divergen con respecto al

grupo sano son ambas transaminasas, tanto TGO como TGP, que se encuentran en baja concentración. La hemoglobina glucosilada se encuentra en rango de normalidad para los ratones Ob/GMS, dato que correlaciona con sus niveles normales de glucosa. Después del tratamiento con glicina, a las 18 semanas, no se detectaron cambios importantes en estos parámetros.

Los animales Ob/GMS presentaron un aumento de peso del 22% con respecto al control, lo cual fue significativo ($P < 0.05$) desde los 3 meses de vida y el incremento en peso fue constante hasta alcanzar una meseta en el peso que es un patrón característico de los mamíferos y de otras especies. Esto se correlaciona ampliamente con las características morfológicas del modelo, como son acortamiento del cuerpo y de la cola (Figura 17). Así mismo, el bajo consumo de alimento y agua muestra que la obesidad desarrollada es de tipo hipofágica y que se debe a una desregulación en el metabolismo (Dolnikoff *et al.*, 2001; Campos-Sepulveda *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2006). Los ratones Ob/GMS son hiperinsulinémicos y el tratamiento con glicina no produce ningún efecto sobre los niveles de esta hormona, aunque existe una ligera tendencia a elevarlos. En el caso de los ratones sanos que fueron tratados con glicina no se observa ningún cambio en los niveles basales de insulina, pero al dar la carga de glucosa (curva de tolerancia), se logró identificar un incremento estadísticamente significativo en la concentración de insulina. Como conclusión de estos datos se puede decir que la glicina tiene la capacidad de elevar los niveles de la hormona en un sistema biológico sano, no así en un organismo en el cual ya presenta altas concentraciones de la hormona. Este hecho se había descrito en una línea celular secretora de insulina, en donde se observó que el tratamiento con este aminoácido induce ligeros incrementos en la secreción de esta hormona (Mc Clenaghan *et al.*, 1996). Todo este fenómeno se ve reflejado en la PTGO realizada a los grupos de animales a las 18 semanas, ya que en los animales sanos tratados con glicina disminuyen más rápidamente sus concentraciones plasmáticas de glucosa, mientras que en los grupos obesos

con y sin tratamiento con glicina su respuesta es muy similar entre ellos. Aún no se conoce el mecanismo de acción a través del cual la glicina genere tal efecto sobre la secreción de la insulina, pero se puede involucrar al receptor de glicina de tipo 2 (GLYT2) el cual se expresa principalmente en el sistema nervioso central, pero también se ha detectado en el hígado y páncreas, e incluso específicamente en los islotes de Langerhans (Gammelsaeter *et al.*, 2004).

Varios modelos de roedores obesos convergen en una característica muy peculiar, la cual es que son resistentes a la acción de la leptina y, en algunos casos, presentan concentraciones muy elevadas de esta citocina. Se ha llegado a pensar que el modelo de obesidad debido a la administración de GMS, también posee esta característica ya que la leptina es una de las moléculas más importantes en la regulación metabólica de la ingesta de alimento. La leptina es secretada principalmente por los adipocitos y su concentración es directamente proporcional a la masa del TA, aunque también puede ser secretada por células inmunocompetentes y endoteliales (Considine *et al.*, 1996). La leptina circula junto con la forma soluble de su receptor y ejerce su función al unirse a sus receptores (Ob-R). El mejor caracterizado es el Ob-Rb que activa la vía de señalización del sistema de Jak-Stat (Pittas *et al.*, 2004). La leptina participa en la regulación de la ingesta de alimentos a largo plazo, el peso corporal, el gasto energético y las funciones neuroendocrinas. Sin embargo, es paradójico el hecho de que la leptina se encuentra sobreexpresada en el TA en la mayoría de los obesos, lo que ha llevado al desarrollo del concepto de la resistencia a la leptina. A nivel fisiológico, la leptina induce un efecto sensibilizador de insulina, al promover la oxidación de ácidos grasos libres y la reducción de la acumulación de grasa ectópica en tejidos no adiposos (Muoio *et al.*, 1997; Shimabukuro *et al.*, 1997). A nivel molecular, este efecto se encuentra mediado directamente por leptina a través de la activación de AMPK en el músculo esquelético e indirectamente en el eje del sistema nervioso simpático hipotalámico (Minokoshi *et al.*, 2002). Lo anterior favorece la

inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria por malonil CoA y la oxidación de ácidos grasos (Ebihara *et al.*, 2001; Shimomura *et al.*, 1999). Un mecanismo planteado de la resistencia a leptina puede ser la inducción del supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS-3), que puede inhibir la señalización intracelular de leptina (Bjorbaek *et al.*, 1999). Los ratones Ob/GMS pueden tener resistencia a la leptina, y esta a su vez puede generar todos esos cambios característicos del modelo, como lo es la hipofagia, la obesidad, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia. Por lo tanto, en nuevas investigaciones resulta relevante considerar la influencia de la glicina en esta citocina empleando el modelo Ob/GMS.

En el peso de los órganos de ambos grupos de animales no se observaron cambios significativos; en los animales obesos existe una ligera tendencia a presentar órganos menos pesados, sin embargo, el hígado aumentó ligeramente de tamaño por efecto de la glicina (datos estadísticamente no significativos). En general, el ratón Ob/GMS ser considerado un buen modelo para el estudio del perfil inflamatorio característico de la obesidad, resistencia a la insulina e incluso de la DT2, como lo propone Nagata y *col.* 2006. El modelo experimental permitió evaluar el efecto de la glicina sobre la producción y secreción de las adipocinas. En este rubro, se logró cuantificar los niveles plasmáticos de las citocinas estudiadas por la técnica de ELISA. Se pudo observar que la glicina provoca disminución en los niveles plasmáticos de IL-6, tanto en los animales sanos como en los obesos. Así mismo se observó que el efecto de la glicina también es sobre las concentraciones plasmáticas de resistina ya que en los animales Ob/GMS tratados con glicina se detectaron niveles plasmáticos más bajos que los del control, mientras que en el grupo sano sólo se observó una ligera tendencia a disminuir.

Se observó que la glicina provoca un aumento en las concentraciones plasmáticas de adiponectina en ratones sanos, pero en los ratones Ob/GMS; sin embargo se encontró que este modelo animal tiene niveles muy elevados de adiponectina, lo cual puede estar relacionado con la alta actividad de uno de sus reguladores más importantes, el factor de transcripción PPAR- γ , encargado de la adipogénesis. El hecho de encontrar concentraciones plasmáticas elevadas de adiponectina en los ratones Ob/GMS con respecto a los animales sanos, no correlaciona con el perfil inflamatorio que se ha descrito para individuos obesos o con DT2, en donde se ha encontrado que las citocinas proinflamatorias están elevadas y las antiinflamatorias (como adiponectina) disminuidas (Cruz *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2001); sin embargo, esto puede ser un fenómeno característico del modelo, como lo es para algunos otros modelos de obesidad, tal es el caso de las ratas Zucker (fa/fa) que presentan concentraciones plasmáticas de adiponectina muy elevadas con respecto a las ratas Zucker delgadas y niveles de expresión del RNAm bajos (Oana *et al.*, 2005).

Por último, los niveles plasmáticos de TNF- α no se modifican por el tratamiento con glicina, detectándose una gran variabilidad biológica. Es probable que aumentando el número de datos se pueda disminuir esta variabilidad y se puede detectar algún efecto sobre esta citocina. De cualquier manera, en general los resultados dejan ver que la glicina tiene un efecto sobre la expresión de citocinas en los cultivos celulares y que este efecto también se presenta en algunas citocinas liberadas al torrente sanguíneo en los modelos animales.

Un posible mecanismo de acción para explicar el efecto de la glicina sobre las adipocinas es que en las células eucariotas la expresión de los genes se controla por los factores de transcripción, que son proteínas con la capacidad de formar complejos con el DNA, pues reconocen secuencias específicas

localizadas en la región promotora de los genes, y una vez unidos se desencadenan una serie de eventos moleculares que culminan con la inducción de la expresión de ciertos genes. Un ejemplo de estos factores es la familia Rel/Nf- κ B, que regula la actividad transcripcional de los genes de las citocinas que participan en la respuesta inflamatoria (Matilla *et al.*, 2002). La glicina podría intervenir en algún punto del mecanismo de regulación transcripcional, lo cual debe ser determinado en estudios posteriores.

Los resultados del presente trabajo demuestran que la glicina tiene un efecto sobre el estado inflamatorio de ambos modelos ya que induce disminución de IL-6 y resistina, así como aumento de adiponectina, tanto en los niveles de expresión cuantificados *in vitro*, como en algunos de los niveles plasmáticos cuantificados *in vivo*. Aunque se puede concluir, por tanto, que la glicina tiene efecto antiinflamatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, aún quedan muchas preguntas por responder, lo que nos lleva a plantear nuevas investigaciones. Por ejemplo, aquellas referentes al balance energético, en el que participan moléculas encargadas de la regulación de citocinas, como es el caso de las isoformas del receptor activador de proliferación de peroxisomas (PPAR's), así como en lo que se refiere a la evaluación de la influencia de la glicina sobre las proteínas desacoplantes de la membrana mitocondrial (UCP's) y su implicación en el estado inflamatorio presente en los pacientes obesos. Por último, para valorar si la administración de glicina puede ser considerada una alternativa de tratamiento útil en la obesidad y la DT2, es necesario realizar también los estudios farmacocinéticos y toxicológicos pertinentes sobre éste aminoácido, en diferentes modelos de experimentación.

9. CONCLUSIONES

- La glicina disminuye significativamente los niveles de expresión de IL-6 y resistina en cultivos de fibroblastos, sin afectar los de TNF- α .
- La glicina reduce los niveles de expresión de IL-6 y TNF- α , y aumenta los de adiponectina (incrementando la expresión de PPAR- γ), sin afectar los de resistina en cultivos de adipocitos.
- La glicina estimula la secreción de insulina en los ratones sanos durante la PTGO, lo que provoca que el pico hiperglucémico sea de menor intensidad.
- Las concentraciones plasmáticas de adiponectina son más elevadas en los ratones Ob/GMS que en los sanos.
- La glicina disminuye significativamente las concentraciones plasmáticas de IL-6 y aumenta las de adiponectina en ratones sanos, sin afectar los niveles de resistina y TNF- α .
- La glicina reduce significativamente las concentraciones plasmáticas de resistina en ratones Ob/GMS, sin afectar los niveles de adiponectina, IL-6 y TNF- α .
- No existen diferencias importantes en los parámetros bioquímicos de los ratones Ob/GMS comparados con los de ratones sanos, ni con el tratamiento con glicina.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas** A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1991). Cellular and molecular immunology. Ed. W. B. Saunders. E.U.A.
- Alvarado** Vásquez N., Zambudio P., Cerón E., Vanda B., Zenteno E., Carvajal Sandoval G. (2003). Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp. Bioch Physiol Part. C.* 134: 521-527.
- (ADTNNRHI)** American Diabetes Association Translation of the Diabetes Nutrition Recommendations for Health Care Institutions. (1999). *Diabetes care* 22: S46-8.
- Aronson** D, Rayfield EJ. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovas Diabetol* 1: 1-10.
- Arterburn** D. and Hitchcock P. (2001) Obesity. *BMJ* 322: 1406-1409
- Bloomgarden** ZT. (2003). The endocrine Society Meeting: Topics in Insulin Sensitivity and Hypertension. *Diabetes care* 26: 2679-2668.
- Bjorbaek**, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D., and Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274: 30059-30065.
- Campos-Sepulveda** E., Ayala Guerrero F., Rubio Poo C., Roman Ramos R. (2002). Neonatal monosodium glutamate increases ethanol susceptibility effects in adult mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 45: 44-46.
- Chomczynski** P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem.* 162: 156-159.
- Considine**, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., and et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.

Cruz M, García-Macedo R, García-Valerio Y, Gutierrez M, Medina-Navarro R, Duran G, Wacher N, Kumate J. (2004). Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in mexican children. *Diabetes care* 27:1451-1453.

de Carvalho-Papa P, Vargas AM, da Silva JL, Nunes MT, Machado UF. (2002). GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. *Life Sci.* 6: 1917-28.

de Mello Ma., de Souza CT., Braga LR., dos Santos JW., Ribeiro IA., Gobatto CA. (2001). Glucosa tolerante and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 33: 63-71.

Dolnikoff M., Martín-Hidálgo A., Machado UF., Lima FB., Herrera E. (2001). Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Internat. J. Obes.* 25: 426-433.

Ebihara, K., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Shintani, M., Miyanaga, F., Aizawa-Abe, M., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., et al. (2001). Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes* 50: 1440-1448.

Eleftheriour F., Takeda S., Liu X., Armstrong D., Karsenty G. (2003). Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinol.* 144: 3842-3847.

Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001a). Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507: 142-146.

Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001b). Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 1027-1031.

Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1084-1089.

Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003b). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 1045-1050.

Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., and Paschke, R. (2003a). Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35: 147-152.

Fasshauer, M., and Paschke, R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetología* 46: 1594-1603.

Fernández-Real JM., Broch M., Ricart W., Gutiérrez R., Casamitjana R., Vendrell J., *et al.*, (1998). Plasma levels of the soluble fraction of Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and insulin resistance. *Diabetes* 47: 1752-1762.

Gammelsaeter, R. et al. (2004) Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *J. Cell Sci.* 117: 3749–3758.

González HM, Bastidas RB, Ruiz MB, Godínez S, Panduro A Funciones endocrinas de la célula adiposa (2002). *Rev Edocrinol Nutr* 10: 140-146

Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.

Gustafson, B., Jack, M. M., Cushman, S. W., and Smith, U. (2003). Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 933-939.

Haffner S. (1998). Management of Dyslipidemia in Adults with Diabetes. *Diabetes care* 21: 160-78.

Hirata AE., Andrade IS., Vaskevicius P., Dolnikoff MS. (1997). Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 671-674.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science* 259: 87-91.

Hotamisligil GS., Arner P., Atkinson RL., Spiegelman BM. (1997). Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* 46: 451-455.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 271: 10697-10703.

Junqueira, L.C. and J. Carneiro. *Histología Básica.* (1987) México:Salvat Editores,., 127-132.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E745-E751.

Kristiansen Ole P. and Mandrup-Poulsen Thomas. (2005). Interleukin-6 and diabetes. The good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes.* 54:suppl 2.

Lin Y., Berg A., Iyengar P., Lam T., Giacca A., Combs T., Rajala M., Du X., Rollman B., Li W., Hawkins M., Barzilai N., Rhodes C., Fantus G., Brownlee M., Sherer P. (2005).

The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280: 4617-4625.

Matilla B, Mauriz J.L., Culebras J.M. Gallego J., González P. (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr. Hosp.* 1: 2-9.

Mc Cleenaghan NH, Barnett CR, O'Hare FPM, Flat PR. (1996). Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. *J Endocrinology* 151: 349-357.

Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., and Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-343.

Mohamed Ali V, Goodrick S, Rawesh A. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 4196-4200.

Muoio, D. M., Dohm, G. L., Fiedorek, F. T., Jr., Tapscott, E. B., Coleman, R. A., and Dohn, G. L. (1997). Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-1363.

Nagata M., Susuki W., Iisuka S., Takeda S., Aburada M. y Miyamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. (2006). *Exp. Anim.* 55: 109-115.

Nakayama D., Magami Y., Azuma T., Inokuchi H., Furukawa M., Ohyashiki J., Yoshimoto T., Mizuguchi J., Moriyasu F., Kawai K., i Hattori T. (2003). Turnover of Acinar and Islet Cells in the Pancreas of Monosodium Glutamate–Treated Obese Mice. *Obes. Res.* 11: 87-94.

Nathan D. (1998). Some answers, more controversy, from UKPDS *Lancet* 352: 832-3.

Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M. (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism*. 54: 995-1001.

Ouchi N., Kobayashi H., Kihara S., Kumada M., Sato K., Inoue T., Funahashi T., Walsh K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279: 1304-1309.

Patti M.E. , Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR. (1998). Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest*. 101: 1519–1529.

Pittas, A. G., Joseph, N. A., and Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 447-452.

Recasens M., Ricart W., Fernandez-Real JM. (2004). Obesidad e inflamación. *Rev Med Univ. Navarra*. 48: 49-54.

Remke H, Wilsdorf A, Muller F. (1988). Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol*. 33: 223-32.

Reusch JEB (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?. *J Clin Invest*. 112: 986-988.

Rivera-Dommarco J, Barquera S, Campirano F, Campos-Nonato I, Safdie M, Tovar V. (2002). The epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr*.14: 113-122.

Rotter V, Nagaev I, Smith U. (2002). Interleukin-6 (IL-6) reduces gene and protein expression of IRS-1 and GLUT4 and is overexpressed in human fat cells from insulin resistant subjects. *Diabetes*. 51: A303.

Saltiel A.R., Kahn R. C. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414: 799-805.

Sánchez M. Fausto, García M. Rebéca, Alarcón A. Francisco J., y Cruz L. Miguel. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. Gaceta médica de México. 141: 505-512.

Sanchez-Recalde A. y Kaski Juan C. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria. (2001) Rev, Esp. Cardiol. 54: 751-763

Schulze M., Rimm E., Shal I., Rifal N., Hu F. (2004). Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. Diabetes Care 27: 1680-1688.

Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. Diabetes 51: 3391-3399.

Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M. Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C. B., and Unger, R. H. (1997). Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 94: 4637-4641.

Shojima N, Sakoda H, Ogihara T. (2002). Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. Diabetes 51: 1737-1744.

Singelton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. (2003). Microvascular complications of impaired glucose tolerance. Diabetes 52: 2867-2873.

Stern M. (1996). Do non-insulin dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease share common antecedents?. Ann Intern Med.124: 110-16.

Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Sprucen LA, Greenbaum LE, Lambris JD. (2003). The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. J Exp Med.198: 913-923.

Thomson Agustin. (1994). The cytokine handbook. Ed. Academic Press. 2da. Edición. E.U.A.

Traxinger, R.R., and S. Marshall. (1989). Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J. Biol.Chem.* 264: 20910–20916.

(UKPDS) The United Kingdom Prospective Diabetes Study. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPD 33). *Lancet* 352: 837-853.

Wang B., Jenkins J., Trayhurn P. (2005). Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF α . *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 288: E731-E740.

Wellen KE, Hotamisligil GS. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112: 1785-1788.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S. (2002). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1930-1935.

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulate cytokines in porcine macrophages (2004). *Biochem Biophys Res Commun*;316: 924-929.

Xu H., Uysal T., Becherer D., Arner P., Gökhan S., Hotamisligil GS. (2002). Altered tumor necrosis factor- α processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF- α in obesity. *Diabetes* 51: 1876-1883.

Yamashina S, Konno A, Wheeler MD, Rusyn I, Rusyn EV, Cox AD, Thurman RG. (2001). Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr Cancer* 40: 197-204.

Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Terauchi Y., Kubota N., *et al.*, (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Med.* 7: 941-946.

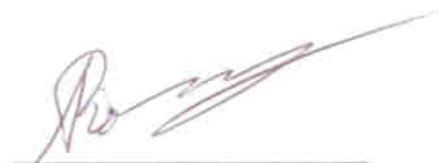
Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaal H, Bradford B, Lemasters JJ. (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6: 229-240.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada Influencia de la glicina sobre la expresión de adipocinas de ratón: estudio *in vivo* e *in vitro*. Con fecha 22 de Marzo de 2007.”

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor titular C
Jefe del Laboratorio de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
rrr@xanum.uam.mx

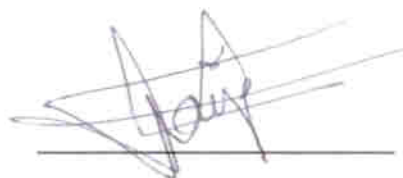
(Presidente)



Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda

Profesor asociado C
Jefe del Laboratorio de Toxicología
Dpto. de Farmacología. Fac. de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
casam@servidor.unam.mx

(Secretario)



Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular A
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades.
CMN SXXI. IMSS
mcruzl@yahoo.com.mx

(Vocal)

