



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T É S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

M. en B.E. Erika Contreras Nuñez.

**REGULACIÓN DE LA VÍA DE TNF- α /NF κ B POR
ACCIÓN DE LA GLICINA EN ADIPOCITOS**

Co-Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Dr. Miguel Cruz López

Asesor:

Dr. Gerardo Blancas Flores

Ciudad de México., a 19 de Marzo del 2018

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada a la alumna Erika Contreras Nuñez con el Número de Becario: 234171.

Fondo de Investigación en Salud.

SALUD-2013-C01-201471

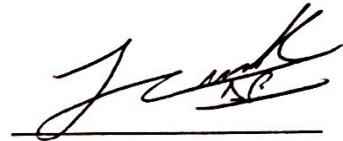
(FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE).

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Aprobó la tesis titulada “REGULACIÓN DE LA VÍA DE TNF- α /NF κ B POR ACCIÓN DE LA GLICINA EN ADIPOCITOS” que presentó la M. en B.E. Erika Contreras Nuñez el día 19 de Marzo del 2018.

Dr. Julio César Almanza Pérez (Presidente)

Profesor titular C
Laboratorio de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
julcesarmac2@yahoo.com.mx



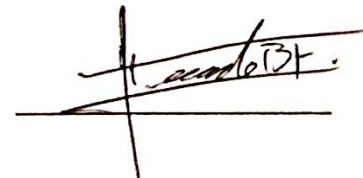
Dr. Fausto Sánchez Muñoz (Secretario)

Investigador en Ciencias Médicas D
Dpto. Inmunología.
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
fausto@yahoo.com



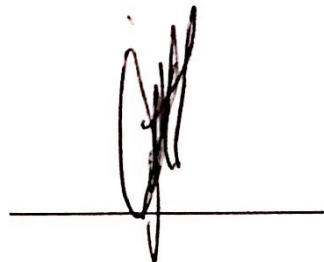
Dr. Gerardo Blancas Flores (Vocal)

Profesor asociado D
Laboratorio de Farmacología
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
gera_1024@yahoo.com.mx



Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio (Vocal)

Profesor asociado D
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS
Jaime_gomez_zamudio@hotmail.com



COMITÉ TUTORAL

Codirectores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

aaasj2@prodigy.net.mx

Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular D y Jefe de la Unidad.

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS

mcruzl@yahoo.com

Asesor:

Dr. Gerardo Blancas Flores

Profesor asociado D

Laboratorio de Farmacología

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

gera@xanum.uam.mx

*A mi Familia
que siempre me brindan su
Amor, respeto, cariño y apoyo incondicional.*

*El investigador sufre las decepciones,
los largos meses pasados en una dirección equivocada,
los fracasos.*

*Pero los fracasos son también útiles, porque,
bien analizados, pueden conducir al éxito.
Y para el investigador no existe alegría comparable
a la de un descubrimiento,
por pequeño que sea...*

AGRADECIMIENTOS

He dejado una huella, gracias a mis esfuerzos y sacrificios, pero llega el momento de concluir esta etapa que me deja grandes enseñanzas, conocimientos y superación profesional y solo me queda agradecer principalmente...

A Dios por iluminar siempre mi camino y permitir que siga en él.

A mi hijo Marco Antonio Dolores Contreras por ser el impulsó del día a día para seguir adelante a pesar de las adversidades y por acoplarte y entender mi ritmo de vida tan complicado por ser la persona que ha llenado mi corazón de felicidad.

A mi marido Leonardo Dolores Hernández por su comprensión y apoyo que me ha brindado a lo largo de esta etapa, alentándome siempre y ayudándome a trazar este largo camino llenándolo de alegría y amor.

A mis padres Marilú Nuñez Delgado y Humberto Contreras García por impulsarme a seguir adelante y dejarme esta gran herencia que me ha permitido defenderme y salir adelante.

A mis hermanos por apoyarme y darme el aliento necesario para superarme y ser una mejor persona.

A mis amigos M^a Elizabeth, Jhovan y Malinalli por brindarme su amistad, su confianza y cariño incondicional. Compartimos buenos y malos momentos pero que me llenaron de conocimientos y virtudes porque son especiales para mí, muchas gracias.

A mis amigos y compañero de Farmacología Ana López, Emma, Hilda, Martha, Beatriz, Wendolyn, Abraham, Diana, Jessica e Iván por sus consejos, conocimientos, opiniones, crítica constructiva y saber que conté y poder contar con ustedes y con su apoyo, gracias.

Al Dr. Gerardo Blancas, por ser un modelo a seguir y confiar plenamente en mí, en reconocermé como una gran persona con sueños y metas a cumplir, por permitirme superarme como una gran investigadora mil gracias...

Dra. M^a Ángeles, Dr. Julio Almanza, Dr. Alarcón, Dr. Cruz, Dr. Zentella, Dr. Jaime y Dr. Fausto por su gran apoyo y motivación para la culminación de este proyecto, ya que son una parte importante en mi formación académica y profesional.

INDICE GENERAL

PÁGINAS

★ Índice de figuras.....	i
★ Índice de tablas.....	ii
★ Resumen.....	iii
★ Abstract.....	vi
★ 1. Introducción.....	1
★ 1.1. Acción de la glicina como antiinflamatorio y antioxidante.....	1
★ 1.1.1 Receptores de glicina.....	2
★ 1.1.2 Distribución de los receptores de glicina en otros tejidos....	5
★ 1.2. Desarrollo del proceso inflamatorio.....	7
★ 1.3. Vía de activación de NF- κ B durante el proceso inflamatorio.....	8
★ 1.3.1. Familia del factor de transcripción NF- κ B.....	10
★ 1.3.2. Inhibidores de NF- κ B (I κ B).....	12
★ 1.3.3. Las IKKs (I κ B cinasas).....	12
★ 1.4 TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa).....	13
★ 1.5. Activación de NF- κ B dependiente del receptor de TNF- α	16
★ 1.6. La obesidad como un proceso inflamatorio.....	17
★ 2. Antecedentes.....	19
★ 3. Justificación.....	21
★ 4. Pregunta de investigación.....	23
★ 5. Hipótesis.....	23

★ 6. Objetivo general.....	23
★ 7. Objetivos particulares.....	23
★ 8. Material y métodos	24
★ 8.1.1. Cultivo celular.....	24
★ 8.1.2. Cultivos experimentales.....	25
★ 8.2 Western Blot.....	26
★ 8.3 Prueba de MTT.....	27
★ 8.4 Cuantificación de calcio.....	27
★ 8.5 Localización de los receptores de glicina por medio de microscopia confocal.....	28
★ 8.6 Extracción del RNAm y cuantificación por PCR-RT.....	30
★ 8.7 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	30
★ 8.8 Análisis estadístico.....	31
★ 9. RESULTADOS.....	32
★ 9.1 El tratamiento con glicina seguido de TNF- α altera el contenido de IKK- α/β	32
★ 9.2 Acción inhibitoria de NF- κ B por glicina.....	33
★ 9.3. Efecto de la glicina en la expresión del RNAm y la secreción de citocinas.....	35
★ 9.4. Efecto de la glicina en la expresión del RNAm del GlyR- β	37
★ 9.5 Efecto de la glicina y estricnina sobre la viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1.....	38

★ 9.6 Medición de las $[Ca^{2+}]_i$ después del tratamiento con glicina para explorar la participación de un GlyR en 3T3-L1.....	39
★ 9.7 Acción de la glicina sobre la activación de NF- κ B en presencia de estricnina.....	39
★ 9.8. Microscopía confocal de los GlyR- α y GlyR- β en adipocitos 3T3-L1.....	42
★ 10. Discusión.....	45
★ 11. Conclusión.....	51
★ 12. Perspectivas.....	51
★ 13. Bibliografía	51
★ Publicación.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINAS

Figura 1.	Representación esquemática del GlyR.....	4
Figura 2.	Representación esquemática del GlyR en presencia de estricnina	5
Figura 3.	Efecto de la glicina en IKK- α/β	33
Figura 4.	Efecto de la glicina sobre la activación de NF- κ B/TNF- α	34
Figura 5.	Efecto de la glicina sobre la expresión y secreción de RNAm de citocinas inflamatorias.....	36
Figura 6.	Expresión de RNAm de GlyR- β	37
Figura 7.	Acción de la glicina sobre la activación de NF- κ B/TNF- α en presencia de estricnina.....	38
Figura 8.	Efecto de la glicina sobre las $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos 3T3-L1 a los 10 min de incubación.....	40
Figura 9.	Acción de la glicina sobre la activación de NF- κ B/TNF- α en presencia de estricnina.....	41
Figura 10.	Fotomicrografías de fluorescencia confocal de GlyR- β en adipocitos 3T3-L1.....	43
Figura 11.	Fotomicrografías de fluorescencia confocal de GlyR- α en adipocitos 3T3-L1.....	44
Figura 12.	Activación de la vía NF- κ B y participación de la glicina en la inhibición del complejo IKK- α/β	52

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINAS

Tabla 1. Primers específicos utilizados en RT-PCR para TNF- α , IL-6, adiponectina, GlyR- β , and 36B4..... 30

RESUMEN

Introducción: La glicina, un aminoácido no esencial y de estructura simple constituida por un hidrógeno como cadena lateral (Lynch, 2004); ha mostrado ser protector contra la lesión celular, proporcionando citoprotección (Zhong y col., 2003). Así mismo, se ha asociado con el bloqueo del proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos. En estos procesos participan potentes mediadores inflamatorios, tales como las citocinas, las cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria progresiva (Matilla y col., 2002; Zhong y col., 2003). Los efectos de la glicina están regulados por un receptor (GlyR) específico que se encuentra anclado a la membrana plasmática y asociado a canales de Cl⁻. Cuando se presenta la unión de glicina a su receptor, éste ejerce su acción inhibitoria (Chatterton y col., 2002; Laube y col., 2002); dicha acción de la glicina puede ser bloqueada selectivamente por estricnina (Sakata y col., 2001). Hasta el momento las investigaciones realizadas sobre los efectos de la glicina en estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que disminuye la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias y aumenta las antiinflamatorias (Alarcon-Aguilar y col., 2008; Almanza-Perez y col., 2010; Garcia-Macedo y col., 2008). Efectos que se han relacionado con la participación del factor de transcripción NF-κB (factor nuclear kappa B), el cual promueve la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales tienen como función principal reclutar macrófagos polimorfonucleares al sitio del daño tisular, para eliminar al invasor por fagocitosis o tratar de regular el proceso inflamatorio con la síntesis de citocinas

antiinflamatorias (Hayden and Ghosh, 2004). Se ha demostrado que el pretratamiento con glicina suprime la activación de este factor de transcripción así como la actividad de su inhibidor y del complejo IKK- α/β , dando como resultado una disminución en la síntesis de citocinas proinflamatorias y una mejora en el perfil inflamatorio (Blancas-Flores y col., 2012; Contreras-Nuñez., 2013). La presente investigación pretende continuar con la elucidación del mecanismo de acción de la glicina en adipocitos que explique su participación en el proceso inflamatorio.

Objetivo general: Determinar si el efecto antiinflamatorio de la glicina ocurre por la inhibición del complejo IKK- α/β sobre la vía TNF- α /NF- κ B por unión a un receptor específico.

Material y métodos: Se utilizó la línea celular 3T3-L1; las células fueron incubadas con TNF- α (5 ng/mL) durante 30 min (control positivo), BAY (10 μ M, un inhibidor de NF- κ B) durante 30 min (control negativo) y pretratamientos con glicina (10 mM) a los 15, 30, 45, 60, 120 y 240 min. Se realizó la extracción de proteína nuclear y citoplasmática para su cuantificación. Se aplicó la técnica del Western Blot para la detección de las proteínas cinasas (IKK- α/β). Por el método de ELISA se midió la activación de NF- κ B así como la secreción de citocinas (IL-6, TNF- α y adiponectina). Se realizó la extracción de RNAm y se aplicó la técnica de RT-PCR para la cuantificación de citocinas (IL-6, TNF- α y adiponectina) y la expresión del receptor de glicina. Se determinó la $[Ca^{2+}]_i$ y la localización del receptor de glicina en la membrana por medio de microscopia confocal. En los ensayos para determinar una posible presencia de los receptores para glicina fue utilizada la Estricnina

(antagonista del receptor de glicina) por el método de ELISA en el cual se midió la activación de NF- κ B. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza seguido de la prueba complementaria de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia del 95%.

Resultados: Los resultados mostraron que la glicina disminuyó la presencia de IKK- α a los 30, 60 y 120 min, así como en la p-IKK- α (Thr 23) a los 15, 60, 120, 240 min. Sin embargo, el complejo IKK- α/β disminuyó su presencia a los 15 min y se apreció un aumento significativo a los 240 min con respecto al control positivo TNF- α , así mismo se observó una disminución en el contenido de p-IKK- α/β (Ser176/177) a los 30, 60, 120 y 240 min. Esto coincidió con una disminución en la fosforilación de p65 NF- κ B (pS536). Efecto que generó una disminución en la expresión y secreción de IL-6 y TNF- α . La expresión y secreción de adiponectina se incrementaron. También se mostró que glicina genera una disminución en las $[Ca^{+2}]_i$ aumentando la expresión del RNAm del receptor de glicina (GlyR), así como su localización en la membrana plasmática del adipocito.

Conclusión: IKK- α/β es regulada por la acción de la glicina, interfiriendo en su actividad y, en consecuencia, suprimiendo la activación de NF- κ B, acción asociada a un receptor específico que provoca una hiperpolarización en la membrana plasmática del adipocito, generando bloqueo de los canales dependientes de voltaje, como los de Ca^{+2} , regulando la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y aumentando una citocina antiinflamatoria (adiponectina) en adipocitos 3T3-L1, contribuyendo a la reducción del proceso inflamatorio a nivel sistémico.

ABSTRACT

Introduction: Glycine, an amino acid non-essential and simple structure consisting of a hydrogen as a side chain (Lynch, 2004); it has shown to be protective against cell injury, providing cytoprotection (Zhong et al., 2003). Likewise, it partnered with the blocking of the systemic inflammatory process that originates in a variety of pathological states. These processes involve powerful inflammatory mediators, such as cytokines, which play an important role in the progressive inflammatory response (Matilla et al., 2002; Zhong et al., 2003). The effects of glycine are regulated by a specific receptor (GlyR), which is anchored to the plasma membrane and associated with Cl⁻ channels. When there is the union of glycine to your receiver, it exerts its inhibitory action (Chatterton et al., 2002; Laube et al., 2002); such action of the glycine can be selectively blocked by strychnine (Sakata et al., 2001). So far investigations on the effects of glycine in vitro and in vivo studies have shown that decreases the expression and secretion of proinflammatory cytokines and increases the anti-inflammatory (Alarcón-Aguilar et al., 2008; Almanza-Perez et al., 2010; Garcia - Macedo et al., 2008). Effects that have been associated with the participation of the transcription factor NF- κ B (nuclear factor kappa B), which promotes transcription of genes encoding proinflammatory cytokines and chemokines, which have as main function to recruit macrophages polymorphonuclear site of tissue damage, to kill the invader by phagocytosis or trying to regulate the inflammatory process with the synthesis of anti-inflammatory cytokines (Hayden and Ghosh, 2004). It has been shown that pretreatment with glycine suppresses the activation of this

transcription factor as well as the activity of its inhibitor and the complex IKK- α resulting in a decrease in the synthesis of proinflammatory cytokines and an improvement in the profile inflammatory (Blancas-Flores et al., 2012; Contreras-Nuñez., 2013). This research intends to continue with the elucidation of the mechanism of action of glycine in adipocytes explaining his participation in the inflammatory process.

General objective: determine if the anti-inflammatory effect of glycine occurs by inhibition of IKK- α/β complex on via TNF- α /NF- κ B by binding to a specific receiver.

Material and methods: We used the cell line 3T3-L1; the cells were incubated with TNF - (5 ng/mL) for 30 min (positive control), BAY (10 μ M, an inhibitor of NF- κ B) during 30 min (negative control), and pretreatment with glycine (10 mM) to 15, 30, 45, 60, 120 and 240 min. He was the extraction of nuclear and cytoplasmic protein for its quantification. Applied technique of the Western Blot for detection of protein kinases (IKK- α/β). The activation of NF- κ B as well as the secretion of cytokines (IL-6, TNF- α and adiponectin) was measured by ELISA method. He was the extraction of mRNA and applied the technique of RT-PCR for the quantification of cytokines (IL-6, TNF- α and adiponectin) and the expression of glycine receptor. The $[Ca^{2+}]_i$ and determined the location of the receiver of glycine in the membrane by confocal microscopy. In trials to determine a possible presence of receptors for glycine (glycine receptor antagonist) strychnine was used by the ELISA method in which measured the activation of NF- κ B. The data were analyzed using an analysis of variance followed by complementary Tukey-Kramer test, with a significance level of 95%.

Results: The results showed that glycine decreased the presence of IKK- α at 30, 60 and 120 min, as well as the p-IKK- α (Thr 23) to 15, 60, 120, 240 min. However, the complex IKK- α/β decreased its presence at 15 min and showed a significant increase at 240 min relative to the positive control TNF- α , there was also a decrease in the content of p-IKK- α/β (Ser176/177) at 30, 60, 120 and 240 min. This coincided with a decrease in phosphorylation of p65 NF- κ B (pS536). Effect that caused a decrease in the expression and secretion of IL-6 and TNF- α . Expression and secretion of adiponectin were increased. It also showed that glycine generates a decrease in the $[Ca^{+2}]_i$; increasing the expression of mRNA of receptor (GlyR) glycine, as well as its location in the Adipocyte plasma membrane.

Conclusión: IKK- α/β is regulated by the action of glycine, interfering in their activity and, consequently, by suppressing the activation of NF- κ B, action associated with a specific receptor that causes a hyperpolarization in the plasma membrane of the adipocyte, generating blockade of voltage-dependent channels, as of Ca^{+2} , regulating the expression and secretion of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α) and increasing an anti-inflammatory cytokine (adiponectin) in 3T3-L1 adipocytes, contributing to the reduction of the inflammatory process at the systemic level.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Acción de la glicina como antiinflamatorio y antioxidante.

La glicina, un aminoácido no esencial y uno de los más simples, cuyo grupo lateral es un hidrógeno; se forma a partir del dióxido de carbono y del amoníaco por la acción de la glicina sintasa, 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 además ha sido utilizada como producto nutricional que participa en la biosíntesis de ácidos nucleicos, ácidos biliares, porfirinas, creatina fosfato y otros aminoácidos.

Este aminoácido ha mostrado ser protector contra la lesión celular atenuando el influjo de calcio libre citosólico y la generación de superóxido por los neutrófilos; también participa en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en macrófagos alveolares actúa contra la hipoxia de los túbulos renales proximales, la isquemia, la falla renal aguda, en el daño por reperfusión en el tejido cardíaco y hepático, proporciona citoprotección contra la lesión hepatocelular por depleción de ATP y minimiza las lesiones hepáticas después de la exposición crónica al alcohol. También mejora la supervivencia en el choque endotóxico, protege de la hepatotoxicidad por D-galactosamina, previene el estado hipermetabólico y la hipoxia hepática (Matilla y col., 2002).

La glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos, tales como trauma, shock hemorrágico, sepsis, quemaduras y procesos de isquemia/reperfusión, debido a la actividad de

macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios tales como citocinas tóxicas y eicosanoides, los cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria progresiva (Matilla y col., 2002).

Se ha reportado que la glicina reprime la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6 en células de Kupffer (Spittler y col., 1999), estimulando la respuesta antiinflamatoria por el aumento de la interleucina 10 (Spittler y col., 1999). Por lo tanto, la glicina podría ser útil en diversos trastornos inflamatorios, así como en la reducción de la resistencia a la insulina en la obesidad, que se caracteriza por un estado inflamatorio crónico. Se considera que la glicina es un aminoácido que funciona como un nutriente antioxidante y protector celular y que su uso representa una de las alternativas que busca aminorar las complicaciones macro y microvasculares características de los pacientes obesos (Matilla y col., 2002), ya que ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro* (Alarcon-Aguilar y col., 2010; Garcia-Macedo y col., 2008).

1.1.1 Receptores de glicina

El receptor de glicina (GlyR) es un miembro de la familia de receptores de acetilcolina nicotínicos asociados a canales iónicos activados por ligandos, permitiendo que las células respondan rápidamente a los cambios externos. El GlyR es una proteína integral de membrana (proteína anclada a la membrana plasmática) asociada a canales de Cl⁻ y cuando la glicina se une a su receptor ejerce su acción inhibitoria (Chatterton y col., 2002; Laube y col., 2002). La señal inhibitoria bloquea la

acción despolarizadora por incremento de la permeabilidad al Cl⁻ a través de la membrana, difundándose pasivamente (Lynch, 2004).

La glicina hiperpolariza la membrana plasmática por incremento de la conductancia al cloro (Zhong y col., 2003); así, el receptor de la glicina es a menudo referido como un canal de cloro unido o sensible a glicina. El canal de la glicina está compuesto de tres subunidades proteínicas distintas: una de 48 kDa llamada subunidad α ; una subunidad β de 58 kDa y una subunidad citoplasmática de anclaje (gefirina) de 93 kDa. La glicina, al activar los canales de cloro de la membrana plasmática de las células, inicia el influjo de iones cloro, generando la hiperpolarización de la membrana (Matilla y col., 2002; Zhong y col., 2003).

Con la producción de estímulos externos, tales como endotoxinas, se produce un influjo de calcio libre extracelular a través de canales dependientes de voltaje. Este incremento en el calcio intracelular es impedido debido al estado de hiperpolarización de la membrana plasmática, creado por la interacción de la glicina con su receptor (Figura 1). De esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citocinas que son dependientes del incremento del calcio intracelular, lo que previene la cascada de producción de citocinas inflamatorias que sigue a la activación de las células de Kupffer y otros tipos de células sanguíneas en las que se ha reportado la presencia de este tipo de receptor (Froh y col., 2002).

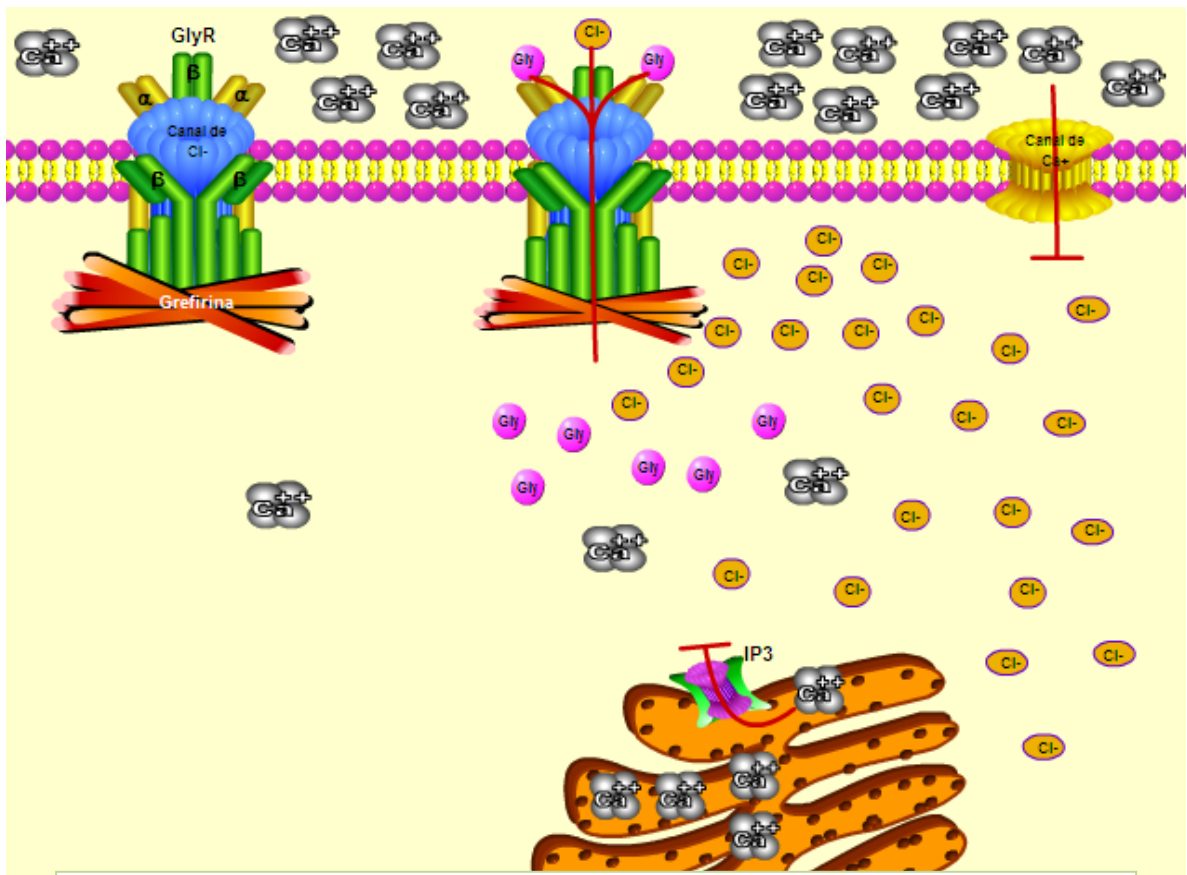


Figura 1. Representación esquemática del GlyR.

La acción de la glicina puede ser bloqueada selectivamente por la estricnina (alcaloide convulsivante), que se extrae del árbol *Strychnos nuxvomica*, originario de la India (Figura 2). La estricnina es el antagonista clásico del receptor y se une a él con gran afinidad, reconociendo un epítipo, con el sitio de unión de la glicina, lo que ha permitido la posterior caracterización de la acción de la glicina en el sistema nervioso central (Sakata y col., 2001). Con el uso de estricnina de alta afinidad, se ha purificado el receptor de la glicina, la composición de las subunidades y los lugares de unión del receptor. Además, se ha identificado la secuencia de aminoácidos de muchas de las subunidades. Igualmente se ha demostrado que una amplia variedad

de células involucradas en la inflamación (células de Kupffer, macrófagos alveolares y neutrófilos) también contiene canales de cloro sensibles a glicina (Froh y col., 2002; Matilla y col., 2002; Wheeler y col., 2000; Zhong y col., 2003).

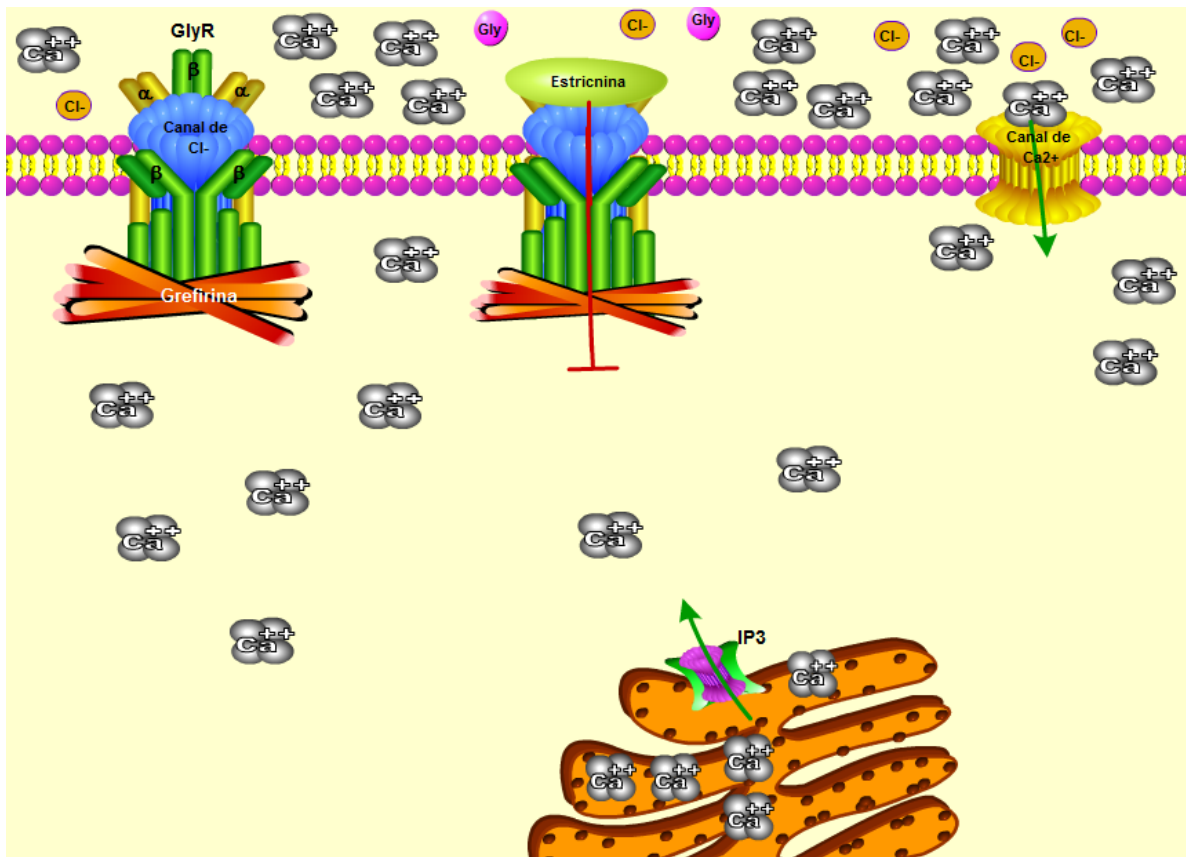


Figura 2. Representación esquemática del GlyR en presencia de estricnina.

1.1.2 Distribución de los receptores de glicina en otros tejidos.

La identidad de la glicina como un neurotransmisor inhibitor fue originalmente propuesta por Aprison y col. y Davidoff y col., quienes describieron en detalle la distribución de la glicina a través del sistema nervioso central. Sin embargo,

evidencias recientes sugieren que también puede tener otras funciones fisiológicas ya que se encuentra distribuida en otros tejidos.

En los espermatozoides la activación de GlyRs y GABAARs es esencial para la reacción acrosómica (Sato y col., 2000a; Sato y col., 2000b), que permite la liberación de enzimas hidrolíticas que inducen diferentes modificaciones de proteínas y aseguran que el espermatozoide se mantenga fuertemente unido a la zona pelúcida del óvulo. Los receptores de glicina (GlyRs) se encuentran en la membrana plasmática asociados a canales de cloro, los cuales se encuentran presentes en espermatozoides de ratón, hámster y humanos (Bray y col., 2002; Harvey y col., 2000).

En la línea celular de páncreas (GKP3), se expresan GlyRs que al ser activados por glicina causan una despolarización que aumenta la concentración intracelular de calcio (Weaver y col., 1998). En células de Kupffer, macrófagos, leucocitos y neutrófilos se sugiere que GlyRs puede parcialmente mediar los efectos antiinflamatorios de la glicina. La participación del GlyR en este proceso se ha centrado en la reducción en la concentración de calcio inducido por lipopolisacáridos dependiente de la estricnina (Froh y col., 2002). Las evidencias recientes sugieren la presencia de las subunidades GlyR- α 1, α 2, α 4 y β en células de Kupffer (Wheeler y col., 2000). Se considera que la glicina es un aminoácido que funciona como un nutriente antioxidante y protector celular por unión a su receptor y que su uso representa una de las alternativas que busca aminorar el proceso inflamatorio gracias a sus propiedades antiinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro* (Alarcon-

Aguilar y col., 2010; Garcia-Macedo y col., 2008). Este proceso inflamatorio se caracteriza por alteraciones en la respuesta inmune y la generación de señales para la síntesis de mediadores inflamatorios (Medzhitov, 2008; Recasens y col., 2004).

1. 2 Desarrollo del proceso inflamatorio.

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (García Barreno, 2008). La respuesta inflamatoria comienza con el reconocimiento de las señales intra o extracelulares, que pueden ser de origen infeccioso o inflamatorio, lo que ocasiona la activación celular y la síntesis de proteínas de fase aguda, modificando la respuesta efectora de las células inmunitarias.

En la respuesta inmune debida a infecciones, estos mediadores provocan el reclutamiento de células adyacentes a través de un proceso parácrino (Medzhitov, 2008). Cuando la liberación de mediadores excede las fronteras locales, se diseminan y distribuyen a través de la sangre, producen una activación celular generalizada de tipo endócrino que corresponde con el cuadro clínico del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). El SIRS es un mecanismo de defensa del huésped que forma parte el proceso de reparación tisular (Brun-Buisson, 2000). Para que esta defensa se inicie de manera eficaz, es necesaria la participación de citocinas con función fundamentalmente proinflamatoria, como el factor de necrosis

tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β (interleucina 1 beta), interleucina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ) y, posiblemente, IL-6 (interleucina 6) (Dinarello, 2000).

La respuesta inflamatoria inicial está controlada por moléculas inmunorreguladoras, como los inhibidores específicos y los receptores solubles de las citocinas. Las principales citocinas antiinflamatorias son los antagonistas del receptor de la IL-1 (IL-1RA), del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y de las interleucinas 4, 6, 10, 11 y 13, mediando sus efectos por unión al sitio activo o a los sitios alostéricos en los receptores para bloquear su efecto proinflamatorio (Opal and DePalo, 2000). Los receptores específicos para IL-1, TNF- α e IL-18 (interleucina-18) se comportan como inhibidores de sus respectivas citocinas proinflamatorias. En condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Así, mientras que en una primera fase predominan los mediadores del efecto proinflamatorio, en fases posteriores predominan mediadores antiinflamatorios. Es decir, la acción de las citocinas depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan, de la presencia de otros elementos competitivos o sinérgicos, de la densidad de sus receptores y de la capacidad de respuesta de ese tejido a cada citocina (Eichacker y col., 2002).

1.3. Vía de activación de NF- κ B durante el proceso inflamatorio.

La respuesta inmune innata ante las infecciones tiene como principio el reconocimiento de lo ajeno o extraño, pero de forma inespecífica; es decir, actúa

igual ante cualquier agente agresor y no varía la intensidad de su respuesta; aunque se repita la agresión más de una vez, este tipo de respuesta es fundamental durante la etapa inicial de la defensa del huésped contra la infección por bacterias o virus, antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida antígeno específica (Hayden y col., 2006).

Cuando entran los agentes patógenos al huésped, las bacterias patógenas utilizan un conjunto de proteínas capaces de interferir con las rutas de transducción de señales, generando una regulación negativa que evita la eliminación de los microorganismos. Una de las rutas de transducción de señales más importantes en las respuestas inmune, innata y adquirida, es la mediada por la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). Se ha demostrado que NF- κ B no sólo modula la respuesta inmune, sino también está implicado en la regulación de diversos procesos celulares como inflamación, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis y oncogénesis (Karin and Lin, 2002).

La activación de NF- κ B promueve la transcripción de genes que codifican para citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmunoreceptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, proteínas virales y reguladores de la apoptosis. Cuando se genera una infección causada por bacterias patógenas o un proceso inflamatorio, la inhibición o activación de NF- κ B bloquea o induce, respectivamente, la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, las cuales tienen como función principal reclutar macrófagos polimorfonucleares al sitio del daño tisular, para eliminar al invasor por fagocitosis o tratar de regular el

proceso inflamatorio con la síntesis de citocinas antiinflamatorias (Hayden and Ghosh, 2004).

1.3.1. Familia del factor de transcripción NF- κ B.

EL NF- κ B es un dímero que está constituido por la proteína Rel, éstos son encargados de activar la transcripción de los genes diana. La familia NF- κ B en mamíferos, está constituida por 5 miembros:

- I. RelA (p65)
- II. RelB
- III. c-Rel
- IV. NF- κ B1 (p50)
- V. NF- κ B2 (p52)

En el caso de NF- κ B2 (p52), se clasifica en dos subfamilias:

- 1.-Subfamilia I: contienen dominio TAD (del inglés *transcription activation domain*): RelA, c-Rel y RelB, que son sintetizados en su forma madura.
- 2.-Subfamilia II: carecen de dominio TAD NF- κ B1 (p50) y NF- κ B2 (p52): p50 y p52 son los productos maduros generados a partir de los precursores p105 y p100.

Estructuralmente la familia NF- κ B contienen un dominio N-terminal llamado RHD (del inglés *Rel homology domain*), formado por 300 aminoácidos y es responsable de la dimerización entre los distintos miembros de la familia NF- κ B, de la asociación con el inhibidor I κ B y de la unión con los motivos κ B del DNA; también en este dominio

se encuentran las secuencias de localización nuclear llamada NLS (del inglés *nuclear localization sequence*) (Hayden y Ghosh, 2008).

Los miembros de la subfamilia I: RelA (p65), c-Rel, y RelB presentan un dominio de activación transcripcional llamado TAD, en la región C-terminal. El dominio TAD es necesario para la regulación positiva de la expresión génica (Hayden and Ghosh, 2008). Las funciones de los dominios RHD y TAD son muy distintas, ya que en ambos dominios pueden “sufrir” modificaciones postraduccionales que pueden afectar la activación transcripcional de NF- κ B, así como su unión con el DNA (Hayden and Ghosh, 2008). Las proteínas de la familia NF- κ B se encuentran en el citosol en forma inactiva, formando homo y/o heterodímeros. El heterodímero RelA/p50 es una de las forma más abundante en las células de los mamíferos (Ghosh and Karin, 2002).

En respuesta a varios estímulos en el Sistema Nervioso, entre los cuales podemos destacar los factores neurotróficos, el estrés oxidativo y la inflamación, se puede inducir la translocación nuclear de NF- κ B. Una vez en el núcleo, los dímeros NF- κ B se unen a los motivos I κ B (GGGRNNYYCC, donde **R** representa bases purínicas, **Y** representa bases pirimidínicas y **N** representa cualquier base) dentro de los promotores de los genes diana, regulando su transcripción mediante la unión de coactivadores o corepresores (Hayden y Ghosh, 2008; Memet, 2006).

En ausencia de los estímulos activadores de la vía NF- κ B, los homodímeros de p50 y/o p52 están unidos a los motivos I κ B en los promotores de genes diana, bloqueando su activación. La activación de la vía promueve el desplazamiento de los

p50/p50 y p52/p52, dando lugar a la unión de los dímeros NF- κ B con dominio TAD (RelA, RelB o c-Rel), activando o reprimiendo la expresión de genes diana (Ghosh and Hayden, 2008).

1.3.2. Inhibidores de NF- κ B (I κ B).

Los dímeros de NF- κ B se encuentran retenidos en el citosol, formando un complejo con proteínas inhibidoras de la familia I κ B. Por lo tanto, estas proteínas mantienen la vía NF- κ B inactiva (Perkins, 2006). Los I κ B constituyen una familia de al menos seis isoformas de la proteína inhibidora I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B δ y Bcl3. Todas ellas tienen en común su estructura tridimensional y se distinguen por el número de los dominios de ankirina (Bours y col., 2000) y para que el NF- κ B tenga acceso a su sitio de acción, en el núcleo, el complejo NF κ B/I κ B debe ser disociado a través de la fosforilación de su inhibidor.

1.3.3. Las IKKs (I κ B cinasas).

La fosforilación del inhibidor I κ B en respuesta a distintos estímulos requiere la activación catalítica de unas serina-treonina cinasas llamadas I κ B cinasas (IKKs). El complejo IKK está constituido por 3 subunidades: dos con dominio cinasa, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, NEMO (IKK γ), las cinasas IKK α e IKK β contienen tres dominios: un dominio cinasa, un dominio *helix-loop-helix* y un dominio de *leucine zipper* (Häcker y Karin, 2006). Su dominio catalítico muestra un 65% de homología: a

pesar de ello, las dos cinasas difieren significativamente en sus funciones (Hayden y Ghosh, 2008).

El dominio *helix-loop-helix* es responsable de la unión de IKK α e IKK β con NEMO y está implicado en la modulación de su actividad cinasa (May y col., 2000). A través del dominio *leucine zipper* las IKK α e IKK β interactúan formando homo o heterodímeros, siendo la catálisis inducida por los heterodímeros más eficiente que los homodímeros (Huynh y col., 2000); se conoce que para su activación éstas necesitan estar fosforiladas en dos residuos de serina que se encuentran en el *loop* de activación (las Ser 177 y 181 para IKK β , y las Ser 176 y 180 para IKK α) (Schomer-Miller y col., 2006). Las IKKs tienen diferente distribución celular, mientras IKK β e IKK α están localizadas en el citosol; solamente IKK α , gracias a su secuencia nuclear de localización (NLS) en el dominio cinasa, está localizada en el núcleo (Scotto d'Abusco y col., 2010).

1.4 TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa)

El TNF- α es una citocina proinflamatoria, producida por varios tipos de células, pero principalmente por el sistema monocito-macrófago, adipocitos (Fain y col., 2004), células endoteliales activadas, fibroblastos y condrocitos del cartílago articular, y en menor medida por los queratinocitos y los linfocitos. Es considerada como una proteína transmembranal que sufre procesos de corte proteolítico, dando lugar a la forma biológicamente activa que ejerce su acción a través de 2 receptores de membrana transportados en la superficie de las células diana: a) TNF-R1p55,

presente en la superficie de los leucocitos y las células endoteliales b) TNF-RIIp75, presente en la mayoría de las células (Aggarwal, 2003; Wajant y col., 2003).

Tras la fijación a sus receptores, el TNF- α induce al menos 3 vías de señalización: una vía induce a la apoptosis por la intermediación de caspasas, otra activa las MAPcinasa y la producción de un factor de transcripción AP-1, y la tercera vía activa al NF- κ B, que desempeña un papel mayor en el control de la transcripción (Dempsey y col., 2003; Gaur y Aggarwal, 2003). El NF- κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión, citocinas y receptores inmunológicos (Lavorgna y col., 2009).

Entre las acciones del TNF- α destacan las siguientes: Induce la muerte celular programada (apoptosis) (Wicovsky y col., 2009), la liberación de otras citocinas (IL-6, IL-8, IL-1 beta) y regula la inflamación (Wajant y col., 2003). Induce la expresión de las moléculas de adhesión endotelial, lo cual lleva a una migración rápida de leucocitos al espacio extravascular, con lo que participa en la activación, proliferación, diferenciación y migración de células inmunocompetentes (Wajant y col., 2003).

Por lo tanto, el TNF- α desempeña un importante papel en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmunológica. Sus efectos se caracterizan por una notable dualidad: pueden inducir daño celular, por una parte, pero por otra inician la reparación y la proliferación; inducen la muerte celular, pero también la resistencia a la muerte; y promueven primero la inflamación para después suprimirla (Locksley y col., 2001; Wajant y col., 2003). En el caso de los adipocitos la secreción del TNF- α

se ha relacionado con el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina ya que los niveles de este se encuentran aumentados. Por lo que en adipocitos también se expresan ambos tipos de receptores de TNF- α (Ruan y Lodish, 2003).

Se han descrito varios mecanismos potenciales de acción de TNF- α , en el tejido adiposo, en el que TNF- α reprime genes involucrados en la captación y almacenamiento de ácidos grasos no-esterificados (NEFAs o non-esterified fatty acids) y glucosa, inhibe genes de factores de transcripción asociados con procesos de adipogénesis y lipogénesis e induce cambios en la expresión de varios factores secretados por el adipocito, como la adiponectina y la IL-6.

En el hígado, TNF- α suprime la expresión de genes implicados en la captación de glucosa, el metabolismo y oxidación de ácidos grasos e induce la expresión de genes involucrados en la síntesis de *novo* de colesterol y ácidos grasos (Ruan y col., 2002). Adicionalmente, TNF- α afecta la señalización de la insulina, mediante la activación de serina cinasas que fosforilan los substratos del receptor de insulina 1 y 2 (Miki y col., 2001), transformándolos en substratos pobres para las cinasas del receptor de insulina y acelerando su degradación (Hotamisligil, 2003). TNF- α , además, altera los procesos de señalización de la insulina, indirectamente mediante el incremento de los niveles de NEFAs en plasma. Otro efecto de TNF- α sobre los adipocitos es la inducción de apoptosis y el bloqueo de la diferenciación adipocitaria, sugiriendo otro mecanismo por el cual esta citocina está limitando un exceso de adiposidad (Wicovsky y col., 2009).

1.5. Activación de NF- κ B dependiente del receptor de TNF- α .

Durante el proceso inflamatorio se activa la vía de señalización del TNF- α y cuando éste se une a su receptor (TNFR1), causa su trimerización y el reclutamiento de la proteína asociada a TNFR1 y el dominio de muerte (TRADD), que interactúa con la región citoplásmica de TNFR1.

Por otro lado, TRADD interactúa con el factor 2 asociado al receptor de TNF- α (TRAF2). Las otras proteínas importantes en esta ruta y que probablemente tienen un papel fundamental en la activación de NF- κ B, son la proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno 3 (MAPKKK3) y la proteína cinasa de serina/treonina asociada al receptor (RIP) (Memet, 2006). Esto causa la activación de una cinasa específica de I κ B (IKK), la cual forma parte de un complejo formado por tres proteínas, IKK α , IKK β e IKK γ [también llamada modulador esencial de NF- κ B (NEMO)] con peso molecular de 700 a 900 kDa. IKK α e IKK β catalizan la fosforilación de I κ B, mientras que NEMO sólo regula esta actividad y no tiene actividad intrínseca de cinasa. Una vez que se activa NF- κ B, pasa al núcleo y estimula la transcripción de genes para la síntesis de citocinas, que dan origen a varias reacciones de la respuesta inmune. Normalmente, el NF- κ B está unido a una proteína inhibidora denominada I κ B α , que impide su translocación al núcleo (Ghosh y Karin, 2002). La unión de un estimulador inmunitario, como el TNF- α , a su receptor de la membrana plasmática conduce a la ubiquitinización de I κ B α y a su degradación por el proteosoma 26S, lo cual permite al NF- κ B trasladarse al núcleo y activar la síntesis de citosinas (Hayden y Ghosh, 2008).

Definitivamente el NF- κ B es fundamental en la regulación de la respuesta celular ya que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de “acción rápida”, como son los factores de transcripción que están presentes en las células en un estado de inactivación y que no requieren una nueva síntesis de proteínas para ser activado. Esto permite al NF- κ B ser la primera respuesta a estímulos celulares nocivos. Sin embargo, este factor de transcripción controla varios genes involucrados en la inflamación, permaneciendo activado crónicamente en enfermedades inflamatorias, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis, sepsis, gastritis, asma, arterosclerosis y obesidad entre otros, asociados con una elevada mortalidad, especialmente en enfermedades cardiovasculares y esquizofrénicas (Perkins, 2006).

1.6. La obesidad como un proceso inflamatorio.

Existen evidencias epidemiológicas de una relación entre obesidad y el estado proinflamatorio. Sin embargo, hasta hace pocos años se ha establecido una vinculación fisiopatológica que demuestra que el exceso de tejido adiposo desencadena una situación de inflamación crónica (Hotamisligil, 2006; Wellen and Hotamisligil, 2003). Esta inflamación difiere de la inflamación clásica, pero posee similitudes en cuanto a las alteraciones en los mediadores de inflamación típicos (pequeñas moléculas asociadas a receptores específicos, como lípidos, aminoácidos modificados, citocinas y factores de crecimiento) y las rutas de señalización

(Hotamisligil, 2006). Con el desarrollo de la obesidad se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria ya que se genera un proceso inflamatorio, como ya se había mencionado, el cual es crónico y de bajo grado de intensidad, generado por el tejido adiposo ya “agrandado e inflamado” (Recasens y col., 2004; Sbarbati y col., 2006).

Uno de los procesos que tienen lugar en la inflamación es la infiltración en los tejidos inflamados de células del sistema inmune, tales como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en los tejidos inflamados. La hipertrofia de los adipocitos que se presenta en la obesidad lleva a un aumento en la producción por parte de los mismos, así como de otras células presentes en el tejido adiposo (fracción estroma-vascular), de una serie de adipocinas/quimiocinas/citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6, péptido amiloide sérico A (SAA), resistina, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), entre otros. El aumento en la producción de estas moléculas desencadena efectos locales a nivel del endotelio que conducen a un incremento en la producción de moléculas de adhesión VCAM (molécula de adhesión intercelular 1) e ICAM (molécula de adhesión celular vascular 1) y en la permeabilidad vascular que, en última instancia, se traducen en un aumento en la infiltración de monocitos y la acumulación de macrófagos. A su vez, dichos macrófagos producen más factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos, lo que se convierte en un auténtico círculo vicioso que perpetúa el estado proinflamatorio (Nishimura y col., 2008; Shoelson y col., 2007; Surmi and Hasty, 2008; Weisberg y col., 2003; Wellen y Hotamisligil, 2003).

Los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan reactivantes de fase aguda y más mediadores de inflamación. Entre los factores de inflamación expresados en los adipocitos se incluyen TNF- α , IL-6, PAI-1, MCP1, IL-1 β , IL-8, 10, 15, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), amiloide sérica A3 (SAA3), factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MMIF), moduladores inflamatorios potentes como leptina, adiponectina y resistina, así como la proteína C reactiva (CRP) (Lau y col., 2005; van Leiden y col., 2002; Yamagishi y col., 2005). La regulación en la síntesis de estas citocinas durante el desarrollo de la inflamación ha permitido el estudio de agentes capaces de inhibir este fenómeno, llevando al desarrollo de fármacos que actúan a diferentes niveles. El uso de la glicina representa una de las alternativas que busca mejorar la calidad de vida de las personas predispuestas a la obesidad, por lo que es importante conocer cuál es el mecanismo de acción de la glicina por el cual disminuye el proceso inflamatorio y previene el daño celular (Matilla y col., 2002).

2. ANTECEDENTES

En las investigaciones realizadas por nuestro grupo se ha encontrado en adipocitos de ratón de la línea celular 3T3-L1 que el tratamiento con glicina provoca disminución en los niveles de expresión del RNAm de IL-6, TNF- α y resistina, así como aumento de adiponectina, citocina que es considerada como antiinflamatoria y que es secretada exclusivamente por el adipocito; la glicina también incrementa la expresión de PPAR- γ , uno de los reguladores principales de adiponectina (Alarcon-

Aguilar y col., 2010; Almanza-Perez y col., 2010; Garcia-Macedo y col., 2008). En otros estudios se demostró que la administración de glicina disminuye la expresión y secreción de adipocinas proinflamatorias, observándose tendencia a incrementar adiponectina, esto en ratones obesos inducidos con glutamato monosódico (Ob/GMS) (Alarcon-Aguilar y col., 2008).

En estudios *in vitro* con la línea celular 3T3-L1, recientemente se observó que el pretratamiento con glicina por 30min regula la actividad del NF- κ B. La medición del inhibidor del NF- κ B (I κ B- α) demostró que el uso de la glicina inhibe la activación de NF- κ B, principalmente del heterómero p50-p65 y que la vía por la que se suprime este factor de transcripción es por la vía canónica de TNF- α , lo cual genera una disminución en la respuesta inflamatoria (Blancas-Flores y col., 2012). También se ha observado que el factor de transcripción NF- κ B regula la expresión de genes asociados con la respuesta inmune, la inflamación y la defensa celular. Entre ellos, cabe destacar los genes para: citocinas (por ejemplo, TNF- α), receptores de citocinas y moléculas de adhesión (Dempsey y col., 2003).

Estos resultados nos llevaron a investigar cómo la glicina estaba regulando la vía canónica de TNF- α , obteniendo como resultado que el pretratamiento con glicina por 30 min en células 3T3-L1 regula la presencia de una subunidad del complejo IKK (IKK α), permitiendo la generación de un efecto transitorio al aumentar y disminuir la activación de NF- κ B a diferentes tiempos. Esto hace que la secreción de TNF- α disminuya en tiempos de 15 min y hasta 2 h. Sin embargo, en el caso de leptina no se modifica su secreción ya que la mantiene en estados basales. Además, el

pretratamiento con glicina (10 mM seguido de un pulso de TNF- α (5 ng/ml a 15, 30, 45 min, 1 y 2 h) no modificó la secreción de leptina; Sin embargo, a 1 y 4 h se elevó significativamente su secreción hasta llegar a concentraciones basales parecidas al control. Estos datos nos han permitido avanzar en la elucidación del mecanismo de acción de la glicina, buscando explicar cómo ocurre la disminución en la síntesis de citocinas proinflamatorias y mejora el perfil inflamatorio, así como su regulación sobre la activación de NF- κ B en adipocitos (Contreras-Nuñez, E., 2013).

Así mismo se ha observado en células de Kupffer y de origen endotelial, que el tratamiento de glicina inhibe la producción de TNF- α e induce la respuesta antiinflamatoria por la expresión de IL-10. Por lo que se creó que el efecto de la glicina para modular estos procesos se relaciona con canales de glicina dependientes de cloro que, al unirse a éstos, provoca hiperpolarización de la membrana, regulando la entrada de calcio (Zhong y col., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos mediante los cuales la glicina ejerce sus acciones beneficiosas aún no han sido identificados. Algunos autores han propuesto que la glicina podría actuar inactivando los mecanismos de señalización celular inducidos por calcio, o por inhibición de la señalización celular inducida por citocinas durante los procesos inflamatorios. Sin embargo, aún no se conoce con claridad cuál es el mecanismo o mecanismos implicados en la acción de la glicina e incluso algunos autores postulan que puede estar actuando a distintos niveles celulares.

Los resultados obtenidos hasta ahora nos indican que la acción de glicina actúa sobre la vía canónica de TNF- α para la activación de NF- κ B, en la cual se modifica la actividad de IKK α , inhibiendo la activación de NF- κ B y regulando la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α y leptina, por lo que es posible que el mecanismo de acción esté relacionado con la hiperpolarización de la membrana plasmática inducida por glicina, ya que este efecto inhiben la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares. A su vez, la hiperpolarización de la membrana plasmática bloquea canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, disminuyendo la concentración intracelular de Ca²⁺ y, en consecuencia, inhibiendo las cascadas de señalización intracelulares inducidas por Ca²⁺. Este efecto puede regular diversos efectos como los que se encuentran implicados en la muerte celular, la activación de la PLA2, NADPH oxidasa y de factores de transcripción relacionados con el proceso inflamatorio principalmente el NF- κ B el cual al ser activado induce la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 e IL-6 (Matilla y col., 2002; Zhong y col., 2003).

En este proyecto de investigación se pretende elucidar el mecanismo de acción de la glicina, además determinar otras proteínas de la vía de señalización de TNF- α que están participando en la activación de NF- κ B, regulando el proceso inflamatorio crónico característico de la obesidad, y tratar de explicar a nivel molecular la acción benéfica de la glicina en los procesos inflamatorios citados.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La glicina regula la vía TNF- α /NF- κ B a nivel del complejo IKK- α / β mediante la participación de un receptor específico?

5. HIPÓTESIS

Si la glicina regula la producción de citocinas inflamatorias a nivel del complejo IKK- α / β un importante punto de regulación de la vía TNF- α /NF- κ B, entonces su mecanismo de acción debe involucrar la participación de un receptor.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efecto antiinflamatorio de la glicina ocurre por la inhibición del complejo IKK- α / β sobre la vía TNF- α /NF- κ B por unión a un receptor específico.

7. OBJETIVOS PARTICULARES:

- ④ Establecer la participación del complejo IKK- α / β en la regulación de la vía TNF- α /NF- κ B por glicina.
- ④ Determinar si la glicina genera cambios en las $[Ca^{2+}]_i$ debido a una posible participación de un receptor específico en adipocitos.
- ④ Determinar la expresión de receptores en el adipocito por estímulos de glicina y su presencia en la membrana.
- ④ Determinar la asociación entre la vía TNF- α /NF- κ B, el GlyR y la producción de citocinas inflamatorias.

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

En este proyecto se utilizó como modelo el cultivo celular de fibroblastos de ratón diferenciados a adipocitos de la línea celular 3T3-L1 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.).

8.1.1. Cultivo celular.

Los adipocitos fueron diferenciados a partir de fibroblastos precursores denominados preadipocitos. Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón fueron cultivados a confluencia a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de seis pozos con medio DMEM (Dulbecco's Modied Eagle's Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) (9 X 10⁴ células por placa), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), aminoácidos no esenciales (0.1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), gentamicina 10µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), complementado con 10% de suero fetal bovino (fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA). Después de dos días a confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos fue inducida con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), dexametasona (DX, 0.25 µM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e insulina (5 µg/ml) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día fue cambiado el medio de cultivo adicionando sólo insulina (5 µg/ml) y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio no contenía insulina, sólo medio D-MEM y fue remplazado cada dos días hasta llegar a confluencia.

8.1.2. Cultivos experimentales.

Se utilizaron cultivos sin ninguna condición y otros con tratamiento.

- a) Cultivos testigo. La línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 fue cultivada en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, bajo las mismas condiciones ya mencionadas, para posteriormente realizar la diferenciación. El cultivo fue utilizado como testigo.

- b) Cultivos con tratamiento. Se utilizaron cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente. Cuando las células se diferenciaron y tenían el fenotipo de adipocito se aplicaron los siguientes tratamientos: se utilizó un control en el cual las células fueron solamente diferenciadas y mantenidas con cambios de medio; un tratamiento con TNF- α (5 ng/ml) durante 30 min el cual fue utilizado como control positivo; un tratamiento con BAY 10 μ M (inhibidor de NF- κ B) durante 30 min transcurrido el tiempo se aplicó un pulso de TNF- α por 30 min, el cual fue utilizado como control negativo. Y, por último, el grupo problema al cual se les aplicó glicina 10 mM a diferentes tiempos de incubación (15, 30, 45, 60, 120 y 240 min de pretratamiento) posteriormente se adicionó TNF- α (30 min) a cada uno. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada uno de los tratamientos. Después de haber transcurrido el tiempo de cada uno de los tratamientos, el medio de incubación fue recuperado, centrifugado y almacenado a -70°C hasta su uso, en el caso de las células fueron desprendidas y

recuperadas en PBS. Las células recuperadas fueron procesadas para la extracción de proteína citoplasmática y nuclear para su análisis por Western Blot.

8.2. Western Blot.

La técnica del Western Blot se aplicó para el análisis de proteínas. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permitió la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas, dando como resultados datos cualitativos y semicuantitativos sobre la misma.

Para cada ensayo se utilizaron 30 μg de los extractos de proteínas citoplasmáticas en buffer de muestra (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 1% v/p, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1%, 2-mercaptoetanol 2% v/v) por 5 min. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida con SDS al 12% y posteriormente fueron transferidas a una membrana de Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Las membranas fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios cada uno por separado (IKK α , pIKK- α (Thr 23), IKK- α/β , pIKK- α/β (Ser176/177), diluido 1:250 en TBS. Después las membranas fueron lavadas y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Pierce, Rockford). Las señales generadas por quimioluminiscencia fueron detectadas utilizando el sistema de "Super-Signal" (Pierce, Rockford, II)". Las señales de las manchas fueron cuantificadas por densitometría.

8.3. Prueba de MTT.

Esta prueba se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) a formazán, esta reacción es realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que indica que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Dicha prueba permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 (Mosmann, 1983), siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Hasta la fecha es muy utilizada para medir supervivencia y proliferación celular.

Se utilizaron placas de 96 pozos para realizar una siembra celular bajo las mismas condiciones (diferenciación de fibroblastos a adipocitos). Posterior a la diferenciación se aplicaron diferentes concentraciones de glicina (1, 10, 100, 500 μ M, 1, 10, 100, 500 mM y 1 M) y estricnina (1, 10, 100, 500 μ M y 1, 10mM) se incubaron las células a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se retiró el medio y se colocaron 100 μ L de medio fresco para realizar la prueba de MTT utilizando el kit CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, siguiendo las instrucciones recomendadas por el kit.

8.4. Cuantificación de Calcio.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas y diferenciadas utilizando placas Chamber Slide System (Lab-Tek II). El efecto de glicina en la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ fue

observada al incubar a las células durante 45 min con 1 μ M del indicador Cab2 Fluo-4 AM (Molecular Probes). La fluorescencia se midió con una emisión de 488 nm de excitación y 535 nm utilizando un microscopio confocal (Zeiss Zen-Sp1) con escaneo láser. Las imágenes fueron adquiridas cada segundo, con un tiempo de exposición de 20 ms por 10 min a 23 °C. Se utilizó EDTA (0.25 mM) como quelante de Ca^{2+} (control positivo), Estricnina 1 μ M como antagonista de GlyR (control negativo), TNF- α 5 ng/ml, BAY 10 μ M, Gly 10 mM. Los cambios de fluorescencia relativa ($\Delta f/F_0$) se representaron gráficamente como una función del tiempo y se integraron para determinar el área bajo la curva (Miranda-Perez y col., 2016).

8.5. Localización de los receptores de glicina por medio de microscopia confocal.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas y diferenciadas en placas Chamber Slide System (Lab-Tek II), posteriormente se aplicaron los tratamientos ya mencionados. Trascurrido el tiempo las células se fijaron con 4% (p/v) de formaldehído durante 20 min a 4°C. Se bloquearon con PBS conteniendo 10% de BSA durante 30 min; posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo primario (GlyR- α , y GlyR- β , 1:1000) durante toda la noche a 4°C en PBS con 3% de BSA; posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron nuevamente con el anticuerpo secundario (1:10 000), contenido en PBS con 3% de BSA, el cual se dejó actuar durante un periodo de 1-2 h. Las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, PBS/glicerol/DAPI (polifosfato inorgánico 4', 6-diamidino-2-fenilindol, 1:1000) se incubó con las células

para teñir el núcleo. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finalmente se realizó la toma de imagen, visualizándola en un microscopio confocal Zen-SP1 ZEISS de escaneo láser, en un rango de excitación a 488 y 633-647 nm láseres.

8.6. Extracción del RNAm y cuantificación por PCR-RT.

Para la extracción del RNA total de las células 3T3-L1 se empleó la técnica descrita por Chomczynski (1993) (Chomczynski and Sacchi, 1987). 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; también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µl). 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 min, seguido por la extensión a 42°C por 55 min y, por último, se detuvo la reacción inactivando la enzima, calentando a 70°C por 15 min y enfriando a 4°C por 5 min.

El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master plus SYBR Green 1” para las adipocinas: TNF- α , IL-6, adiponectina, GlyR- β y 36-B4 como gen de normalización (Tabla 1). El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 µl, contenía 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes descritos

previamente y la mezcla de reacción 1X que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM.

Tabla 1. Primers específicos utilizados en RT-PCR de TNF- α , IL-6, adiponectina, GlyR- β , and 36B4.

Gen	Secuencia	Gene Bank	Tamaño del producto
TNF- α	F5'-CCTCCCTGTCATCAGTTCTA-3'	NM_013693.3	102
	R5'- ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'		
IL-6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3'	NM_001314054.1	199
	R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'		
Adiponectina	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3'	NM_009605.4	219
	R5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'		
GlyR- β	R5'-TTTGGCCTCAGAGTGCACCA-3'	NM_001345955.1	84
	R5'-CAGGCAATGAGCCACACATCC-3'		
36B4	F5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3'	NM_007475.5	136
	R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3'		

8.7. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se realizó la prueba de ELISA para la cuantificación de citocinas provenientes del medio de cultivo celular de adipocitos con los diferentes tratamientos ya mencionados, así como para el análisis de NF- κ B. Para esta prueba se utilizó la metodología descrita por el proveedor (R&D Systems) para adiponectina IL-6 y TNF- α y para NF- κ B fosforilado y no fosforilado (Abcam, Cambridge, MA, USA). Tanto las

muestras a evaluar como la curva estándar se incubaron en distintos pocillos de la microplaca recubiertos con un anticuerpo dirigido contra la molécula a evaluar. Luego de la incubación y de los lavados correspondientes se aplicó un segundo anticuerpo dirigido contra otro epítotope del analito conjugado con peroxidasa y se incubaron las muestras. Finalmente se realizaron lavados y posteriormente se incubaron la microplaca con un cromógeno para detener la reacción. La microplaca fue leída a una absorbancia de 450 nm y 550 nm. Los límites de detección y los valores normales se proporcionaron por el fabricante.

8.8. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm S.E.M. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA, utilizando una prueba complementaria de Tukey, con una significancia estadística del 95% ($p \leq 0.05$), utilizando el software GraphPad Prism 6.

9. RESULTADOS

9.1 El tratamiento con glicina seguido de TNF- α altera el contenido de IKK- α/β .

El contenido celular de IKK α se analizó a 15, 30, 60, 120 y 240 min de incubación con 10 mM de glicina seguido de la estimulación de TNF- α durante 30 min (Figura 3A). El nivel basal de IKK α en el control fue bajo; esta cinasa aumentó (3 veces) después del tratamiento con TNF- α . En general, el pretratamiento con glicina seguido de TNF- α aumentó significativamente el contenido de IKK α en comparación con el control y con el tratamiento con TNF- α . Sin embargo, a los 240 min el pretratamiento con glicina disminuyó significativamente el contenido citoplasmático de IKK α (2 veces) con respecto al TNF- α pero no alcanzó los niveles basales de control. La incubación de BAY + TNF- α redujo el contenido de IKK α aproximadamente en 2 veces con respecto al tratamiento con TNF- α solo (Figura 3A). La glicina también disminuyó significativamente la fosforilación de IKK α (Thr23), de manera similar que BAY en comparación con TNF- α (Figura 3B). Además, la glicina disminuyó significativamente el contenido del complejo IKK- α/β a los 15 min con respecto a TNF- α (Figura 3C); mientras que aumentó en 2.5 veces a 240 min. En relación con la fosforilación del complejo IKK- α/β en (Ser176/177), la glicina aumentó significativamente a los 15 y 30 min (4 veces) en comparación con el control, mientras que disminuyó a los 60, 120 y 240 minutos (1 a 2 veces) con respecto a TNF- α (Figura 3D).

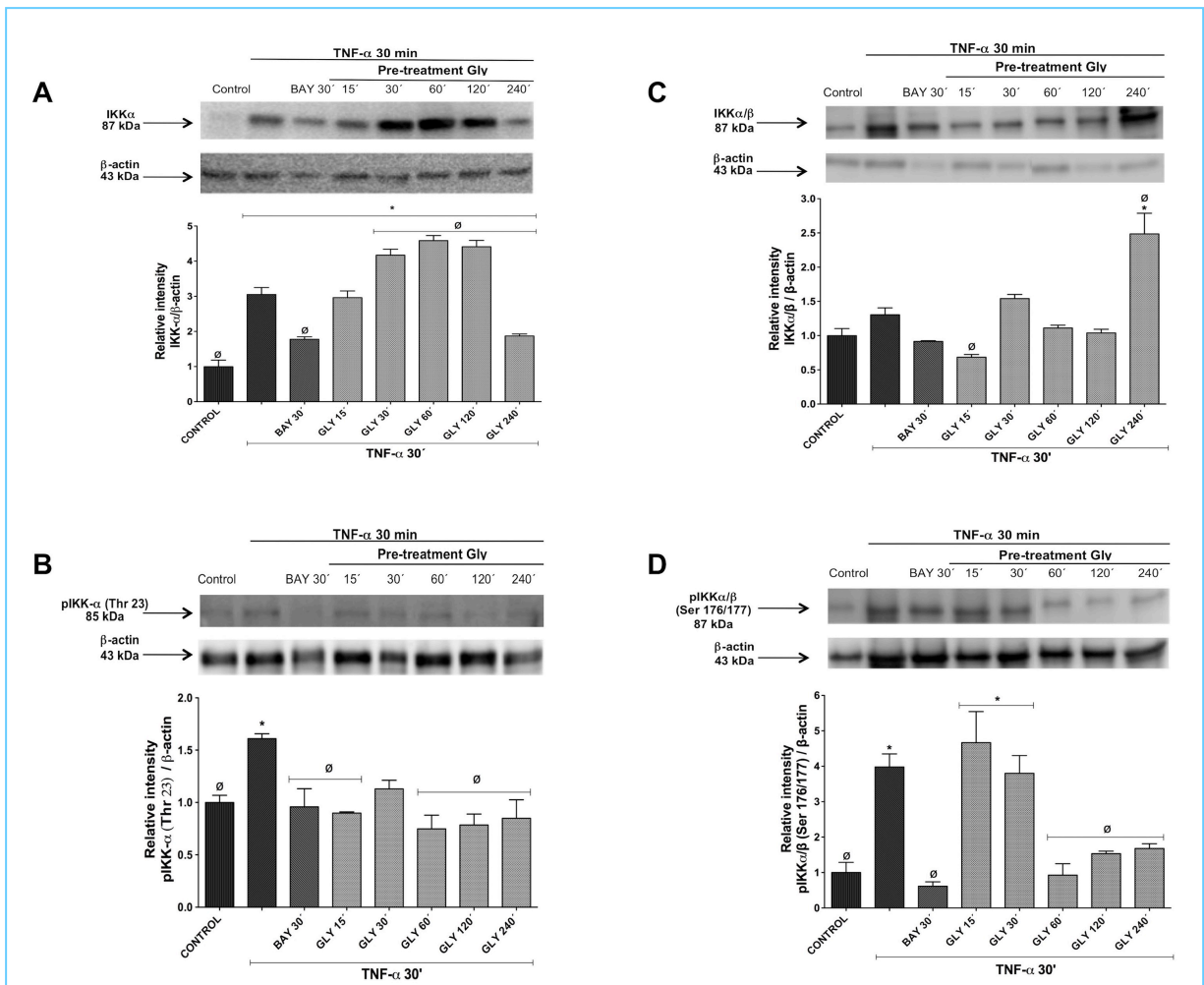


Figura 3. Efecto de la glicina en IKK- α/β . Densitometría de IKK α no fosforilada (A), IKK α fosforilada en Thr23 (B), IKK- α/β no fosforilada (C), e IKK- α/β fosforilada en Ser176/177 (d). Media \pm S.E.M. (n = 3) * Significativamente diferente con respecto al control (p <0.05). ∅ Significativamente diferente con respecto a TNF- α (p <0.05)

9.2 Acción inhibitoria de NF- κ B por glicina

Los resultados sobre la inhibición de NF- κ B por glicina (10 mM) a 15, 30, 60, 120 y 240 min seguidos de la estimulación con TNF- α durante 30 min, se muestran en la Figura 4. La glicina disminuyó significativamente a 120 y 240 min de la proteína Total

de NF- κ B p65, con respecto al control en lisados celulares (Figura 4A). Por el contrario, la glicina disminuyó significativamente la fosforilación de p65 (pS536) en todo momento, con respecto al control y a TNF- α (Figura 4B).

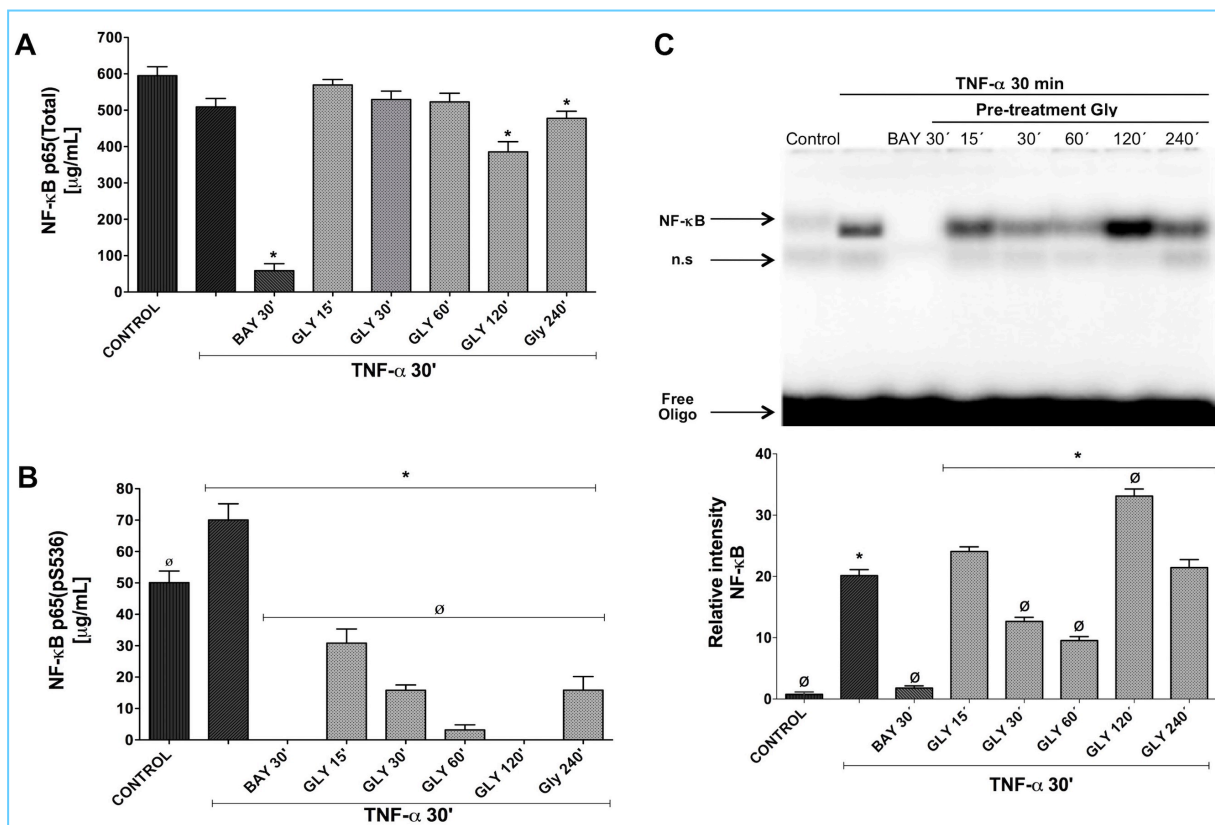


Figura 4. Efecto de la glicina sobre la activación de NF- κ B/TNF- α . Detección de NF- κ B en extractos nucleares de células por EMSA (A). Lisados celulares de NF- κ B total (B) y NF- κ B fosforilado en serina 536 (C). Media \pm S.E.M. (n = 3). * Significativamente diferente con respecto al control (p < 0.05). \emptyset Significativamente diferente con respecto a TNF- α (p < 0.05)

Curiosamente, a los 120 minutos el pretratamiento con glicina detuvo la fosforilación de este factor de transcripción, un efecto similar al control negativo BAY (Figura 4B). Por su parte, los niveles de NF- κ B nuclear, siempre aumentaron

significativamente en comparación con el control debido a la glicina; estos niveles disminuyeron a los 30 y 60 minutos comparados con el TNF- α (Figura 4C), mientras que, a los 120 minutos, aumentaron en un 65% con respecto al TNF- α .

9.3. Efecto de la glicina en la expresión del RNAm y la secreción de citocinas

Los resultados de la expresión y secreción de citocinas en adipocitos pretratados con glicina (10 mM) a 15, 30, 60, 120 y 240 minutos seguidos de una estimulación de TNF- α durante 30 min se muestran en la Figura 5. La glicina disminuyó la expresión de IL-6 con respecto al control y con respecto a TNF- α (Figura 5A). En relación con la expresión de TNF- α , los pretratamientos con glicina a los 15 y 30 minutos aumentaron significativamente en comparación con el control, de forma similar a la estimulación con TNF- α . Por el contrario, a los 60, 120 y 240 minutos, la expresión del TNF- α disminuyó significativamente, de manera similar a la de BAY el control negativo (Figura 5B).

La expresión de RNAm de adiponectina aumentó gradualmente a los 60, 120 y 240 min en presencia de glicina con respecto al control y TNF- α (Figura 5C). En relación con la secreción de citocinas, en tiempos cortos la glicina disminuyó la secreción de IL-6 en comparación con TNF- α ; sin embargo, a los 120 y 240 min se incrementó IL-6 (Figura 5D). La glicina en tiempos cortos y largos a excepción de los 240 minutos, disminuyó significativamente la secreción de TNF- α en comparación

con las células estimuladas con TNF- α (Figura 5E). Además, la glicina aumentó la secreción de adiponectina en todos los tiempos (Figura 5F).

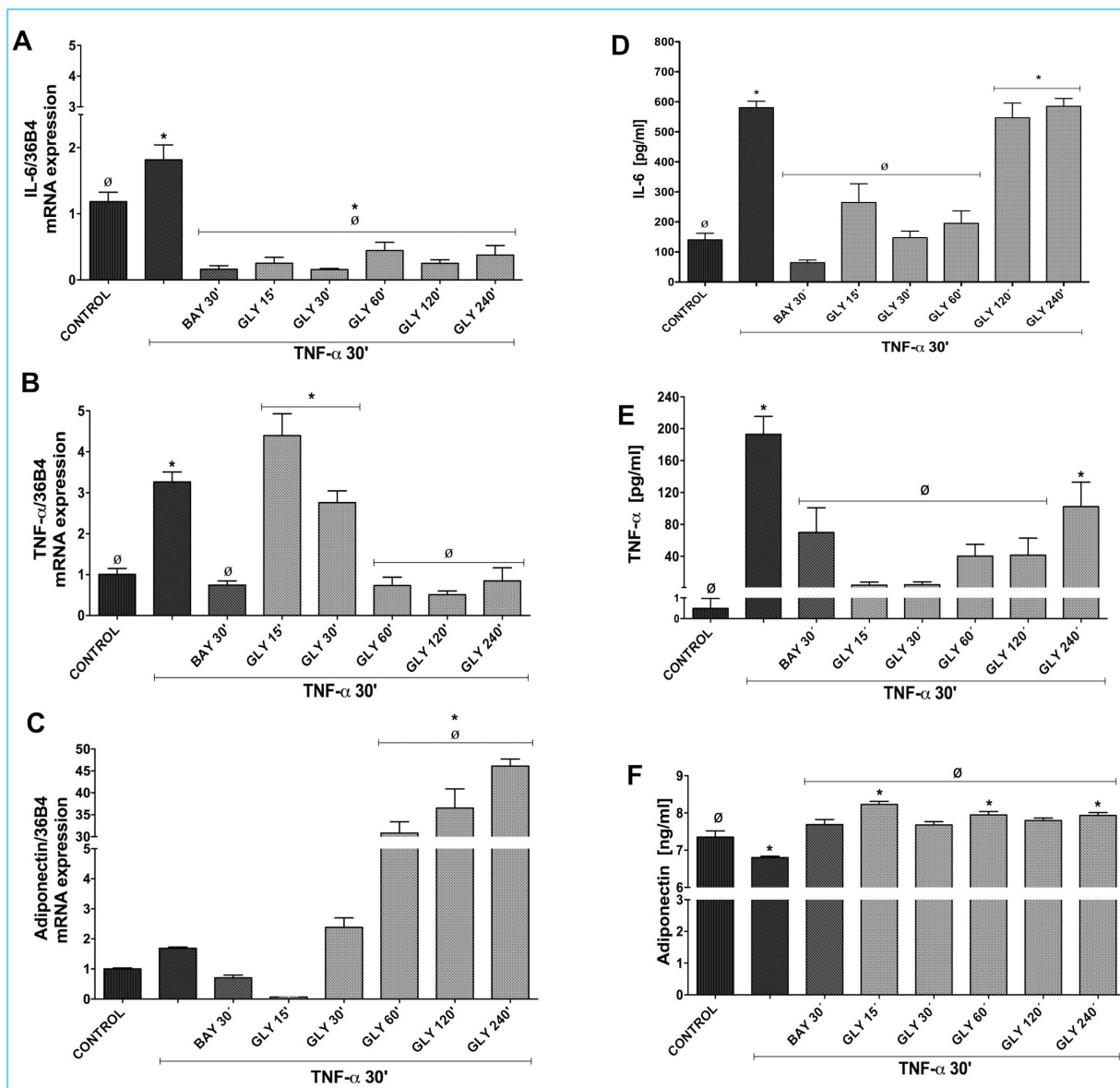


Figura 5. Efecto de la glicina sobre la expresión y secreción de RNAm de citocinas inflamatorias. Expresión de: IL-6 (A), TNF- α , (B) y adiponectina (C). Secreción de IL-6 (D), TNF- α (E), y adiponectina (F). Media \pm S.E.M. (n = 6). * Significativamente diferente del control (p <0.05). ø Significativamente diferente de TNF- α (p <0.05)

9.4 Efecto de la glicina en la expresión del RNAm del GlyR- β

Los resultados obtenidos sobre la expresión de GlyR- β en adipocitos pretratados con glicina 10 mM durante 30 y 60 min se muestran en la Figura 6. Este receptor en el homogeneizado completo del cerebro de ratón se expresó claramente. La glicina aumentó significativamente la expresión de GlyR- β en adipocitos 3T3-L1 en 6 veces con respecto al control que no recibió glicina.

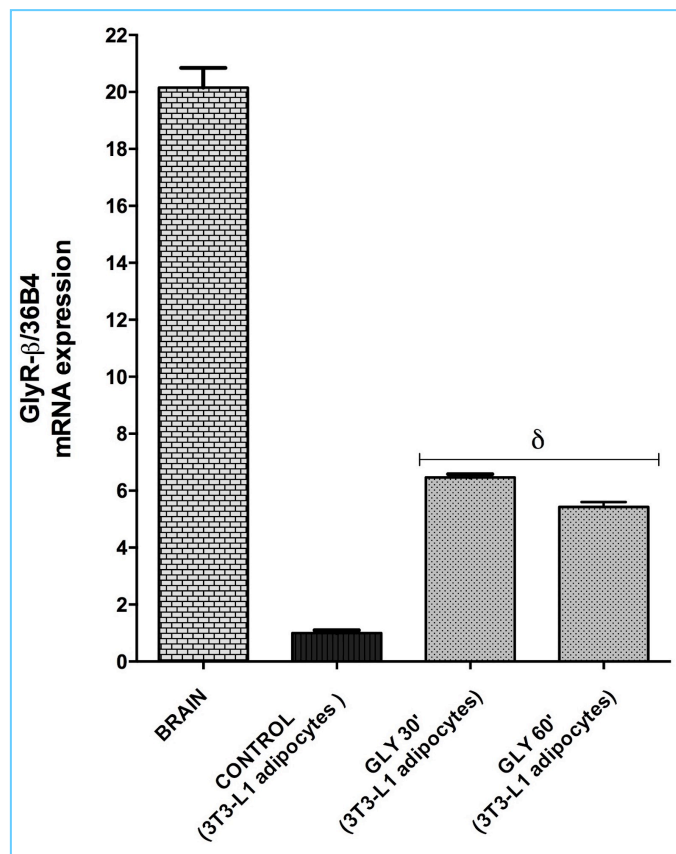


Figura 6. Expresión de RNAm de GlyR- β en cerebro de ratón (BRAIN), en adipocitos 3T3-L1 (CONTROL) y adipocitos 3T3-L1 tratados con glicina 10 mM durante 30 min (GLY 30') y 60 min (GLY 60'). Media \pm S.E.M. (n = 6). δ Significativamente diferente del control ($p < 0.05$)

9.5 Efecto de la glicina y estircina sobre la viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1

Los efectos de las diferentes concentraciones de glicina y estircina se evaluaron sobre la viabilidad celular mediante ensayo de MTT (Figura 7).

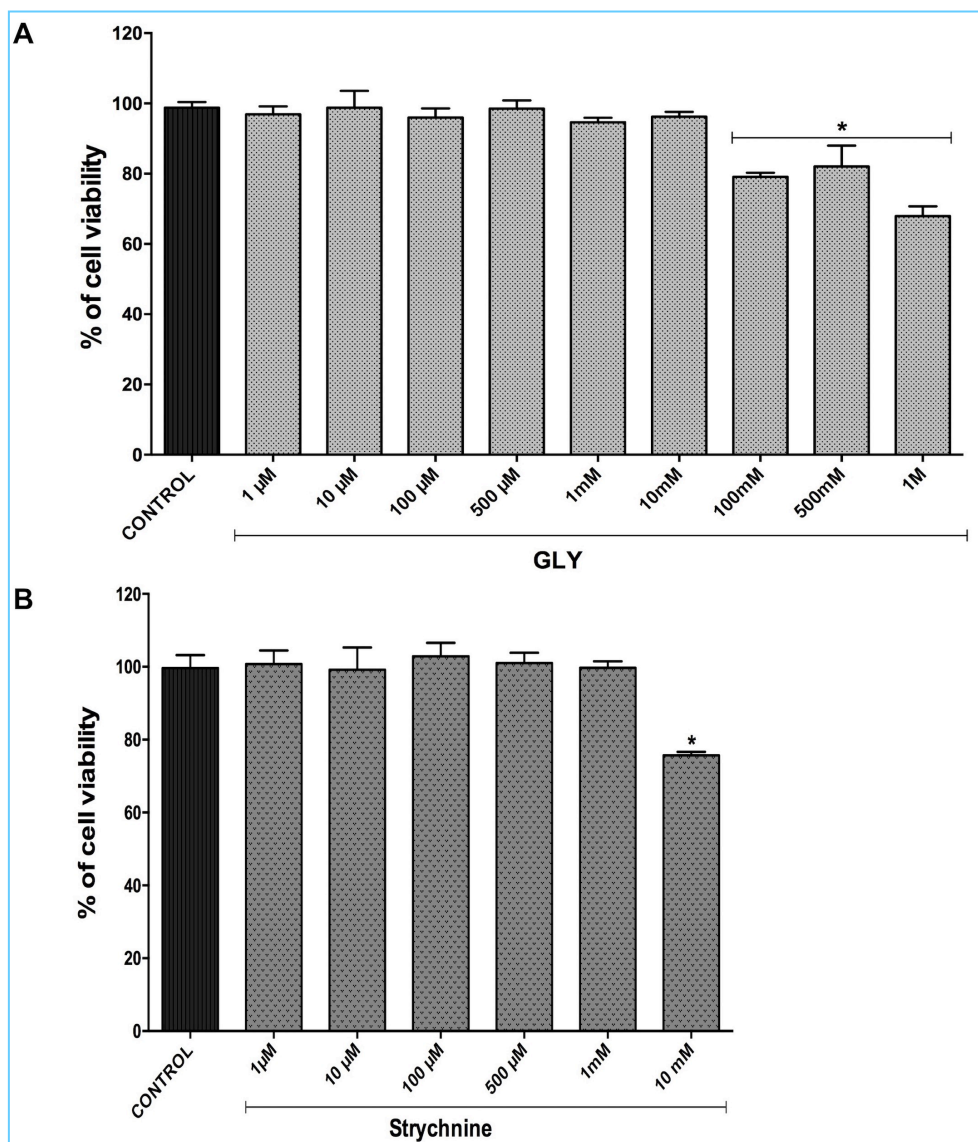


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de glicina (A) y estircina (B) sobre la viabilidad celular a las 2 h de incubación en adipocitos 3T3-L1 (ensayo MTT). Mean \pm S.E.M. (n = 6). * Significativamente diferente del control (p < 0.05).

Los resultados mostraron que la glicina (100, 500 mM y 1 M) y la estricnina (10 mM) redujeron la viabilidad celular en comparación con el control (Figuras 7A y 7B, respectivamente). Las concentraciones de glicina y estricnina de 10 mM y 1 mM, no mostraron diferencias significativas en comparación con el control. Por lo tanto, estas concentraciones se eligieron para continuar los experimentos para medir $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 7B).

9.6 Medición de las $[Ca^{2+}]_i$ después del tratamiento con glicina para explorar la participación de un GlyR en 3T3-L1

La fluorescencia normalizada de $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos 3T3-L1 tratados con EDTA, TNF- α , estricnina, glicina y combinaciones, se muestra en la Figura 8. Glicina, Glicina + TNF- α , BAY + TNF- α y EDTA disminuyeron las $[Ca^{2+}]_i$, mientras que TNF- α y estricnina permanecieron sin cambios con respecto al control (Figura 8A). En B, la barra de escala vertical indica el aumento de la fluorescencia debido a los tratamientos (Figura 8B). Las combinaciones de estricnina + glicina y estricnina + TNF- α no mostraron cambios con respecto al control.

9.7 Acción de la glicina sobre la activación de NF- κ B en presencia de estricnina

Los resultados de la activación de NF- κ B por glicina (10 mM) en presencia de estricnina (1 μ M) a los 30 min seguidos de una estimulación con TNF- α durante 30 min se muestran en la Figura 9. El NF- κ B p65 la proteína total no mostró diferencias significativas en comparación con el control en los lisados celulares (Figura 9A).

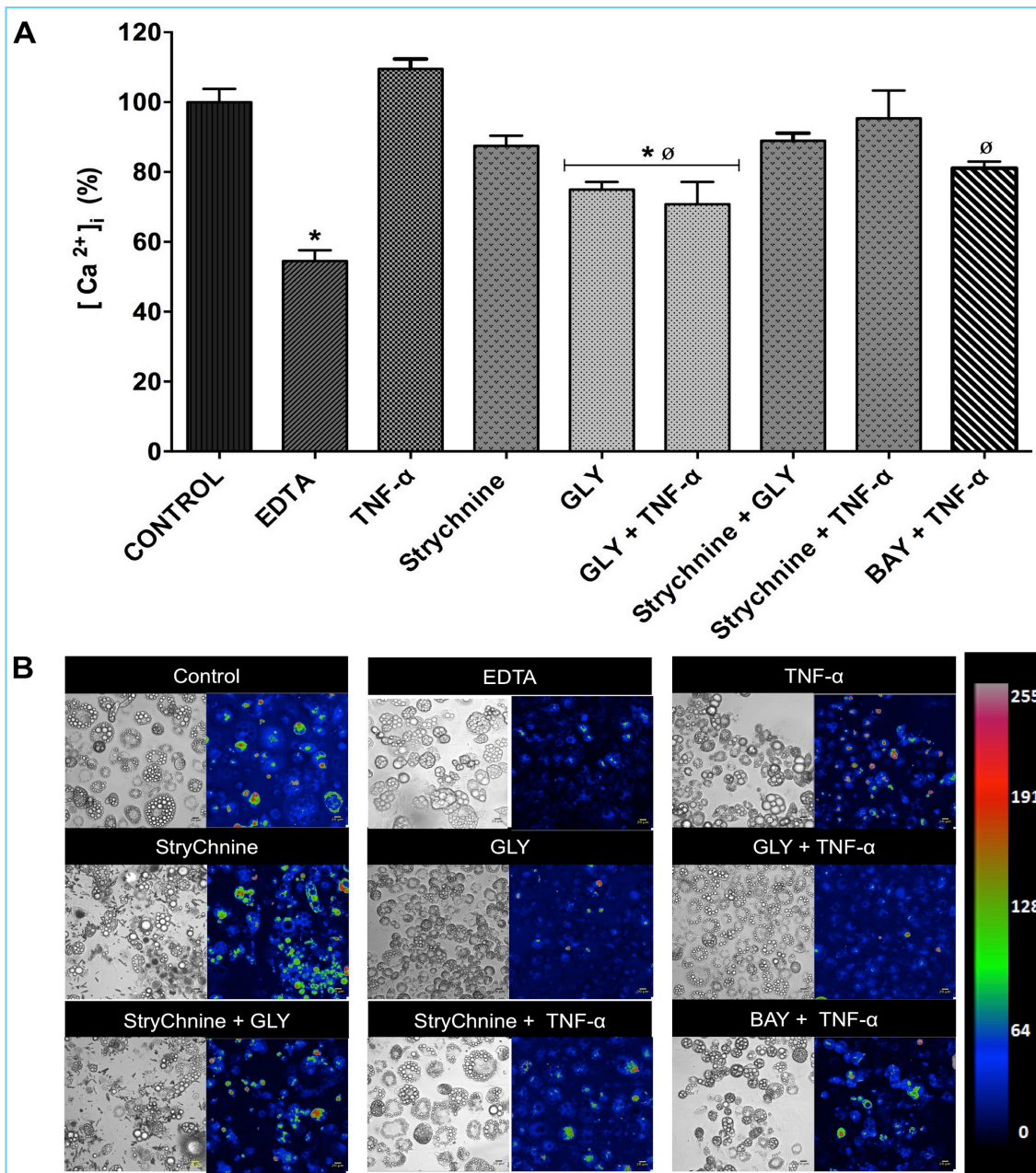


Figura 8. Efecto de la glicina sobre las $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos 3T3-L1 a los 10 min de incubación. Fluorescencia normalizada de $[Ca^{2+}]_i$ en las células tratadas (A). En B, las barras de escala vertical indican los incrementos en la fluorescencia debido a los tratamientos; la fluorescencia de las células 3T3-L1 en los campos brillantes y oscuros mostró cambios en los tonos rojo, verde y azul. Media \pm S.E.M. (n = 6) * Significativamente diferente del control (p < 0.05), [∅] Significativamente diferente de TNF- α (p < 0.05).

Por el contrario, la glicina aumentó significativamente la fosforilación de p65 (pS536) en comparación con el control, de forma similar que TNF- α (Figura 9B). Los tratamientos de Glicina + TNF- α , estricnina, estricnina + glicina y estricnina + TNF- α disminuyeron significativamente la fosforilación con respecto a TNF- α .

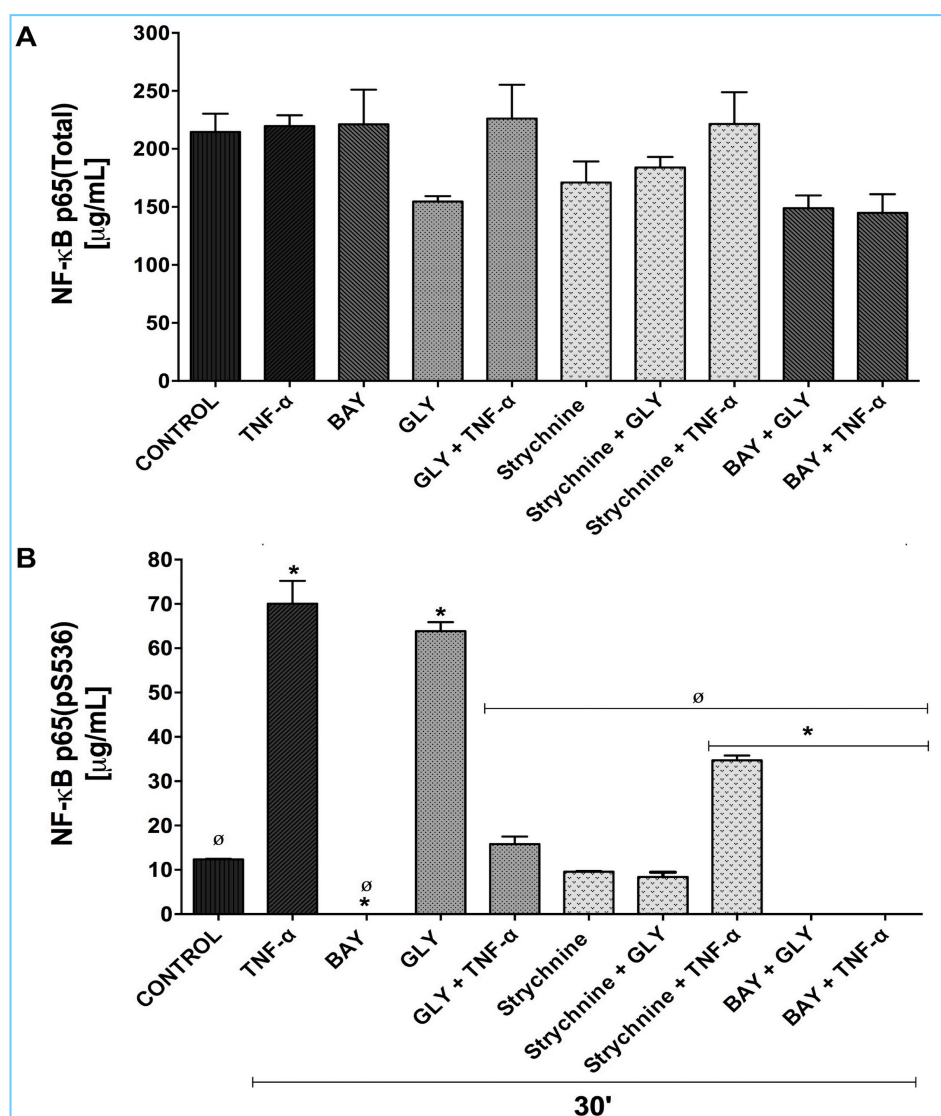


Figura 9. Acción de la glicina sobre la activación de NF- κ B/TNF- α en presencia de estricnina. NF- κ B total de lisados celulares (a) y NF- κ B fosforilado en serina 536 (b). Media \pm S.E.M. (n = 3) * Significativamente diferente del control (p < 0.05). ø Significativamente diferente de TNF- α (p < 0.05).

Sin embargo, la reducción de la fosforilación por estricnina + TNF fue significativamente menor que los otros tratamientos con estricnina y glicina + TNF- α , aunque existió una activación que fue significativa contra el control debido a la estricnina + TNF- α . El control negativo BAY inhibió la fosforilación de este factor de transcripción (Figura 9B).

9.8. Microscopía confocal de los GlyR- α y GlyR- β en adipocitos 3T3-L1

Los resultados del análisis por microscopía confocal con ambos receptores, GlyR- α y GlyR- β , en adipocitos 3T3-L1 tratados con glicina a los 30 y 60 minutos se muestran en las Figs. 10 y 11. La Figura 10 muestra que el GlyR- β está presente en este tipo de célula; los tonos azules indican la fluorescencia de DAPI, que se usó para teñir el núcleo; el verde indica la fluorescencia de GlyR- β , y la fusión de las dos imágenes. La glicina a los 30 y 60 minutos mostró un aumento en la fluorescencia en ambos tiempos con respecto al control. En la Figura 11, la presencia del GlyR- α es evidente en el color rojo; el azul de los núcleos y el fusionado de las imágenes también se muestran. La glicina aumentó la fluorescencia del GlyR- α en comparación con el control, y a los 30 minutos hubo una elevación significativa en la fluorescencia de este receptor.

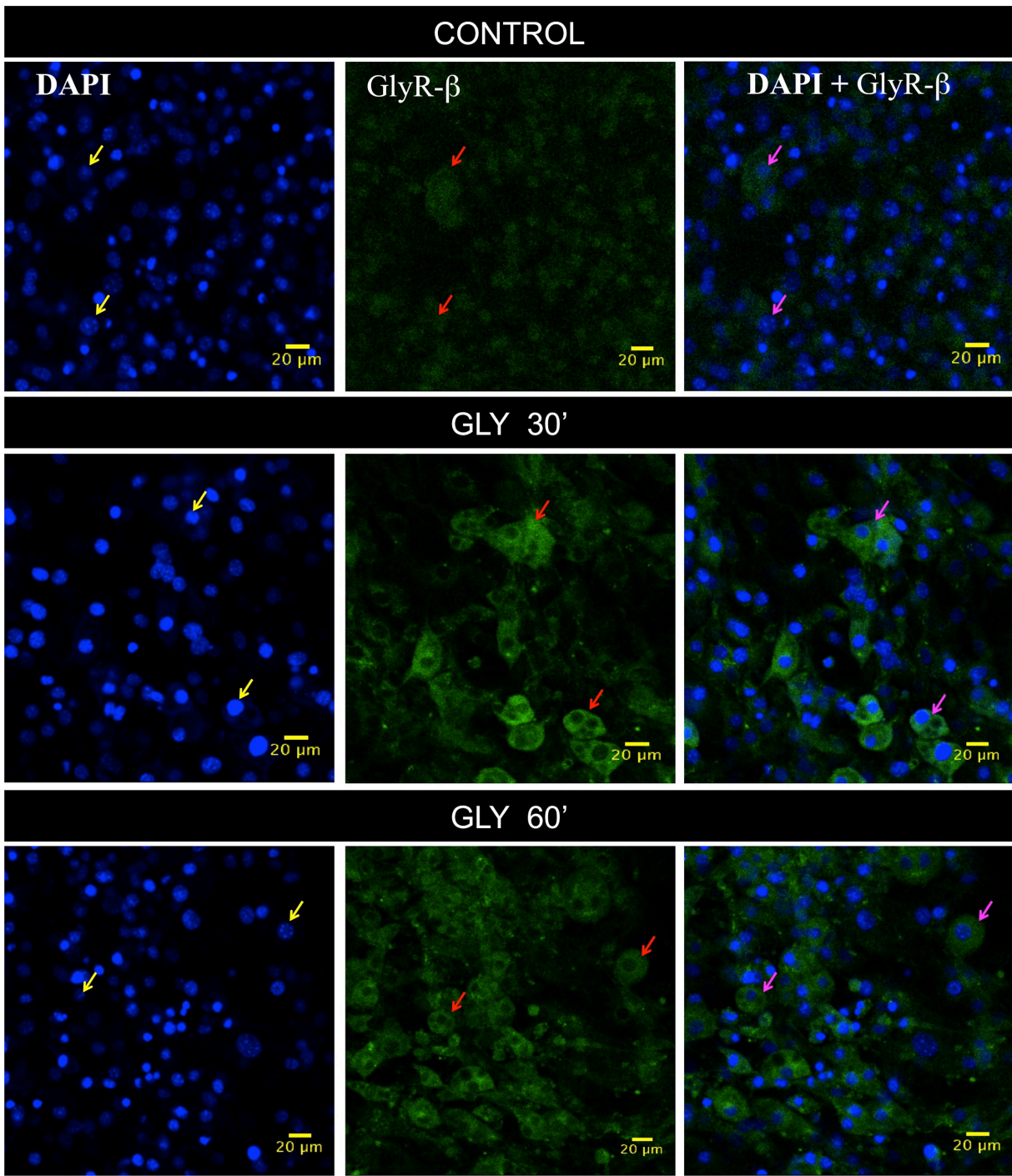


Figura 10. Fotomicrográficas de fluorescencia confocal de GlyR- β , en adipocitos 3T3-L1 tratados con glicina 10 mM durante 30 y 60 min (aumento X20).

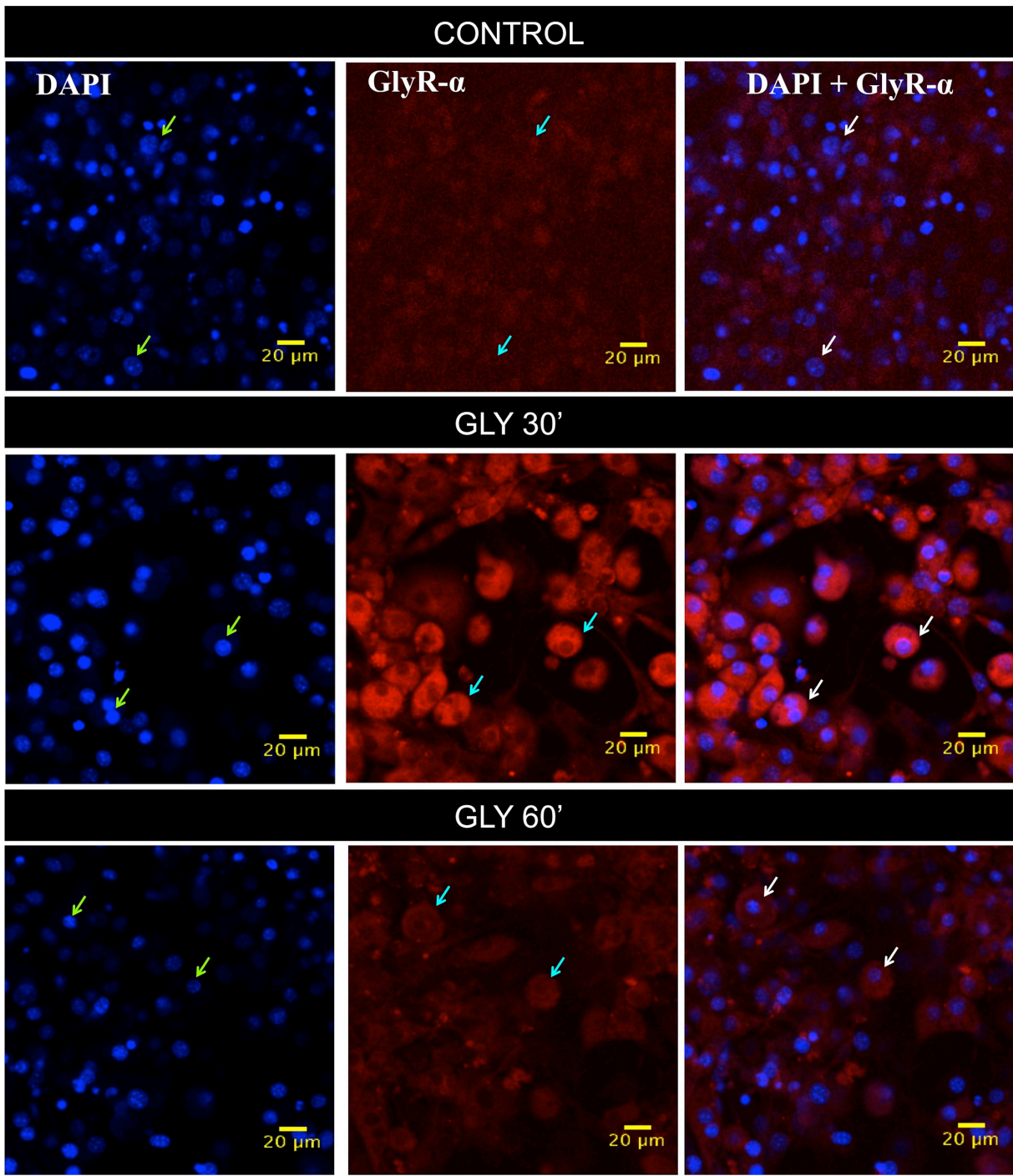


Figura 11. Fotomicrografías de fluorescencia confocal de GlyR- α en adipocitos 3T3-L1 tratados con glicina 10 mM durante 30 y 60 min (aumento X20).

10. DISCUSIÓN

Los estudios anteriores apoyan la idea de que la glicina puede estar regulando el proceso inflamatorio crónico presente en la obesidad a través de un mecanismo que implica la vía de señalización TNF- α /NF- κ B (Blancas-Flores y col., 2012). La mayoría de los procesos inflamatorios están regulados por NF- κ B, y su activación por TNF- α juega un papel fundamental en la regulación de esta vía (Hayden y Ghosh, 2004; Schmitz y col., 2004).

Las proteínas cinasas IKK forman un complejo constituido por la cinasa IKK α e IKK β , proteínas con un alto grado de similitud en sus secuencias que catalizan la fosforilación de las proteínas I κ B y representa un punto de convergencia para la mayoría de las vías de transducción de señales que conducen a la activación de NF- κ B (Hacker and Karin, 2006; Krappmann y col., 2000). IKK α e IKK β median la activación de NF- κ B en respuesta a las citocinas proinflamatorias, catalizando la fosforilación de I κ B. A pesar de la extensa similitud en sus, secuencia IKK- α e IKK- β tienen funciones muy distintas, debido a sus diferentes especificidades de sustrato y modos de regulación (Oeckinghaus y col., 2011). Las funciones IKK- α en la activación de una forma específica de NF- κ B en respuesta a un subconjunto de miembros de la familia TNF también pueden servir para atenuar la IKK- β , disminuyendo la activación de NF- κ B (Hacker and Karin, 2006).

En la presente investigación, los resultados mostraron que el pretratamiento con glicina en presencia de TNF- α aumentan IKK α en tiempos cortos y largos (30 a 120 min). Sin embargo, este efecto disminuyó en tiempos más largos (240 min), lo que resultó en la inhibición de IKK- α en Thr23. IKK β es esencial para la rápida activación de NF- κ B a través de las cascadas de señalización proinflamatorias, tales como las desencadenadas por TNF- α o lipopolisacárido (LPS) (Spittler y col., 1999; Vallabhapurapu and Karin, 2009; Wegener and Krappmann, 2008). TNF- α estimula la fosforilación de IKK- β en dos residuos de serina, Ser179/ 177 y Ser180/181, que se encuentran en su sitio de activación (Ling y col., 1998). La fosforilación en ambos sitios es necesaria para la activación del complejo IKK (Tang y col., 2003).

En esta investigación, el complejo IKK- α/β no fosforilado se evaluó simultáneamente, disminuyendo a los 15 min y aumentando posteriormente a los 240 min. Sin embargo, cuando el complejo IKK- α/β se fosforila (Ser176/177), sus niveles se elevaron a 15 y 30 minutos (4 veces), y disminuyeron a 60, 120 y 240 minutos (2 veces). Por lo tanto, en tiempos cortos la glicina podría estar fosforilando a I κ B- α , translocando al núcleo a los heterodímeros RelA-p50 (NF- κ B) y activando la expresión de diferentes genes antiinflamatorios; por su parte, I κ B- α sufre ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. Además, la glicina inhibió la producción de citocinas proinflamatorias en tiempos más largos.

RelA (p65) y p50 (precursor p105) tienen un dominio de dimerización y unión a DNA altamente conservado denominado región de homología de Rel (RHR) que les permite la formación de homodímeros o heterodímeros (Bonizzi and Karin, 2004;

Ghosh and Karin, 2002; Vallabhapurapu and Karin, 2009). p65 contiene un dominio de transactivación C-terminal (TAD) que permite activar la expresión del gen diana; p50 también tiene un dominio que contiene la repetición de anquirina (ARD) en su extremo C en lugar del dominio TAD y, por lo tanto, no puede activar la expresión del gen diana como un homodímero (Bonizzi and Karin, 2004; Vallabhapurapu and Karin, 2009). Las proteínas NF- κ B liberadas son luego transportadas al núcleo donde se unen a sus secuencias diana y activan la transcripción génica (Napetschnig and Wu, 2013).

Para confirmar esta hipótesis se midió NF- κ B total, nuclear y fosforilado, fue mediado por la activación de TNF- α en presencia y ausencia de glicina. Los resultados mostraron que la glicina redujo la proteína total NF- κ B p65 únicamente a 240 min; el NF- κ B nuclear presentó un efecto oscilatorio que disminuyó a los 30 y 60 min, y se incrementó a los 120 min; Curiosamente, la glicina disminuyó la fosforilación de p65 (pS536) en todos los tiempos, abatiendo por completo la activación de este factor a los 120 minutos. Por lo tanto, estos resultados indicaron que la glicina no inhibe la translocación nuclear de NF- κ B, porque se incrementa a 120 min en el núcleo. Sin embargo, éste no está fosforilado.

Varios autores han reportado que IKK β puede afectar la señalización de la insulina a través de 2 vías: mediante la fosforilación de residuos de serina en IRS-1 o fosforilando I κ B, generando la activación de NF- κ B y la estimulación de la producción

de múltiples mediadores inflamatorios, incluidos TNF- α e IL -6 (Gao y col., 2002; Yin y col., 1998). De esta forma, la sobreproducción de TNF- α en el tejido adiposo es una característica importante de la obesidad y su acción puede alterar la regulación normal del metabolismo energético en numerosos sitios, incluida la regulación transcripcional del receptor de glucosa, el metabolismo de los ácidos grasos y la señalización del receptor hormonal, propiciando la resistencia a la insulina (Aguirre y col., 2000; Wellen and Hotamisligil, 2005; Yin y col., 1998). Nuestros resultados mostraron que la glicina aumentó la expresión de TNF- α al comienzo, que disminuyó a través del tiempo.

Por el contrario, la secreción de TNF- α por glicina se incrementó gradualmente, alcanzando un nivel significativo a los 240 minutos, probablemente como consecuencia de los tiempos de expresión iniciales. En relación con la IL-6, se ha descrito que los adipocitos pueden secretar entre 10-35%, actuando como un posible mediador metabólico, ya que su concentración aumenta en la obesidad, la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa (Fasshauer y col., 2003). Nuestros resultados mostraron disminución de la expresión de IL-6 en todo momento del ensayo debido al tratamiento con glicina. Sin embargo, su secreción se observó aumentada al final de la prueba, probablemente como un mecanismo compensatorio de una vía alternativa, porque la IL-6 puede regularse mediante la señalización de una red compleja independiente de la vía TNF- α /NF- κ B.

Mucho se ha discutido sobre los efectos múltiples de la glicina, actuando como un antioxidante, citoprotector y regulador del proceso inflamatorio (Amin y col., 2016;

Matilla y col., 2002; Zhong y col., 2003). Sin embargo, se sabe poco sobre el mecanismo de acción de la glicina en estos procesos. Las posibles vías en las que puede estar involucrada la glicina han sido hipotetizadas (Almanza-Perez y col., 2010; Almanza-Perez y col., 2008; Blancas-Flores y col., 2012; Matilla y col., 2002). Una de estas vías es la activación de NF- κ B, estimulada por TNF- α , en la que se ha demostrado que la glicina inhibe a NF- κ B (Blancas-Flores y col., 2012). En el presente estudio en adipocitos, demostramos que la glicina disminuye la fosforilación del complejo IKK- α/β , así como de su inhibidor I κ B- α , generando una menor expresión y síntesis de citocinas proinflamatorias, regulando así el proceso inflamatorio. Sin embargo, las posibles implicaciones de la glicina en el receptor TNF- α o la participación de un GlyR en el adipocito que podría explicar la acción de la glicina en estas células, como ya se ha descrito en células de Kupffer, macrófagos alveolares y neutrófilos (Lynch, 2004; Matilla y col., 2002), pero aún no ha sido explorado. Estos receptores están asociados a un canal compuesto por tres subunidades distintas: una subunidad α de 48 kDa, una subunidad β de 58 kDa y una proteína de anclaje citoplásmico de 93 kDa, gefirina (Betz and Laube, 2006; Wheeler y col., 1999).

Los resultados obtenidos sugieren una posible participación de los receptores de la glicina, cuya interacción con la glicina podría resultar en una disminución de la fosforilación de NF- κ B estimulada por TNF- α . Del mismo modo, el aumento en la expresión del GlyR- β es 6 veces mayor con respecto al control y en la fluorescencia en la membrana plasmática como evidencia de la presencia de ambas subunidades

del receptor en la membrana de los adipocitos 3T3-L1, junto con la disminución en las $[Ca^{2+}]_i$ en adipocitos 3T3-L1 tratados con glicina en comparación con el control, sugiere la participación de ambas subunidades del receptor en la actividad de glicina. De la misma manera, la activación incrementada de NF- κ B por estriocnina + TNF- α , indicó que en presencia de este antagonista la activación no está totalmente bloqueada, al contrario de lo observado con Glicina + TNF- α , que disminuyó la fosforilación a valores similares como el control.

Por lo tanto, GlyR podría estar participando, al menos en parte, en la inhibición de la ruta de señalización de TNF- α /NF- κ B en adipocitos 3T3-L1. En particular, Matilla y colaboradores en el 2002, describieron un posible mecanismo que implica la presencia de un receptor específico para la glicina en las células del sistema inmune, como células de Kupffer, macrófagos, etc. que, cuando se unen a él, aumenta el flujo de iones de cloro, lo que genera hiperpolarización de la membrana y por lo tanto, el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana plasmática, el cual conduce a la hiperpolarización y bloquea la afluencia de calcio (Lynch, 2004; Webb and Lynch, 2007). De acuerdo con esto (Matilla y col., 2002), es probable que la producción de señales intracelulares y la producción de citocinas proinflamatorias que dependen del aumento de calcio intracelular se pueda bloquear de esta manera en los adipocitos 3T3-L1 (Matilla y col., 2002). Sin embargo, la asociación entre estas dos hipótesis se debe de abordar en posteriores estudios.

11. CONCLUSIÓN

1. La glicina inhibe la fosforilación de NF- κ B mediante el bloqueo del complejo IKK- α/β , lo cual podría explicar la regulación de citocinas inflamatorias.
2. La glicina en adipocitos, aumentó significativamente la expresión del GlyR- β y redujo las $[Ca^{+2}]_i$.
3. La estricnina bloqueó los efectos de la glicina: disminución de $[Ca^{+2}]_i$ y fosforilación de NF- κ B.
4. La acción de la glicina sobre citocinas inflamatorias en el adipocito se puede explicar, al menos en parte, por inhibición de la fosforilación del Complejo IKK- α/β , con una posible participación de un receptor específico en adipocitos 3T3-L1 (Figura 12).

12. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la participación de otras moléculas implicadas en la vía TNF- α /NF- κ B.
2. Determinar los cambios de potencial de membrana mediante la técnica de Patch Clamp.
3. Realizar estudios de silenciamiento con los componentes de la vía y los receptores de glicina.
4. Realizar estudios de colocalización celular y farmacocinética de la glicina *in vivo*.
5. Explorar otras vías que podrían estar implicadas en la acción antiinflamatoria de la glicina.

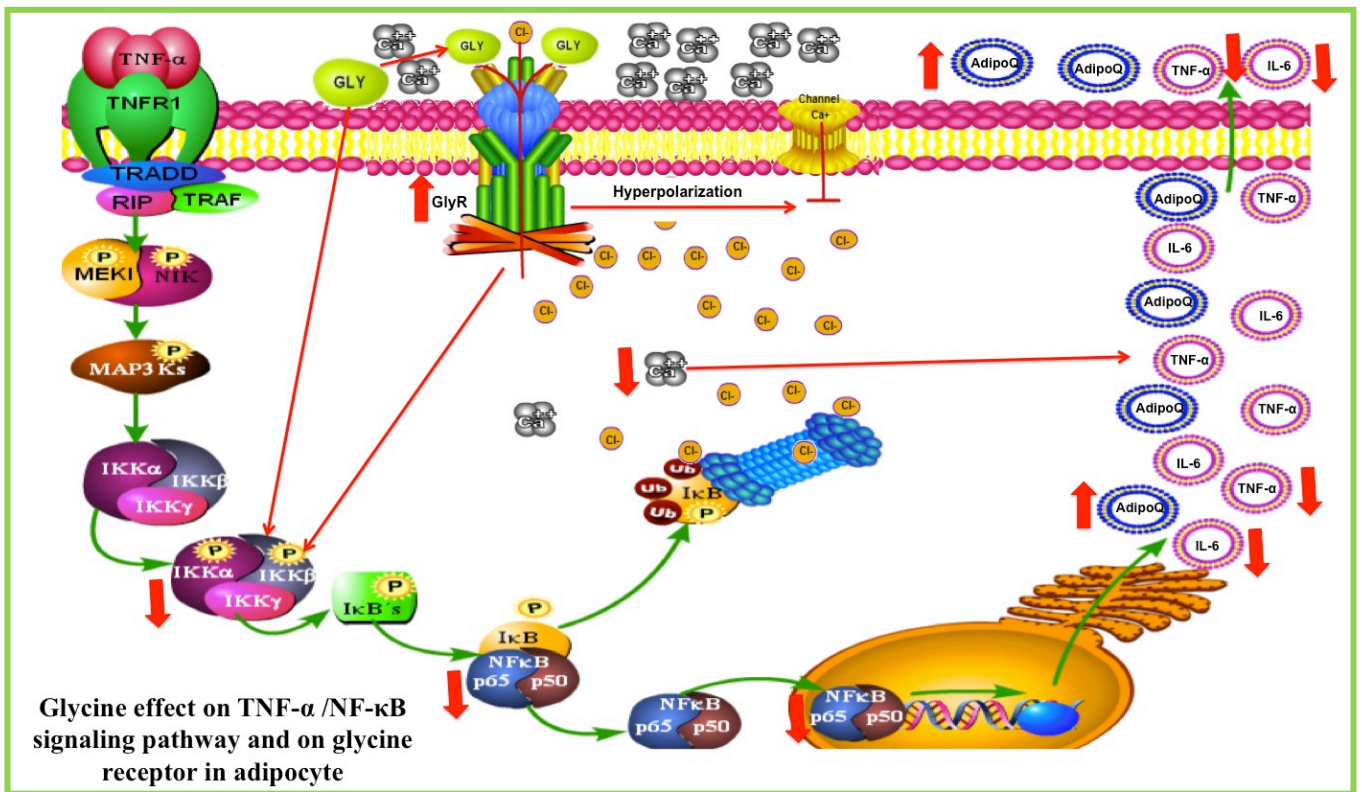


Figura 12. Activación de la vía NF- κ B y participación de la glicina en la inhibición del complejo IKK- α/β . En general, los ligandos de TNF- α inician la señalización del receptor de TNF (TNFR) a través de la trimerización inducida por ligando, lo que conduce a la oligomerización de las proteínas adaptadoras asociadas. Los receptores de muerte, como CD95, primero reclutan FAS asociado al dominio de la muerte (FADD) directamente o a través del adaptador TNFR1 asociado al dominio de muerte (TRADD), generando la fosforilación de la proteína cinasa cinasa cinasa 3 activada por mitógeno (MAPKKK3) y proteína cinasa serina / treonina asociada al receptor; Un evento crucial corriente abajo del receptor TNF es la activación del complejo κ B kinasa- α (IKK- α), IKK- β , IKK- γ , en el que las dos primeras proteínas catalizan la fosforilación de κ B, mientras que IKK- γ regula esta actividad. Esto genera la fosforilación de las proteínas inhibitorias llamadas κ Bs, induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S, y la translocación al núcleo de los heterodímeros del factor nuclear κ B (NF- κ B) p65-p50 y con la consecuente transcripción, activación y expresión de diferentes genes en la inflamación. La glicina disminuye la fosforilación de un punto importante de la activación de NF κ B. El complejo IKK permite la fosforilación de κ B, que permite la translocación nuclear de NF κ B. Sin embargo, la glicina disminuye la expresión y la secreción de citocinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6) y el aumento de la expresión y secreción de adiponectina (AdipoQ). Sin embargo, la glicina al unirse a su receptor genera la apertura de los canales de cloro de la membrana plasmática de las células, inicia el influjo de iones cloro, generando la hiperpolarización de la membrana de esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citocinas que son dependientes del incremento del $[Ca^{+2}]$.

12. BIBLIOGRAFÍA

- ★ **Aggarwal, B.B.**, 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.
- ★ **Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F.**, 2000. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054.
- ★ **Alarcon-Aguilar, F.J., Almanza-Perez, J., Blancas, G., Angeles, S., Garcia-Macedo, R., Roman, R., Cruz, M.**, 2008. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. *Eur J Pharmacol* 599, 152-158.
- ★ **Alarcon-Aguilar, F.J., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Jasso-Villagomez, E.I., Almanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Zamilpa, A., Diaz-Flores, M., Roman-Ramos, R.**, 2010. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *J Ethnopharmacol* 132, 400-407.
- ★ **Almanza-Perez, J.C., Alarcon-Aguilar, F.J., Blancas-Flores, G., Campos-Sepulveda, A.E., Roman-Ramos, R., Garcia-Macedo, R., Cruz, M.**, 2010. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed Pharmacother* 64, 534-540.
- ★ **Almanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Garcia-Macedo, R., Alarcon-Aguilar, F.J., Cruz, M.**, 2008. [Leptin and its association with obesity and type 2 diabetes]. *Gac Med Mex* 144, 535-542.
- ★ **Amin, F.U., Shah, S.A., Kim, M.O.**, 2016. Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain. *Neurochem Int* 96, 1-12.
- ★ **Betz, H., Laube, B.**, 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 97, 1600-1610.
- ★ **Blancas-Flores, G., Alarcon-Aguilar, F.J., Garcia-Macedo, R., Almanza-Perez, J.C., Flores-Saenz, J.L., Roman-Ramos, R., Ventura-Gallegos, J.L., Kumate, J., Zentella-Dehesa, A., Cruz, M.**, 2012. Glycine suppresses TNF-alpha-induced activation of NF-kappaB in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 689, 270-277.
- ★ **Bonizzi, G., Karin, M.**, 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.

- ★ **Bours, V., Bonizzi, G., Bentires-Alj, M., Bureau, F., Piette, J., Lekeux, P., Merville, M.,** 2000. NF-kappaB activation in response to toxic and therapeutic agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology* 153, 27-38.
- ★ **Bray, C., Son, J.H., Kumar, P., Harris, J.D., Meizel, S.,** 2002. A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod* 66, 91-97.
- ★ **Brun-Buisson, C.,** 2000. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1, S64-74.
- ★ **Contreras-Nuñez, E.,** 2013. Efecto de la glicina sobre la vía de activación de NF-κB y su regulación en adipocitos. Maestría en Biología Experimental, UAM-Iztapalapa.
- ★ **Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A., Zhang, D.,** 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793-798.
- ★ **Chomczynski, P., Sacchi, N.,** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- ★ **Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., Cheng, G.,** 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- ★ **Dinarello, C.A.,** 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.
- ★ **Eichacker, P.Q., Parent, C., Kalil, A., Esposito, C., Cui, X., Banks, S.M., Gerstenberger, E.P., Fitz, Y., Danner, R.L., Natanson, C.,** 2002. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1197-1205.
- ★ **Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., Bahouth, S.W.,** 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.
- ★ **Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., Paschke, R.,** 2003. 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.
- ★ **Froh, M., Thurman, R.G., Wheeler, M.D.,** 2002. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G856-863.

- * **Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M.J., Ye, J., 2002.** Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277, 48115-48121.
- * **Garcia Barreno, P., 2008.** [Research and surgery]. *Actas Urol Esp* 32, 3-23.
- * **Garcia-Macedo, R., Sanchez-Munoz, F., Almanza-Perez, J.C., Duran-Reyes, G., Alarcon-Aguilar, F., Cruz, M., 2008.** Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells. *Eur J Pharmacol* 587, 317-321.
- * **Gaur, U., Aggarwal, B.B., 2003.** Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66, 1403-1408.
- * **Ghosh, S., Hayden, M.S., 2008.** New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848.
- * **Ghosh, S., Karin, M., 2002.** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- * **Hacker, H., Karin, M., 2006.** Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006, re13.
- * **Harvey, R.J., Schmieden, V., Von Holst, A., Laube, B., Rohrer, H., Betz, H., 2000.** Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci* 12, 994-1001.
- * **Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004.** Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.
- * **Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008.** Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.
- * **Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006.** NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.
- * **Hotamisligil, G.S., 2003.** Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S53-55.
- * **Hotamisligil, G.S., 2006.** Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- * **Huynh, Q.K., Boddupalli, H., Rouw, S.A., Koboldt, C.M., Hall, T., Sommers, C., Hauser, S.D., Pierce, J.L., Combs, R.G., Reitz, B.A., Diaz-Collier, J.A., Weinberg, R.A., Hood, B.L., Kilpatrick, B.F., Tripp, C.S., 2000.** Characterization of the recombinant IKK1/IKK2 heterodimer. Mechanisms regulating kinase activity. *J Biol Chem* 275, 25883-25891.

- ★ **Karin, M., Lin, A.,** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.
- ★ **Krappmann, D., Hatada, E.N., Tegethoff, S., Li, J., Klippel, A., Giese, K., Baeuerle, P.A., Scheidereit, C.,** 2000. The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J Biol Chem* 275, 29779-29787.
- ★ **Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmítko, P.E., Verma, S.,** 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2031-2041.
- ★ **Laube, B., Maksay, G., Schemm, R., Betz, H.,** 2002. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 23, 519-527.
- ★ **Lavorgna, A., De Filippi, R., Formisano, S., Leonardi, A.,** 2009. TNF receptor-associated factor 1 is a positive regulator of the NF-kappaB alternative pathway. *Mol Immunol* 46, 3278-3282.
- ★ **Ling, L., Cao, Z., Goeddel, D.V.,** 1998. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3792-3797.
- ★ **Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J.,** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- ★ **Lynch, J.W.,** 2004. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84, 1051-1095.
- ★ **Matilla, B., Mauriz, J.L., Culebras, J.M., Gonzalez-Gallego, J., Gonzalez, P.,** 2002. [Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient]. *Nutr Hosp* 17, 2-9.
- ★ **May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glockner, J., Pober, J.S., Ghosh, S.,** 2000. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 289, 1550-1554.
- ★ **Medzhitov, R.,** 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- ★ **Memet, S.,** 2006. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* 72, 1180-1195.
- ★ **Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Komeda, K., Tsuchida, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K., Kadowaki, T.,** 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 21, 2521-2532.

- ★ **Miranda-Perez, M.E., Ortega-Camarillo, C., Del Carmen Escobar-Villanueva, M., Blancas-Flores, G., Alarcon-Aguilar, F.J.,** 2016. Cucurbita ficifolia Bouche increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca(2+) from the endoplasmic reticulum. *J Ethnopharmacol* 188, 159-166.
- ★ **Mosmann, T.,** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- ★ **Napetschnig, J., Wu, H.,** 2013. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys* 42, 443-468.
- ★ **Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., Sugiura, S.,** 2008. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* 118, 710-721.
- ★ **Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S.,** 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12, 695-708.
- ★ **Opal, S.M., DePalo, V.A.,** 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162-1172.
- ★ **Perkins, N.D.,** 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25, 6717-6730.
- ★ **Recasens, M., Ricart, W., Fernandez-Real, J.M.,** 2004. [Obesity and inflammation]. *Rev Med Univ Navarra* 48, 49-54.
- ★ **Ruan, H., Lodish, H.F.,** 2003. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 447-455.
- ★ **Ruan, H., Miles, P.D., Ladd, C.M., Ross, K., Golub, T.R., Olefsky, J.M., Lodish, H.F.,** 2002. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176-3188.
- ★ **Sakata, Y., Owada, Y., Sato, K., Kojima, K., Hisanaga, K., Shinka, T., Suzuki, Y., Aoki, Y., Satoh, J., Kondo, H., Matsubara, Y., Kure, S.,** 2001. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 94, 119-130.
- ★ **Sato, Y., Son, J.H., Meizel, S.,** 2000a. The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *J Androl* 21, 99-106.
- ★ **Sato, Y., Son, J.H., Tucker, R.P., Meizel, S.,** 2000b. The zona pellucida-initiated acrosome reaction: defect due to mutations in the sperm glycine receptor/Cl(-) channel. *Dev Biol* 227, 211-218.

- ★ **Sbarbati, A., Osculati, F., Silvagni, D., Benati, D., Galie, M., Camoglio, F.S., Rigotti, G., Maffei, C.,** 2006. Obesity and inflammation: evidence for an elementary lesion. *Pediatrics* 117, 220-223.
- ★ **Schmitz, M.L., Mattioli, I., Buss, H., Kracht, M.,** 2004. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5, 1348-1358.
- ★ **Schomer-Miller, B., Higashimoto, T., Lee, Y.K., Zandi, E.,** 2006. Regulation of IkappaB kinase (IKK) complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta. *J Biol Chem* 281, 15268-15276.
- ★ **Scotto d'Abusco, A., Politi, L., Giordano, C., Scandurra, R.,** 2010. A peptidyl-glucosamine derivative affects IKKalpha kinase activity in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 12, R18.
- ★ **Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A.,** 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.
- ★ **Spittler, A., Reissner, C.M., Oehler, R., Gornikiewicz, A., Gruenberger, T., Manhart, N., Brodowicz, T., Mittlboeck, M., Boltz-Nitulescu, G., Roth, E.,** 1999. Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF-alpha production and accelerated IL-10 expression. *FASEB J* 13, 563-571.
- ★ **Surmi, B.K., Hasty, A.H.,** 2008. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 3, 545-556.
- ★ **Tang, E.D., Inohara, N., Wang, C.Y., Nunez, G., Guan, K.L.,** 2003. Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in IkappaB kinase beta (IKKbeta) activation [corrected]. *J Biol Chem* 278, 38566-38570.
- ★ **Vallabhapurapu, S., Karin, M.,** 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
- ★ **van Leiden, H.A., Dekker, J.M., Moll, A.C., Nijpels, G., Heine, R.J., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D., Polak, B.C.,** 2002. Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: the hoorn study. *Diabetes Care* 25, 1320-1325.
- ★ **Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.,** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- ★ **Weaver, C.D., Partridge, J.G., Yao, T.L., Moates, J.M., Magnuson, M.A., Verdoorn, T.A.,** 1998. Activation of glycine and glutamate receptors increases intracellular calcium in cells derived from the endocrine pancreas. *Mol Pharmacol* 54, 639-646.
- ★ **Webb, T.I., Lynch, J.W.,** 2007. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des* 13, 2350-2367.

- ★ **Wegener, E., Krappmann, D., 2008.** Dynamic protein complexes regulate NF-kappaB signaling. *Handb Exp Pharmacol*, 237-259.
- ★ **Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., Jr., 2003.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- ★ **Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2003.** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1785-1788.
- ★ **Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005.** Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119.
- ★ **Wheeler, M., Stachlewitz, R.F., Yamashina, S., Ikejima, K., Morrow, A.L., Thurman, R.G., 2000.** Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* 14, 476-484.
- ★ **Wheeler, M.D., Ikejima, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R.F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M.L., Rusyn, I., Bradford, B., Thurman, R.G., 1999.** Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci* 56, 843-856.
- ★ **Wicovsky, A., Salzman, S., Roos, C., Ehrenschwender, M., Rosenthal, T., Siegmund, D., Henkler, F., Gohlke, F., Kneitz, C., Wajant, H., 2009.** TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* 16, 1445-1459.
- ★ **Yamagishi, S., Nakamura, K., Jinnouchi, Y., Takenaka, K., Imaizumi, T., 2005.** Molecular mechanisms for vascular injury in the metabolic syndrome. *Drugs Exp Clin Res* 31, 123-129.
- ★ **Yin, M.J., Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., 1998.** The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77-80.
- ★ **Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., Lemasters, J.J., 2003.** L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6, 229-240.



Participation of the IKK- / complex in the inhibition of the TNF- /NF- B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes

Erika Contreras-Nu ez^a, Gerardo Blancas-Flores^a, Miguel Cruz^c, Julio Cesar Almanza-Perez^a, Jaime H. Gomez-Zamudio^c, Jose Luis Ventura-Gallegos^{d, e}, Alejandro Zentella-Dehesa^{d, e}, Roberto-Lazzarini^b, Ruben Roman-Ramos^a, Francisco Javier Alarcon-Aguilar^a

^a Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), Avenida San Rafael Atlixco 186, A.P. 55-535, C.P. 09340, Mexico City, Mexico

^b Laboratorio Divisional de Microscopia Confocal, DCBS, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), Avenida San Rafael Atlixco 186, A.P. 55-535, C.P. 09340, Mexico City, Mexico

^c Unidad de Investigacion Medica en Bioquímica (UIM), Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional Siglo XXI. IMSS, Av. Cuauhtemoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtemoc, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Medicina Genomica y Toxicologia Ambiental, IIB, UNAM, SZ, CDMX, Mexico

^e Unidad de Bioquímica Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Mexico City Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Glycine
Glycine receptors
Adipocytes
Inflammatory cytokines
IKK- / complex
TNF- /NF- B

ABSTRACT

Glycine modulates inflammatory processes mediated by macrophages and adipocytes through decreasing the secretion of TNF- , IL-6, and leptin, while increasing adiponectin. These effects have been associated with the inactivation of NF- B in response to TNF- , across an increase of its inhibitor I B- in adipocytes. However, glycine upstream mainly influences the I B kinase (IKK) complex, a multi-protein kinase complex considered a critical point in regulation of the NF- B pathway; whether that is responsible for the TNF- -induced phosphorylation of IκB has not been explored. Additionally, although previous studies have described glycine interactions with specific receptors (GlyR) in different immune system cell types, it is currently unknown whether adipocytes present GlyR. In this research, participation of the IKK- / complex in the inhibition of the TNF- /NF- B pathway by glycine was evaluated and associated with the synthesis and secretion of inflammatory cytokines in 3T3-L1 adipocytes. Furthermore, we also explored GlyR expression, its localization on the plasmatic membrane, intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$ and strychnine antagonist action over the GlyR in these cells. Glycine decreased the IKK- / complex and the phosphorylation of NF- B, diminishing the expression and secretion of IL-6 and TNF- , but increasing that of adiponectin. GlyR expression and its fluorescence in the plasma membrane were increased in the presence of glycine. In addition, glycine decreased $[Ca^{2+}]_i$; whereas strychnine + glycine treatment inhibited the activation of NF- B observed with glycine. In conclusion, the reduction of TNF- and IL-6 and suppression of the TNF- /NF- B pathway by glycine may be explained in part by inhibition of the IKK- / complex, with a possible participation of GlyR in 3T3-L1 adipocytes.

1. Introduction

Glycine, the simplest non-essential amino acid, is considered a cellular protector with a systemic anti-inflammatory effect in several pathological conditions [1,2]. In particular, it regulates inflammatory cytokine production, mainly that of tumor necrosis factor alpha (TNF-

) and interleukin 6 (IL-6) [1,3 5]. This glycine effect has been associated with a decrease in the activation of nuclear factor kappa B (NF- B) via TNF- [6 8]. NF- B modulates the immune response and participates in the regulation of different cellular processes, such as inflammation, cellular adhesion, proliferation, differentiation, apoptosis and oncogenesis [9]. In relation to inflammation, immune response, and antiviral defense, TNF- is the central mediator of NF- B [10,11],

Abbreviations: TNF- , Tumor necrosis factor alpha; NF- B, Nuclear factor kappa B; IL-6, Interleukin 6; GlyR, Glycine receptor; TLRs, Toll-like receptor; ROS, Reactive oxygen species.

Corresponding author.

Email address: aaaf@xanum.uam.mx (F.J. Alarcon-Aguilar)

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.048>

Received 5 December 2017; Received in revised form 7 March 2018; Accepted 9 March 2018

Available online xxx

0753-3322/ © 2018.

although other activators of this transcription factor have also been reported (TLRs, ROS, cytokines, growth factors, etc.) [12,13].

A crucial event downstream of the TNF-receptor is activation of the I B kinase (IKK- 85kDa, IKK- 87kDa, IKK- 48kDa) complex [14], in which the first two proteins catalyze the phosphorylation of I B, while IKK- regulates this activity [15]. IKK- and IKK- have similar primary structures (52% overall identity) and can form homo- or heterodimers, showing differences in relative activities [16]. The phosphorylation of these kinases is one of the critical points of regulation in the route of NF- B activation. IKK- is constitutively activated, whereas IKK- requires co-stimulation with TNF- to become fully active [12,16-18]. This promotes phosphorylation of the I B inhibitory protein [19-21], inducing its ubiquitination and degradation by the 26S proteasome [8] and the translocation of NF- B heterodimers to the nucleus, with the consequent transcriptional activation and expression of several genes [22].

It has been suggested that the anti-inflammatory effects of glycine appear via TNF- /NF- B interference [1]. In this sense, recent studies in our laboratory with 3T3-L1 adipocytes showed that glycine exerts a dual action over this pathway: on the one hand, glycine inhibits the activation of NF- B (p65 and p50 subunits) induced by TNF- , increasing the cytoplasmic levels of I B inhibitors (I B- , I B- and I B-); on the other hand, glycine alone stimulates NF- B activation, such that the degradation of the inhibitor B- (I B-) is more significant compared to that of B- (I B-), without modifying I B- degradation, leading to the nuclear translocation of NF- B-complexes [7].

Although the study of the influence of glycine over the TNF- /NF- B pathway in 3T3-L1 adipocytes has advanced, it remains unclear whether the IKK complex has regulation potential. In addition, it is still unclear how the glycine interacts with this cell line to exert its action. In this last sense, although glycine interaction through specific receptors (GlyR) associated with chlorine channels has been well-studied to explain its inhibitory action in neuronal cells [23,24] and other cell types involved in inflammation, particularly Kupffer cells, macrophages, leukocytes and neutrophil [1,2,25,26], generating hyperpolarization of the membrane and blockage of voltage-dependent calcium channels inhibiting the influx of calcium, it is currently unknown whether adipocytes express GlyR, that could be participating in the regulation of inflammatory processes.

Therefore, the participation of IKK- / in the inhibition of the TNF- /NF- B pathway by glycine and its association with the synthesis and secretion of inflammatory cytokines were studied in 3T3-L1 adipocytes in this research. In addition, we explore the expression level of GlyR and its localization in the plasma membrane, the intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$ in 3T3-L1 adipocytes treated with glycine, and the blockage of this GlyR by strychnine, an GlyR antagonist that has enabled the identification and purification of this receptor in other cell types [27].

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Murine fibroblasts 3T3-L1 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.) were differentiated into adipocytes using standard methods [5,7,28]. Fibroblasts were cultured in Petri dishes (5 $\times 10^6$ cells/plate) with growth medium containing DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 25mM glucose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 2mM glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 0.1mM nonessential amino acids (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% gentamicin (Sigma-

Aldrich, St Louis, MO, USA) and 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA). The culture was maintained at 37 C in an atmosphere of CO₂ (5%) and saturated with H₂O. Growth medium was changed every two days. Two days after reaching confluence (day 0), the differentiation of fibroblasts into adipocytes was induced with differentiation medium: methyl-isobutyl-xanthine (MIX, 0.5mM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), dexamethasone (DX, 0.25 M, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 0.8 M bovine insulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in DMEM supplemented with FBS (10%). Two days later, the medium was changed, adding bovine insulin (0.8 M) in DMEM with FBS (10%), without MIX, without DX, and was maintained for two more days. After the fourth day, the cells were fed every two days with maintenance medium: DMEM supplemented only with FBS (10%) without any other supplement. Cells were used for experiments on day 8 of the differentiation, when around 95% of cells expressed an adipocyte phenotype characterized by a circular-oval shape with fat deposits in small vacuoles [5].

2.2. Glycine and strychnine MTT assays

Murine fibroblasts 3T3-L1 were cultured and differentiated, as described above. Cell viability, following treatment with glycine or strychnine, was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazole 2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay, according to the method of Mosmann [29,30]. 3T3-L1 adipocytes were seeded into 96-well micro plates at a semi-confluent density (5000 cells/well). After 24h, the medium was replaced with medium containing glycine or strychnine at different concentrations ranging from 1 M to 1M, or up to 10mM with strychnine. Cells were incubated for 2h and then washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and a solution of 0.1 mg/mL MTT in PBS (pH 7.5) was added. The cells were incubated for 3h at 37 C, followed by washing with PBS. Then, 40mM HCl (200mL) prepared in isopropanol was added to each well for 15min to solubilize the formazan produced. The optical density (OD) was read at 570 nm [29]. The data were expressed as the percentage of viable cells following treatment with glycine or strychnine compared to the control cells.

2.3. Experimental conditions

Murine fibroblasts 3T3-L1 were cultured and differentiated as described above. One culture was used as a control and maintained by changing the medium every two days. The cultures were treated as follows: Group 1 (TNF-), incubated cells for 30min with 5ng/ml of TNF- (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); Group 2 (BAY + TNF-), incubated cells for 30min with 10 M BAY (E)-3-(4-t-butylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.), an inhibitor of the phosphorylation of I B- , followed by a pulse of TNF- (5ng/ml) for 30min; and 3 7 (glycine + TNF-), incubated cells for 15, 30, 60, 120 and 240min, respectively, with 10mM of glycine (Millipore Corp., Bedford, MA) followed by a pulse of 5ng/ml TNF- for 30min. In strychnine assays, the cells were treated as follows: Group 8 (strychnine), incubated cells for 30min with 1 M of strychnine (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.); Group 9 (strychnine + glycine) incubated cells for 30min with 1 M of strychnine followed by a pulse of 10mM of glycine; Group 10 (strychnine + TNF-), incubated cells for 30min with 1 M of strychnine followed by a pulse of 5ng/ml of TNF- for 30min; and Group 11 (BAY + glycine), incubated cells for 30min with 10 M BAY for 30min followed by a pulse of 10mM glycine. In other experiments, to determine whether 3T3-L1 adipocytes were expressing GlyR, first the expression level of this receptor in full mouse brain homogenate was confirmed using normal male adult CD1 mice

(20 25 g), taking into account the Official Mexican Rule (NOM-062-ZOO-1999, revised 2001); then, GlyR expression levels were quantified in 3T3-L1 adipocytes, which were incubated in the absence of glycine and with 10mM glycine for 30min. The protocol in experimental animals was approved by the institutional Ethics Committee at Universidad Autonoma Metropolitana (CDCBS.127.08).

2.4. Extraction of RNA and quantification by RT-PCR

Total RNA was isolated at the end of each treatment using TriPure isolation reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA) [31] and following the reported methodology [7]. For purity control and quantification of the samples, absorbance was measured at 260 and 280nm. RNA integrity was confirmed by running 3 g/ l on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The gel image was visualized and digitalized by an Image Analyzer (Bio-Rad Laboratories, Valencia, CA, USA). Reverse transcription (RT) was catalyzed by the reverse transcriptase from the ImProm II kit (Promega, Madison, WI, USA) using 2 g of total RNA in a volume of 20 l. The reaction mixture was incubated in a thermo-cycler (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700, Foster City, USA), in agreement with the following cycles program: 25 C for 5 min, followed by extension at 42 C for 55 min. The reaction was stopped by heating at 70 C for 15 min and cooled to 4 C for 5 min.

The cDNA was amplified with the enzyme DNA polymerase kit DNA master plus SYBR Green 1 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) using primers for TNF- , IL-6, adiponectin, GlyR , and ribosomal protein 36B4 as a normalization gene (Table 1). The process was carried out using SYBR Green technology with a Light Cycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), which continuously measures the products of PCR amplification in each cycle. The reaction mixture had a final volume of 10 L with 0.5mM of the previously mentioned primers and the reaction mixture containing 1X Fast Start enzyme, PCR buffer, SYBR Green (2 L) and 3.5mM of MgCl₂. The mixture was subjected to the following program of amplification: a first segment of 10min at 95 C for pre-incubation of the enzyme, a second segment of amplification consisting of 35 or 40 cycles with each cycle consisting of a thermal ramp to 20 C/s, alignment segments to 61 C for 7s at a thermal ramp to 20 C/s, and an amplification segment at 72 C for 10s at a thermal ramp of 20 C/s.

A program in widespread was used in the analysis of melting temperature (T_m) to verify specific amplification and to control the slow distortion of the final product of amplification, which reflects a specific T_m. The program consisted of denaturation at 95 C with a thermal ramp of 20 C/s, realignment at 65 C for 15s, a thermal ramp of 20 C/s, and finally a slow denaturation to 95 C at a thermal ramp of 0.1 C/s with continuous measurement of the fluorescent signal [32,33]. The integrity of the PCR products was verified subsequently by the shift of the amplification products by electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. To guarantee the quantity of the measurements, each assay included a negative control for each gene. The mRNA was normalized by the abundance of mRNA encoding 36B4. The Ct values were calculated in every sample for each gene of interest as follows: $Ct_{interest} - Ct_{reference}$ with 36B4 as the reference gene

Table 1
Specific primers used in real-time PCR for TNF- , IL-6, adiponectin, GlyR- , and 36B4.

Gene	Secuence	Gene Bank	Product length
TNF-	F5 -CTCCCTGTCATCAGTCTCA-3 R5 -ACTTGGTGGTTTGTACGAC-3	NM_013693.3	102
IL-6	F5 -TTCCATCCAGTTGCCTTCT-3 R5 -CAGAATTGCCATTGCACAAC-3	NM_001314054.1	199
Adiponectin	F5 -AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3 R5 -TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3	NM_009605.4	219
GlyR-	R5 -TTTGGCCTCAGAGTGCACCA-3 R5 -CAGGCAATGAGCCACACATCC-3	NM_001345955.1	84
36B4	F5 -AAGCGCTCTGGCATTGTCT-3 R5 -CGCAGGGGCGAGTGGT-3	NM_007475.5	136

(mRNA of reference remained stable throughout the experiments). Relative changes in the expression level of one specific gene (Ct) were calculated as $Ct_{sample} - Ct_{reference}$ and then presented as 2^{-Ct} .

2.5. Extraction of cytosolic and nuclear protein from 3T3-L1 adipocytes

Protein extracts were prepared as described originally [34] and minor modifications were introduced to determine the glycine effect on the amount of NF- B and the phosphorylation state of the IKK protein kinases, following the methodology reported [7,35,36]. At the end of experimental treatments, cells were washed with PBS at 4 C and scraped in 500 l of PBS with a rubber spatula before being transferred into Eppendorf tubes and centrifuged for 5min at 800 g. The supernatant was removed and the cell pellets were lysed by thermal shock with liquid nitrogen, being thawed to room temperature and finally suspended in 100 l of hypotonic solution (10mM HEPES at pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol). The nuclei were recovered by centrifugation at 800 g for 10min at 4 C. The supernatant was carefully removed for analysis of the presence of IKK complex in the cytoplasm. Nuclei were re-suspended in 20 l of a hypertonic saline solution (20mM HEPES at pH 7.9, 400mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 25% v/v glycerol, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 0.5mM fluoride phenylmethylsulfonyl). After gentle shaking for 30min at 4 C, nuclei were centrifuged for 20min at 14,000 g at 4 C. Supernatants with nuclear protein extracts were collected and diluted 1:1 with a hypotonic saline solution (20mM HEPES at pH 7.9, 50mM KCl, 20% v/v glycerol, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The protein content of the nuclear extracts was quantified using a commercial Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Valencia, CA, USA). These extracts were frozen to -70 C until the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed. Experiments were performed in triplicate for each treatment.

2.6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

A double-stranded oligonucleotide with 21 base pairs containing 12 bases of the consensus sequence for the binding site of NF- B (5 AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-3', Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) was labeled with ³²P-ATP (NEN, 6000 Ci/mmol). The labeling reaction was carried out in the presence of T4 kinase (Boehringer Mannheim), with incubation at 37 C for 30min, and was stopped by heating to 65 C for 15min followed by the addition of 30 l of Tris-Borate-EDTA buffer (1X TBE, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The sample was kept frozen until use.

The EMSA was performed as originally described [37] with minor modifications [7,36]. The samples were run in a 7.5% non-denaturing acrylamide gel, which was pre-run at 80V for 60min before sample addition. Binding of the pre-labeled probe to the NF- B factor present in nuclear extracts was carried out with 10 g of nuclear extracts, 1 g of poly dI/dC, 1 g of pd (N)₆ and 10 g of bovine serum albumin. The incubation was performed in HDKE buffer (20mM HEPES pH 7.9, 50mM KCl, 1mM EDTA and 5mM dithiothreitol). The labeled probe (10

50 10³cpm) was added at the end to start the binding reaction. After 10 min at room temperature, the reaction was stopped by adding a solution of 15% Ficoll supplemented with dyes for electrophoresis. The reaction mixtures were run on a gel with 1X TBE at 200 V for 120 min, after which the gel was dried (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad Laboratories, Valencia, CA, USA) at 90 °C under vacuum (Hydrotech™ Vacuum Pump, Bio-Rad Laboratories, Valencia, CA, USA) for 90 min. Once dried, the gel was placed in an auto-radiographic cassette for the Phosphorimager (Molecular Dynamics/GE). The image was developed in a Typhoon 9400 (Molecular Dynamics/GE) on the following day. The images were analyzed by densitometry.

2.7. Western blot

For each assay, 50 µg of the cytoplasmic protein extracts in sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% v/v SDS, 10% v/v glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% v/v 2-mercaptoethanol) was boiled for 5 min. The samples were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and then transferred to a Hybond-ECL membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK). The membranes were incubated with any of the primary antibodies (IKK-α, pIKK-α (Thr23), Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), IKK-β / pIKK-β (Ser176/177) (GeneTex, USA), diluted 1:250 in TBS. After washing with TBS-Tween 1%, the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated to peroxidase (Pierce, Rockford). Chemiluminescence was generated using the Super-Signal System (Pierce, Rockford, IL). The generated signals were detected using the Kodak Imaging System GL2200. Spots were quantified by densitometry.

2.8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

For this assay, the methodologies described by the provider for adiponectin, TNF-α, IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and phosphorylated and non-phosphorylated NF-κB (Abcam, Cambridge, MA, USA) were used.

2.9. Measurement of [Ca²⁺]_i in glycine treated 3T3-L1 adipocytes

T3-L1 cells were cultured using the Chamber Slide System (Lab-Tek II). After 8 days of differentiation, adipocytes were loaded for 30 min with 1 µM of the [Ca²⁺]_i Fluo-4AM indicator (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) in HBSS supplemented with gentamycin at 10 µg/mL and BSA at 0.1%, washed with the same medium (2 volumes) and allowed to equilibrate. The fluorescence was measured with a 488-nm excitation and 535-nm emission using a confocal microscope (ZeissZen-Sp1) with laser scanning. The images were acquired every second with an exposure time of 20 ms for 10 min at 23 °C. All treatments, EDTA 0.25 mM, TNF-α (5 ng/µl), strychnine (1 mM), glycine (10 mM), (Gly + TNF-α, strychnine + glycine, strychnine + TNF-α, and BAY (10 µM) + NF-κB were applied before taking 5 images in each sequence. The sequence files were analyzed using the image analyzer software ImageJ from the NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The regions of interest were selected in the cytoplasm of the cells, and the average pixel intensity was measured. The relative fluorescence changes (F/F₀) were plotted as a function of time and integrated to determine the area under the curve [38].

2.10. Confocal microscopy to evident the GlyR in 3T3-L1 adipocytes

T3-L1 cells were cultured using the Chamber Slide System (Lab-Tek II). After 8 days of differentiation, adipocytes were treated with glycine (10 mM) for 30 and 60 min. The treatment substituted the primary anti-

bodies for GlyR-α and GlyR-β (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) diluted 1:250 in PBS for 16 h at 4 °C, and secondary antibodies (FIT-C (fluorescein) and rhodamine, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) diluted 1:1000 in PBS during 1 h at room temperature, with repeated washed (PBS-Tween 0.5%) applied after each incubation. Subsequently, an assembly of PBS/glycerol/DAPI (Inorganic Polyphosphate Stores by 4,6-Diamidino-2-Phenyl-indole) (1:1000) was used to stain the nucleus. Coverslips with cells were mounted in a custom-made steel holder, and the sample was placed on a microscope stage and imaged using the confocal microscope Zen-Sp1 ZEISS laser-scanning GlyR-α (Rhodamine) and GlyR-β (FIT-C) excited by 490 and 633–647 nm lasers.

2.11. Statistical analysis

Data are shown as Mean ± S.E.M. An ANOVA and a Tukey-Kramer post hoc was used test to determine statistically significant differences between treatments. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 software. A value of p < 0.05 was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. Glycine treatment followed by TNF-α alters IKK-α content

The cellular content of IKK-α was analyzed at 15, 30, 60, 120, and 240 min of incubation with 10 mM of glycine followed by TNF-α stimulation for 30 min (Fig. 1A). Basal levels of IKK-α in the control were low; this kinase increased by 3-times after TNF-α treatment. In general, the pretreatment with glycine followed by TNF-α significantly increased IKK-α content compared to the control and to TNF-α treatment. However, at 240 min, the pretreatment with glycine significantly decreased the cytoplasmic content of IKK-α 2-fold with respect to TNF-α, but did not reach control basal levels. BAY + TNF-α incubation reduced IKK-α content almost in 2-fold with respect to the treatment with TNF-α alone (Fig. 1A).

Glycine also significantly decreased the phosphorylation of IKK-α (Thr23), similarly to BAY compared with TNF-α alone (Fig. 1B). Additionally, glycine significantly decreased the content of the IKK-α / complex at 15 min with respect to TNF-α alone (Fig. 1C), whereas it increased by 2.5-fold at 240 min. In relation to the phosphorylation of the IKK-α / complex in (Ser176/177), glycine increased significantly at 15 and 30 min by 4-times compared with control, whereas it decreased at 60, 120 and 240 min (1 to 2-fold) with respect at TNF-α alone (Fig. 1D).

3.2. Inhibitory action of NF-κB by glycine

The results for NF-κB treatment with glycine (10 mM) at 15, 30, 60, 120, and 240 min followed by TNF-α stimulation for 30 min are shown in Fig. 2. Glycine reduced significantly at 120 and 240 min in NF-κB p65 total protein with respect to the control in cell lysates (Fig. 2A). In contrast, glycine significantly decreased the phosphorylation of p65 (pS536) at all times with respect to the control and to TNF-α alone (Fig. 2B). Interestingly, at 120 min, the pretreatment with glycine stopped the phosphorylation of this transcription factor, an effect which was similar to the negative control BAY (Fig. 2B). For its part, nuclear NF-κB levels always increased significantly compared with the control due to glycine; these levels were decreased at 30 and 60 min in comparison with TNF-α alone (Fig. 2C), whereas they increased by 65% with respect to TNF-α alone at 120 min.

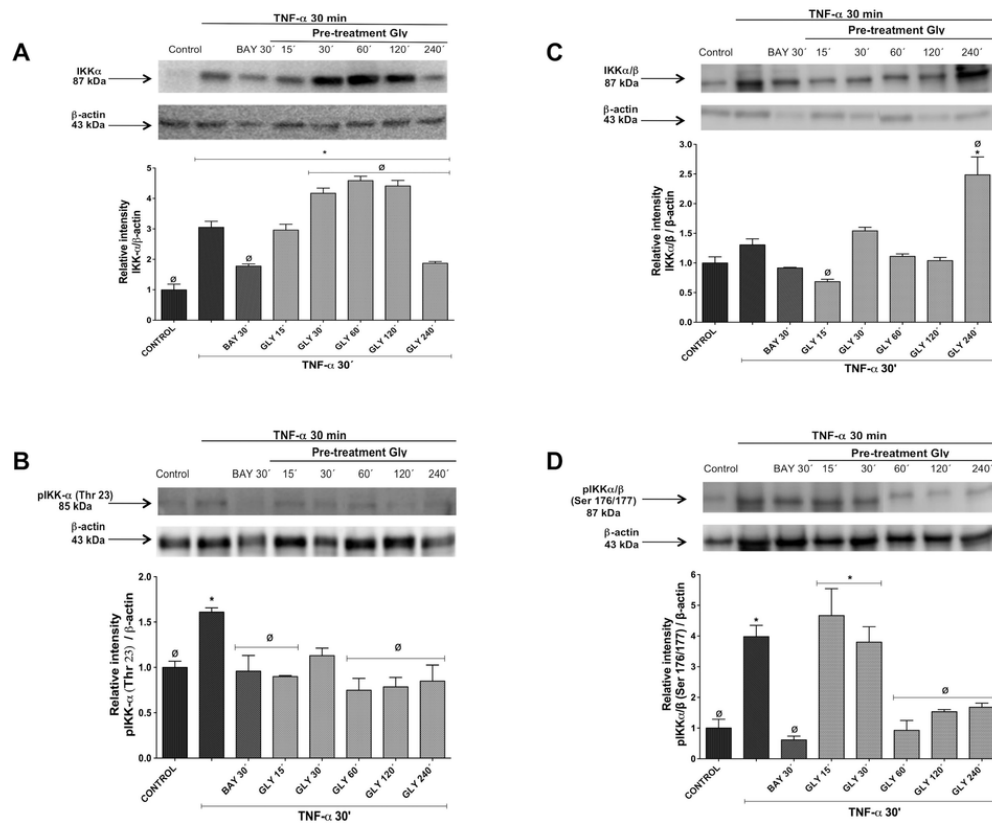


Fig. 1. Effect of glycine on IKK- α / β . Densitometry of non-phosphorylated IKK- α (a), IKK- α phosphorylated in Thr23 (b), IKK- β / non-phosphorylated (c), and IKK- β / phosphorylated in Ser176/177 (d). Mean \pm S.E.M. (n = 3). *Significantly different from control (p < 0.05). #Significantly different from TNF- α (p < 0.05).

3.3. Effect of glycine on mRNA expression and the secretion of cytokines

The results of the expression and secretion of cytokines in adipocytes pre-treated with glycine (10mM) at 15, 30, 60, 120, and 240min followed by stimulation with TNF- α for 30min are shown in Fig. 3. Glycine decreased the expression of IL-6 with respect to the control and against TNF- α alone (Fig. 3A). In relation to the expression of TNF- α , the pre-treatments with glycine at 15 and 30min increased significantly compared to the control, in a similar way to stimulation with TNF- α alone. In contrast, at 60, 120 and 240min, the expression the TNF- α decreased significantly, similarly to negative control BAY (Fig. 3B). The mRNA expression of adiponectin was gradually increased to the 60, 120 and 240min by glycine against control and TNF- α alone (Fig. 3C). In relation to the secretion of cytokines, after short times, glycine decreased the secretion of IL-6 in comparison to TNF- α alone; however, at 120 and 240min, IL-6 was increased (Fig. 3D). Glycine, except at 240min, significantly decreased the secretion of TNF- α compared with the cells stimulated with TNF- α alone (Fig. 3E). In addition, glycine increased the secretion of adiponectin during the assay (Fig. 3F).

3.4. Effect of glycine on mRNA expression of the GlyR

The results obtained for the expression of GlyR- in adipocytes pre-treated with 10mM glycine for 30 and 60min are shown in Fig. 4. This receptor was clearly expressed in the full homogenate of mouse brain.

Glycine significantly increased the expression of GlyR- in 3T3-L1 adipocytes by 6-times with respect to the control that did not receive glycine.

3.5. Effect of glycine and strychnine on the cell viability in 3T3-L1 adipocytes

The effects of different concentrations of glycine and strychnine were evaluated on cell viability by the MTT assay (Fig. 5). The results showed that glycine (10, 500mM and 1M) and strychnine (10mM) reduced the cell viability in comparison with the control (Fig. 5A and 5B, respectively). The concentrations of glycine and strychnine of 10mM and 1mM, respectively, did not show any significant difference against the control. Therefore, these concentrations were chosen to continue the experiments to measure $[Ca^{2+}]_i$.

3.6. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ after of the treatment with glycine to explore the participation of a GlyR in 3T3-L1

The normalized fluorescence of $[Ca^{2+}]_i$ in 3T3-L1 adipocytes treated with EDTA, TNF- α , strychnine, glycine, and combinations is shown in Fig. 6. Glycine, Glycine+TNF- α , BAY+TNF- α , and EDTA decreased $[Ca^{2+}]_i$, while TNF- α and strychnine alone stayed unchanged against control in the $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 6A). In B, the vertical scale bar indicates the increase in fluorescence due to the treatments (Fig. 6B). The combinations of strychnine + glycine and strychnine + TNF- α did not show any changes against the control.

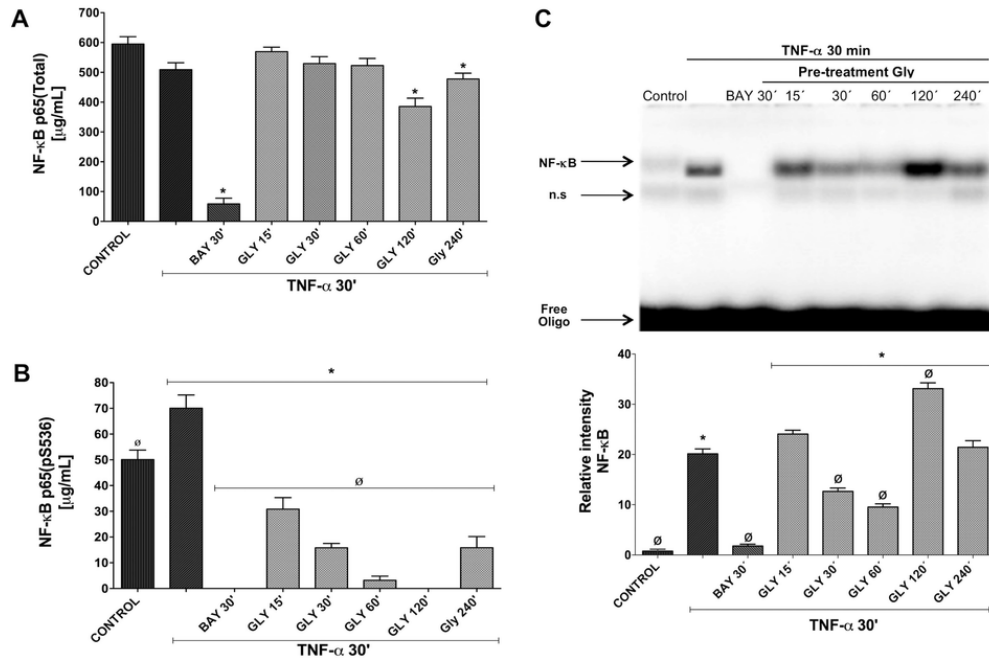


Fig. 2. Effect of glycine on NF- κ B/TNF- α activation. NF- κ B detection in nuclear extracts of cells by EMSA (a). NF- κ B total of cellular lysates (b), and NF- κ B phosphorylated on serine 536 (c). Mean \pm S.E.M. (n = 3). *Significantly different from control (p < 0.05). *Significantly different from TNF- α (p < 0.05).

3.7. Action of glycine on the activation of NF- κ B in presence of strychnine

The results of the NF- κ B activation by glycine (10mM) in the presence of strychnine (1 μ M) at 30min followed by TNF- α stimulation for 30min are shown in Fig. 7. The NF- κ B p65 total protein did not show any significant differences compared with control in the cell lysates (Fig. 7A). In contrast, glycine significantly increased the phosphorylation of p65 (pS536) compared with the control, similarly to TNF- α alone (Fig. 7B). The treatments of Glycine + TNF- α , strychnine alone, strychnine + glycine, and strychnine + TNF- α significantly decreased the phosphorylation with respect to TNF- α alone. However, the reduction of phosphorylation by strychnine + TNF- α was significantly minor compared to the other treatments with strychnine and glycine + TNF- α , although an activation existed that was significant against the control due to strychnine + TNF- α . The negative control BAY inhibited the phosphorylation of this transcription factor.

3.8. Confocal microscopy of the GlyR- and GlyR- in 3T3-L1 adipocytes

The results of the analysis by confocal microscopy with both receptors, GlyR- and GlyR-, in adipocytes 3T3-L1 treated with glycine at 30 and 60min are shown in Figs. 8 and 9. Fig. 8 shows that GlyR- is present in this cell type; the blue shades indicate the fluorescence of DAPI, which was used to stain the nucleus, while the green indicates the fluorescence from GlyR-, and the two merged images. Glycine at 30 and 60min showed an increased in the fluorescence at both times with respect to the control. In Fig. 9, the presence of the GlyR- is shown in red; the blue nuclei and the merged images are also shown. Glycine increased the fluorescence of GlyR- compared with the control, and at 30min there was a significant elevation in the fluorescence of this receptor.

4. Discussion

Previous studies support the idea that glycine may be regulating the chronic inflammatory process present in obesity through a mechanism involving the TNF- α /NF- κ B signaling pathway [7]. Most of the inflammatory processes are regulated by NF- κ B, and its activation by TNF- α plays a fundamental role in the regulation of this via [8,39]. The IKK protein kinases form a complex constituted by IKK- α and IKK- β , proteins with a high degree of sequence similarity that catalyze the phosphorylation of I κ B proteins and represent a convergence point for most signal transduction pathways leading to NF- κ B activation [40,41]. IKK- α and IKK- β mediate NF- κ B activation in response to pro-inflammatory cytokines, catalyzing the phosphorylation of I κ B. Despite extensive sequence similarity, IKK- α and IKK- β both have largely distinct functions, due to their different substrate specificities and modes of regulation [12]. The IKK- α functions in the activation of a specific form of NF- κ B in response to a subset of TNF family members may also serve to attenuate IKK- β driving NF- κ B activation [40].

In the present investigation, the results showed that pretreatment with glycine in the presence of TNF- α increased IKK- α in the short- and long-term (30 to 120min). However, this effect decreased following longer times (240min), which resulted in the inhibition of IKK- α at Thr23. IKK- α is essential for rapid NF- κ B activation by pro-inflammatory signaling cascades, such as those triggered by TNF- α or lipopolysaccharide (LPS) [42-44]. TNF- α stimulates the phosphorylation of IKK- α on two serine residues, Ser179/177 and Ser180/181 [45]. Phosphorylation of both sites is required for activation of the IKK complex [46].

In this research, the non-phosphorylated IKK- α /IKK- β complex was evaluated simultaneously, decreasing at 15min and subsequently increasing at 240min. However, when the IKK- α /IKK- β (Ser176/177) complex was phosphorylated, its levels raised at 15 and 30min in 4-times, and de-

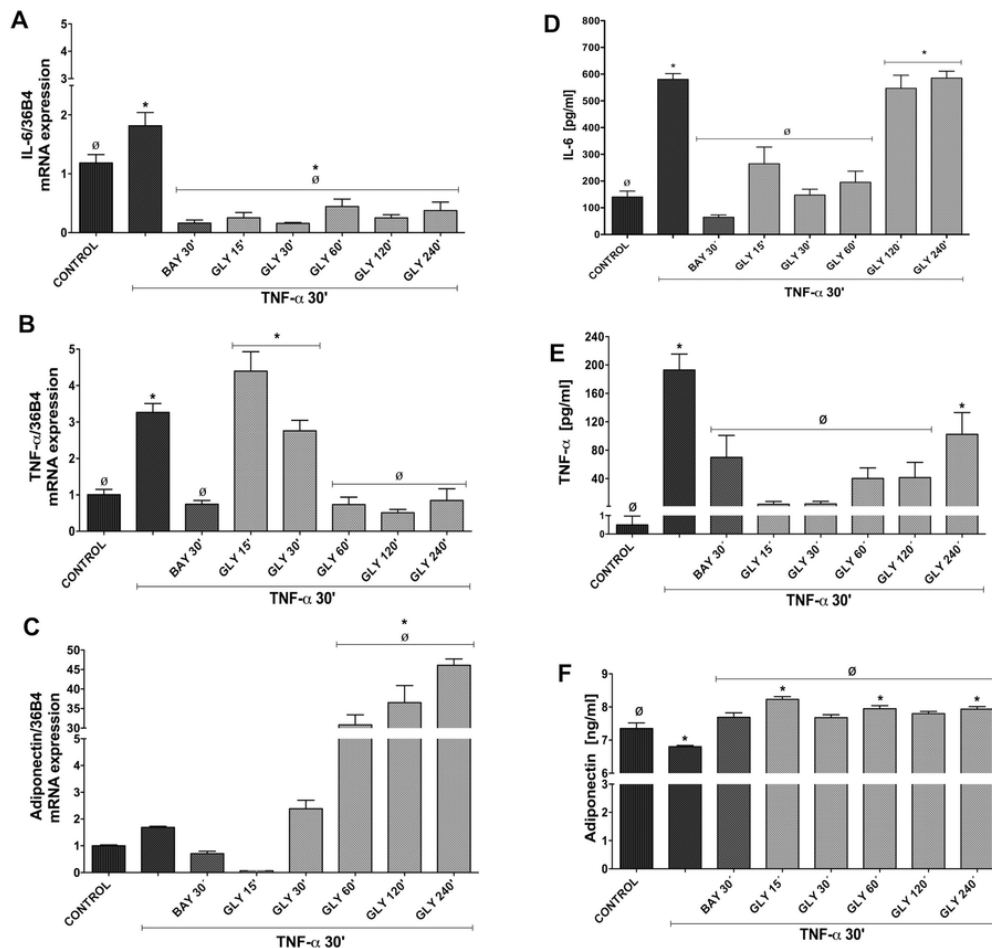


Fig. 3. Effect of glycine on mRNA expression and secretion of inflammatory cytokines. Expression of IL-6 (a), TNF- α (b), and adiponectin (c). Secretion of IL-6 (d), TNF- α (e), and adiponectin (f). Mean \pm S.E.M. (n = 6). *Significantly different from control (p < 0.05). #Significantly different from TNF- α (p < 0.05).

creased at 60, 120 and 240min (2-fold). Therefore, after short times, glycine might be phosphorylating to I κ B α , translocating to the nucleus to RelA-p50 (NF- κ B) heterodimers and activating the expression of different anti-inflammatories genes; for its part, I κ B α suffers ubiquitination and degradation by the 26S proteasome. In addition, glycine inhibited the production of pro-inflammatory cytokines at larger times.

RelA (p65) and p50 (p105 precursor) have a highly conserved DNA-binding and dimerization domain termed Rel homology region (RHR) that enables them to form homo- or heterodimers [22,43,47]. p65 contains a C-terminal transactivation domain (TAD) that allows the activation of target gene expression; p50 also has an ankyrin repeat-containing domain (ARD) at its C terminus instead of the TAD domain and therefore cannot activate target gene expression as a homodimer [43,47]. The freed NF- κ B proteins are then transported into the nucleus where they bind to their target sequences and activate gene transcription [48].

To confirm this hypothesis, total NF- κ B, nuclear and phosphorylated, were measured by the activation of TNF- α in presence and absence of glycine. The results showed that glycine reduced NF- κ B p65 total protein uniquely at min 240; nuclear NF- κ B presented an oscillatory effect decreasing at 30 and 60min, and augmenting at 120min. Interestingly, glycine always decreased the phosphorylation of p65 (pS536), completely stopping the activation of this factor at 120min.

Therefore, these results indicated that glycine does not inhibit the nuclear translocation of NF- κ B, because it is increased at 120min in the nucleus. However, this is not phosphorylated.

Several authors have reported that IKK γ can impact on insulin signaling through 2 pathways: phosphorylating serine residues on IRS-1 or phosphorylating I κ B, activating NF- κ B and stimulating the production of multiple inflammatory mediators, including TNF- α and IL-6 [49–52]. In this way, the overproduction of TNF- α in adipose tissue is an important characteristic of obesity and its action can perturb the normal regulation of energy metabolism at numerous sites, including transcriptional regulation of the receptors of glucose, fatty acid metabolism, and hormone receptor signaling, propitiating insulin resistance [52–54]. Our results showed that glycine increased the expression of TNF- α at the beginning, which was decreasing over time. In contrast, the secretion of TNF- α by glycine was increased gradually, reaching a significant level at 240min, likely as a consequence of the initial expression. In relation to IL-6, it has been described that adipocytes can secrete between 10 and 35%, acting as a possible metabolic mediator, since its concentration is increased in obesity, insulin resistance, and glucose intolerance [32]. Our results showed the decreased expression of IL-6 at all times of the assay due to glycine treatment. However, its secretion was increased at the end of the test, probably as a compensatory mechanism of an alternative pathway, because IL-6 can be regu-

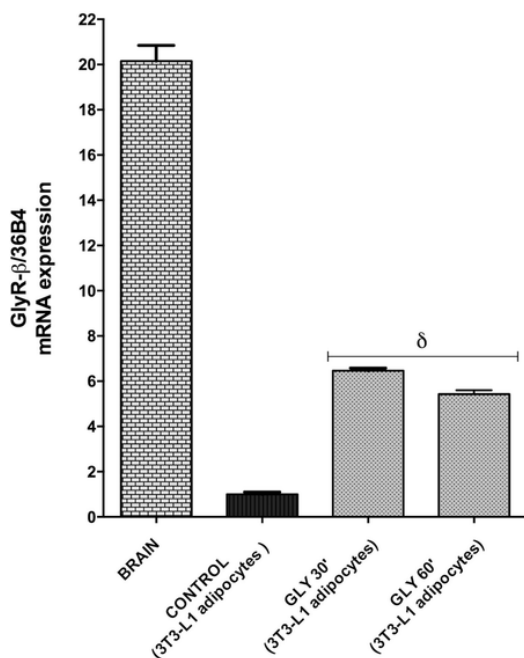


Fig. 4. GlyR- mRNA expression in the brain of mouse (BRAIN), in 3T3-L1 adipocytes (CONTROL) and 3T3-L1 adipocytes treated with 10mM glycine for 30 min (GLY 30') and 60 min (GLY 60'). Mean ± S.E.M. (n = 6). Significantly different from control (p < 0.05).

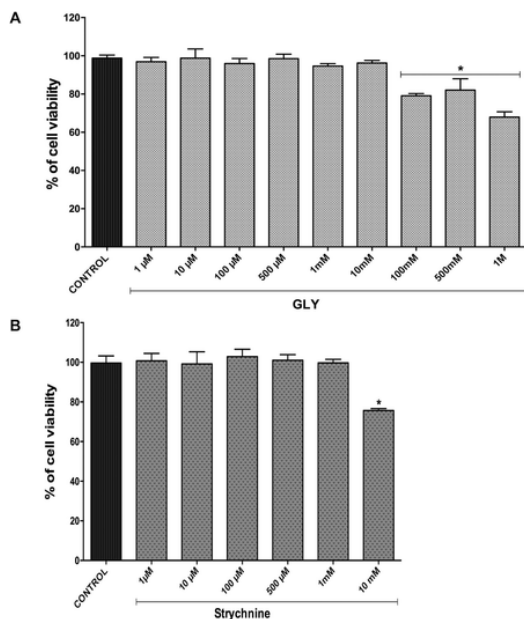


Fig. 5. Effect of different concentrations of glycine (a) and strychnine (b) on cell viability at 2h of incubation in adipocytes 3T3-L1 (MTT assay). Mean ± S.E.M. (n = 6). *Significantly different from control (p < 0.05).

lated by complex signaling networks independent of the TNF- /NF- B pathway.

Much has been discussed about the multiple effects of glycine, acting as an antioxidant, cytoprotective and regulator of the inflammatory

process [1,2,6]. However, little is known about the mechanism of action of glycine in these processes. Possible pathways in which glycine may be involved have been hypothesized [1,4,7,55]. One of these is the TNF- stimulated NF- B activation, in which it has been demonstrated that glycine inhibits NF- B [7]. In the present study in adipocytes, we demonstrate that glycine decreases the phosphorylation of the IKK- / complex as well as of its inhibitor I B-, generating lower expression and synthesis of pro-inflammatory cytokines, thus regulating the inflammatory process.

However, the possible involvements of glycine on the TNF- receptor or the participation of GlyR in the adipocyte that might explain the action of glycine in these cells, such as has been already described in Kupffer cells, alveolar macrophages and neutrophils [1,56], has not yet been explored. These receptors are associated with a channel composed of three distinct subunits: a 48-kDa subunit, a 58-kDa subunit and a 93-kDa cytoplasmic anchoring protein, gephyrin [57,58]. Our results suggest a possible participation of receptors of glycine, whose interaction with glycine could result in a decrease in the phosphorylation of NF- B stimulated by TNF-. Likewise, the increase in the expression of GlyR- by 6-times, and in the fluorescence on the plasmatic membrane as evidence of the presence of both receptors in 3T3-L1 adipocytes, in conjunction with the decrease in $[Ca^{2+}]_i$ by glycine, suggests the participation of both receptors in the activity of glycine. In the same way, the increased activation of NF- B by strychnine + TNF-, indicated that the activation is not totally blocked in the presence of this antagonist, in contrast to the observation with Glycine + TNF-, which showed decreased phosphorylation against control. In the present research we have used strychnine to study its antagonist action over the GlyR in 3T3-L1 adipocytes. Strychnine is a GlyR antagonist and, given that reduced the phosphorylation due to glycine + TNF- whereas increased the influx of $[Ca^{2+}]_i$, it was deduced that this antagonist may be blocking the GlyR [59,60].

Therefore, GlyR could be participating, at least in part, in the inhibition of the TNF- /NF- B signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. In particular, Matilla et al. [1] described a possible mechanism involving the presence of a specific receptor for glycine in immune system cells, such as Kupffer cells, macrophages, etc., which, when bound to it, increases the flow of chlorine ions, membrane hyperpolarization and blockage of the influx of calcium [56,61]. In agreement with [1], it is probable that the production of intracellular signals and the production of pro-inflammatory cytokines that are dependent on the increase of intracellular calcium can be blocked in this way in 3T3-L1 adipocytes [1]. The present research represents the first approach that suggest the presence of glycine receptors in 3T3-L1 adipocytes and its possible association with the canonic NF-kB pathway. Nevertheless, the study of the association between these two hypotheses should consider to knocking down the components of each one of the types of glycine receptors, as well as of the TNF receptor, and of the same pathway including I K in 3T3-L1 cells [62,63]. In addition, the participation of the glycine receptors due the influx of chlorine to determine voltage changes in the membrane s potential in adipocytes can be approached through Patch Clam [64].

5. Conclusion

In conclusion, a reduction in the expression and secretion of TNF- and IL-6, and the suppression of NF- B activation via TNF- by the action of glycine may be explained, at least in part, by inhibition of the IKK- / complex, whereas that the blockage of the glycine response by strychnine suggests the possible participation of a receptor of glycine in the 3T3-L1 adipocytes.

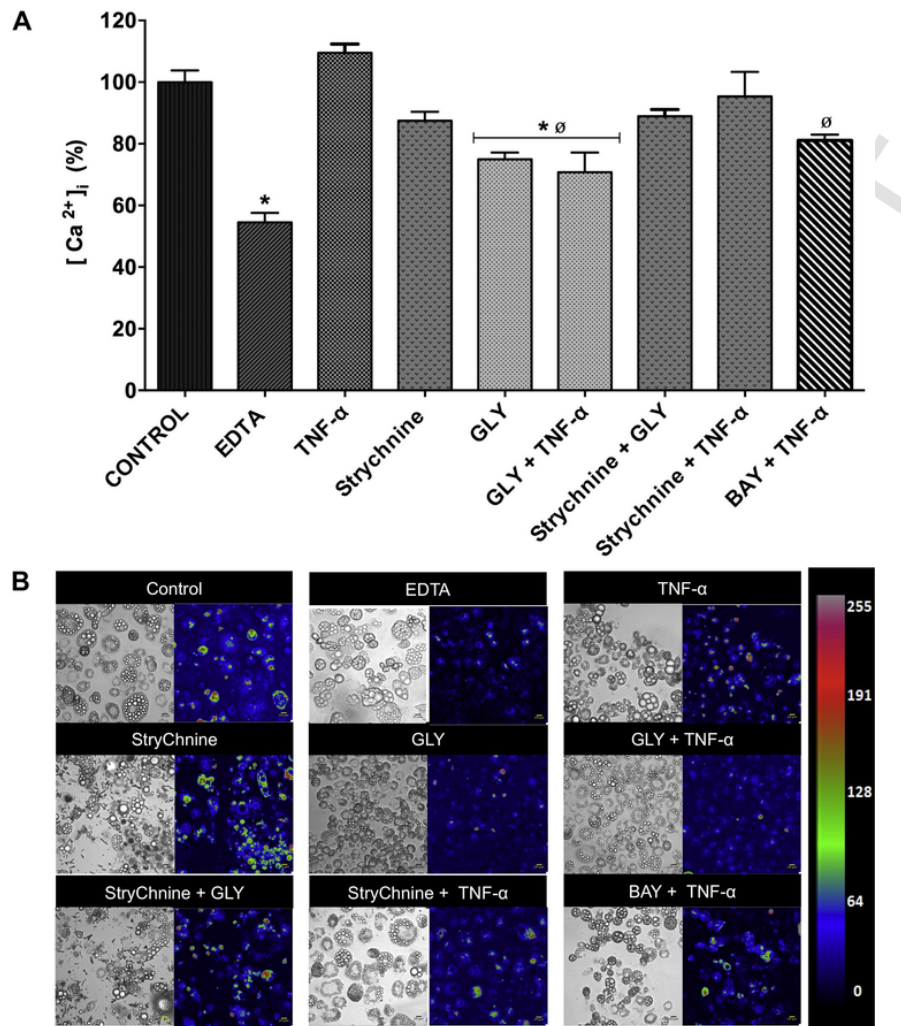


Fig. 6. Effect of glycine on $[Ca^{2+}]_i$ in 3T3-L1 adipocytes at 10min of incubation. Normalized fluorescence of the $[Ca^{2+}]_i$ in treated cells (a). In b, the vertical scale bars indicate the increments in fluorescence due to the treatments; the fluorescence of the 3T3-L1 cells in the bright and dark fields showed changes in red, green and blue tones. Mean \pm S.E.M. (n = 6). *Significantly different from control ($p < 0.05$), \emptyset Significantly different from TNF- α ($p < 0.05$).

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial or non-financial interests.

Acknowledgements

This work was partially supported by CONACyT Research Grant of Erika Contreras Nu ez (Agreement No. 369534, Research Grant No.

234171) as part of her Ph.D. degree in Experimental Biology in the DCBS, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, Project PRODEP-SEP (UAM-PTC-600), Laboratory Divisional of Molecular Biology and the Confocal Microscopy Core Unit of the DCBS at Metropolitan Autonomous University, and Fondo de Investigacion en Salud. SALUD-2013-C01-201471 (FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE).

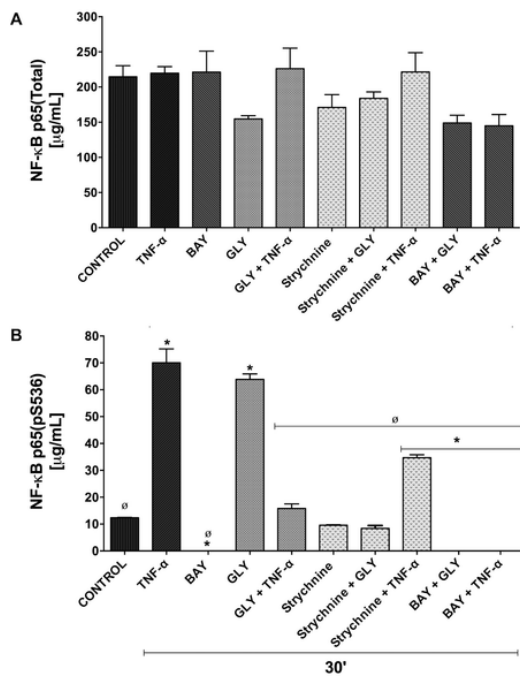


Fig. 7. Action of glycine on the activation of NF-κB/TNF-α in the presence of strychnine. NF-κB total of cellular lysates (a) and NF-κB phosphorylated on serine 536 (b). Mean ± S.E.M. (n = 3). *Significantly different from control (p < 0.05). #Significantly different from TNF-α (p < 0.05).

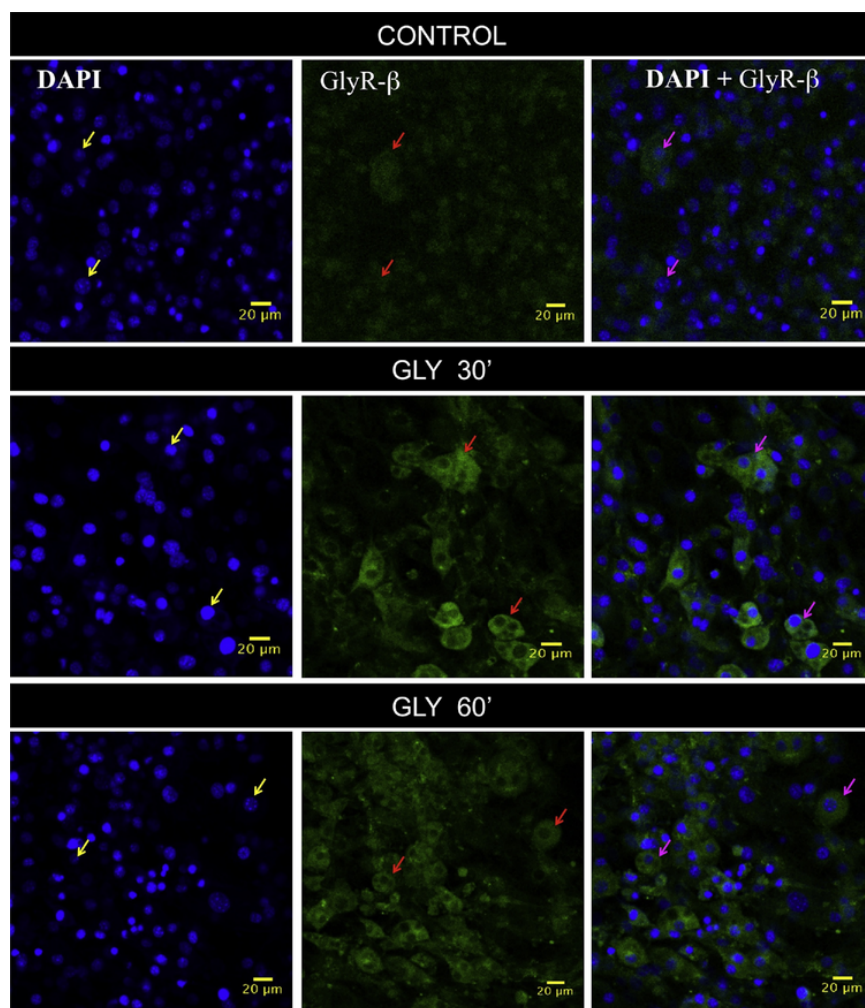


Fig. 8. Confocal fluorescence photomicrographs of GlyR- β in 3T3-L1 adipocytes treated with glycine 10mM for 30 and 60 min (magnification X20).

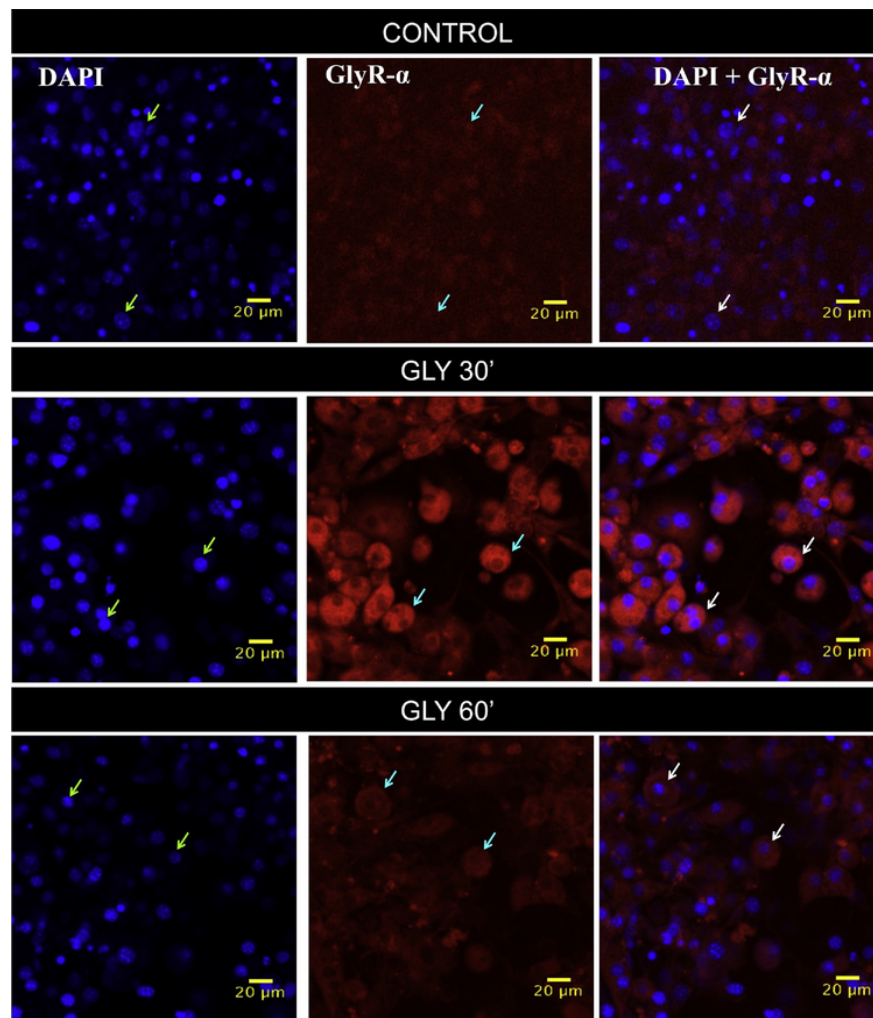


Fig. 9. Confocal fluorescence photomicrographs of GlyR- α in 3T3-L1 adipocytes treated with glycine 10mM for 30 and 60 min (magnification X20).

References

- [1] B. Matilla, J.L. Mauriz, J.M. Culebras, J. Gonzalez-Gallego, P. Gonzalez, Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient, *Nutr. Hosp.* 17 (1) (2002) 2–9.
- [2] Z. Zhong, M.D. Wheeler, X. Li, M. Froh, P. Schemmer, M. Yin, H. Bunzendaal, B. Bradford, J.J. Lemasters, L-Glycine: a novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6 (2) (2003) 229–240.
- [3] F.J. Alarcon-Aguilar, J. Almanza-Perez, G. Blancas, S. Angeles, R. Garcia-Macedo, R. Roman, M. Cruz, Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice, *Eur. J. Pharmacol.* 599 (1–3) (2008) 152–158.
- [4] J.C. Almanza-Perez, G. Blancas-Flores, R. Garcia-Macedo, F.J. Alarcon-Aguilar, M. Cruz, Leptin and its association with obesity and type 2 diabetes, *Gac. Med. Mex.* 144 (6) (2008) 535–542.
- [5] R. Garcia-Macedo, F. Sanchez-Munoz, J.C. Almanza-Perez, G. Duran-Reyes, F. Alarcon-Aguilar, M. Cruz, Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells, *Eur. J. Pharmacol.* 587 (1–3) (2008) 317–321.
- [6] F.U. Amin, S.A. Shah, M.O. Kim, Glycine inhibits ethanol-induced oxidative stress, neuroinflammation and apoptotic neurodegeneration in postnatal rat brain, *Neurochem. Int.* 96 (2016) 1–12.
- [7] G. Blancas-Flores, F.J. Alarcon-Aguilar, R. Garcia-Macedo, J.C. Almanza-Perez, J.L. Flores-Saenz, R. Roman-Ramos, J.L. Ventura-Gallegos, J. Kumate, A. Zentella-Dehesa, M. Cruz, Glycine suppresses TNF- α -induced activation of NF- κ B in differentiated 3T3-L1 adipocytes, *Eur. J. Pharmacol.* 689 (1–3) (2012) 270–277.
- [8] M.S. Hayden, S. Ghosh, Signaling to NF- κ B, *Genes Dev.* 18 (18) (2004) 2195–2224.
- [9] M. Karin, A. Lin, NF- κ B at the crossroads of life and death, *Nat. Immunol.* 3 (3) (2002) 221–227.
- [10] J.Y. Kim, M. Morgan, D.G. Kim, J.Y. Lee, L. Bai, Y. Lin, Z.G. Liu, Y.S. Kim, TNF- α induced non-canonical NF- κ B activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2, *J. Cell Sci.* 124 (Pt 4) (2011) 647–656.
- [11] A.T. Paul, V.M. Gohil, K.K. Bhutani, Modulating TNF- α signaling with natural products, *Drug Discov. Today* 11 (15–16) (2006) 725–732.
- [12] A. Oeckinghaus, M.S. Hayden, S. Ghosh, Crosstalk in NF- κ B signaling pathways, *Nat. Immunol.* 12 (8) (2011) 695–708.
- [13] L.A. Solt, M.J. May, The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling, *Immunol. Res.* 42 (1–3) (2008) 3–18.
- [14] M.J. May, F. D Acquisto, L.A. Madge, J. Glockner, J.S. Pober, S. Ghosh, Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex, *Science* 289 (5484) (2000) 1550–1554.
- [15] L.A. Solt, L.A. Madge, M.J. May, NEMO-binding domains of both IKK α and IKK β regulate I κ B kinase complex assembly and classical NF- κ B activation, *J. Biol. Chem.* 284 (40) (2009) 27596–27608.
- [16] M.J. May, S. Ghosh, Signal transduction through NF- κ B, *Immunol. Today* 19 (2) (1998) 80–88.
- [17] T. Lawrence, The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (6) (2009) a001651.
- [18] T. Lawrence, C. Fong, The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (4) (2010) 519–523.
- [19] N.T. Bui, A. Livolsi, J.F. Peyron, J.H. Prehn, Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of I κ B α , *J. Cell Biol.* 152 (4) (2001) 753–764.
- [20] D. Gallagher, H. Gutierrez, N. Gavalda, G. O Keeffe, R. Hay, A.M. Davies, Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons, *J. Neurosci.* 27 (36) (2007) 9664–9669.

- [21] Y. Takada, A. Mukhopadhyay, G.C. Kundu, G.H. Mahabeshwar, S. Singh, B.B. Aggarwal, Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.* 278 (26) (2003) 24233–24241.
- [22] S. Ghosh, M. Karin, Missing pieces in the NF-kappaB puzzle, *Cell* 109 (Suppl.) (2002) S81–S96.
- [23] J.E. Chatterton, M. Awobuluyi, L.S. Premkumar, H. Takahashi, M. Talantova, Y. Shin, J. Cui, S. Tu, K.A. Sevarino, N. Nakanishi, G. Tong, S.A. Lipton, D. Zhang, Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature* 415 (6873) (2002) 793–798.
- [24] B. Laube, G. Maksay, R. Schemm, H. Betz, Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses?, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (11) (2002) 519–527.
- [25] M. Wheeler, R.F. Stachlewitz, S. Yamashina, K. Ikejima, A.L. Morrow, R.G. Thurman, Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production, *FASEB J.* 14 (3) (2000) 476–484.
- [26] M. Froh, R.G. Thurman, M.D. Wheeler, Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (4) (2002) G856–63.
- [27] Y. Sakata, Y. Owada, K. Sato, K. Kojima, K. Hisanaga, T. Shinka, Y. Suzuki, Y. Aoki, J. Satoh, H. Kondo, Y. Matsubara, S. Kure, Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system, *Brain Res.* 94 (1–2) (2001) 119–130.
- [28] H. Green, O. Kehinde, An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion, *Cell* 5 (1) (1975) 19–27.
- [29] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2) (1983) 55–63.
- [30] M.E. Miranda-Perez, C. Ortega-Camarillo, M. Del Carmen Escobar-Villanueva, G. Blancas-Flores, F.J. Alarcon-Aguilar, Cucurbita ficifolia Bouche increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca(2+) from the endoplasmic reticulum, *J. Ethnopharmacol.* 188 (2016) 159–166.
- [31] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1) (1987) 156–159.
- [32] M. Fasshauer, J. Klein, U. Lossner, R. Paschke, Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumor necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes, *Horm. Metab. Res.* 35 (3) (2003) 147–152.
- [33] M. Fasshauer, S. Kraiss, M. Klier, U. Lossner, M. Blüher, J. Klein, R. Paschke, Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (4) (2003) 1045–1050.
- [34] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, R.G. Roeder, Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic Acids Res.* 11 (5) (1983) 1475–1489.
- [35] G.S. Dbaibo, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B, *J. Biol. Chem.* 268 (24) (1993) 17762–17766.
- [36] L.N. Lopez-Bojorquez, F. Arechavaleta-Velasco, F. Vadillo-Ortega, D. Montes-Sanchez, J.L. Ventura-Gallegos, A. Zentella-Dehesa, NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta, *Inflamm. Res.* 53 (10) (2004) 567–575.
- [37] S. Ghosh, D. Baltimore, Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B, *Nature* 344 (6267) (1990) 678–682.
- [38] C.M. Diaz-Garcia, C. Sanchez-Soto, D. Fuentes-Silva, C. Leon-Pinzon, D. Dominguez-Perez, C. Varela, A. Rodriguez-Romero, O. Castaneda, M. Hiriart, Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via Ca(2+) influx blockade and cause glucose intolerance in vivo, *Toxicol.* 59 (2) (2012) 306–314.
- [39] M.L. Schmitz, I. Mattioli, H. Buss, M. Kracht, NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels, *Chembiochem* 5 (10) (2004) 1348–1358.
- [40] H. Hacker, M. Karin, Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, *Sci. STKE* 2006 (357) (2006), re13.
- [41] D. Krappmann, E.N. Hatada, S. Tegethoff, J. Li, A. Klippel, K. Giese, P.A. Baeuerle, C. Scheidereit, The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component, *J. Biol. Chem.* 275 (38) (2000) 29779–29787.
- [42] A. Spittler, C.M. Reissner, R. Oehler, A. Gornikiewicz, T. Gruenberger, N. Manhart, T. Brodowicz, M. Mittlboeck, G. Boltz-Nitulescu, E. Roth, Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF-alpha production and accelerated IL-10 expression, *FASEB J.* 13 (3) (1999) 563–571.
- [43] S. Vallabhapuram, M. Karin, Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system, *Ann. Rev. Immunol.* 27 (2009) 693–733.
- [44] E. Wegener, D. Krappmann, Dynamic protein complexes regulate NF-kappaB signaling, *Handb. Exp. Pharmacol.* (186) (2008) 237–259.
- [45] L. Ling, Z. Cao, D.V. Goeddel, NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (7) (1998) 3792–3797.
- [46] E.D. Tang, N. Inohara, C.Y. Wang, G. Nunez, K.L. Guan, Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in IkappaB kinase beta (IKKbeta) activation [corrected], *J. Biol. Chem.* 278 (40) (2003) 38566–38570.
- [47] G. Bonizzi, M. Karin, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol.* 25 (6) (2004) 280–288.
- [48] J. Napetschnig, H. Wu, Molecular basis of NF-kappaB signaling, *Ann. Rev. Biophys.* 42 (2013) 443–468.
- [49] Z. Gao, D. Hwang, F. Bataille, M. Lefevre, D. York, M.J. Quon, J. Ye, Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex, *J. Biol. Chem.* 277 (50) (2002) 48115–48121.
- [50] M. Maachi, L. Pieron, E. Bruckert, C. Jardel, S. Fellahi, B. Hainque, J. Capeau, J.P. Bastard, Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF-alpha, leptin and IL-6 levels in obese women, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28 (8) (2004) 993–997.
- [51] S.E. Shoelson, J. Lee, M. Yuan, Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 (Suppl. 3) (2003) S49–52.
- [52] M.J. Yin, Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta, *Nature* 396 (6706) (1998) 77–80.
- [53] V. Aguirre, T. Uchida, L. Yenush, R. Davis, M.F. White, The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307), *J. Biol. Chem.* 275 (12) (2000) 9047–9054.
- [54] K.E. Wellen, G.S. Hotamisligil, Inflammation, stress, and diabetes, *J. Clin. Invest.* 115 (5) (2005) 1111–1119.
- [55] J.C. Almanza-Perez, F.J. Alarcon-Aguilar, G. Blancas-Flores, A.E. Campos-Sepulveda, R. Roman-Ramos, R. Garcia-Macedo, M. Cruz, Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2, *Biomed. Pharmacother.* 64 (8) (2010) 534–540.
- [56] J.W. Lynch, Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel, *Physiol. Rev.* 84 (4) (2004) 1051–1095.
- [57] H. Betz, B. Laube, Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity, *J. Neurochem.* 97 (6) (2006) 1600–1610.
- [58] M.D. Wheeler, K. Ikejima, N. Enomoto, R.F. Stacklewitz, V. Seabra, Z. Zhong, M. Yin, P. Schemmer, M.L. Rose, I. Rusyn, B. Bradford, R.G. Thurman, Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient, *Cell. Mol. Life Sci.* 56 (9–10) (1999) 843–856.
- [59] M. Froh, R.G. Thurman, M.D. Wheeler, Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (4) (2002) G856–63.
- [60] M. Wheeler, R.F. Stachlewitz, S. Yamashina, K. Ikejima, A.L. Morrow, R.G. Thurman, Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production, *FASEB J.* 14 (3) (2000) 476–484.
- [61] T.I. Webb, J.W. Lynch, Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel, *Curr. Pharm. Des.* 13 (23) (2007) 2350–2367.
- [62] S. Mocellin, M. Provenzano, RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology, *J. Transl. Med.* 2 (2004) 39–44.
- [63] Jin Lee Ui, So-Rim Choung, K.V. Bhanu Prakash, Eun-Ju Lee, Mi Young Lee, Young Joo Kim, Chang-Whan Han, Young-Chul Choi, Dual knockdown of p65 and p50 subunits of NF-kappaB by siRNA inhibits the induction of inflammatory cytokines and significantly enhance apoptosis in human primary synoviocytes treated with tumor necrosis factor-alpha, *Mol. Biol. Rep.* Sept. 35 (3) (2008) 291–298.
- [64] S. Talwar, J.W. Lynch, D.F. Gilbert, Fluorescence-based high-throughput functional profiling of ligand-gated ion channels at the level of single cells, *PLoS One* 8 (3) (2013) e58479.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 16/03/2018

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna ERIKA CONTRERAS NUÑEZ, matrícula 2133801726, quien cumplió con los 315 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha diecinueve de marzo del 2018 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

REGULACIÓN DE LA VÍA DE
TNF- α /NF κ B POR ACCIÓN DE
LA GLUCINA EN ADIPOCITOS

Cabe mencionar que la aprobación de la Idónea Comunicación de Resultados tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 405 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

Secretario

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

Vocal

Vocal

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

DR. JAIME HECTOR GOMEZ ZAMUDIO



REGULACIÓN DE LA VÍA DE
TNF- α /NF- κ B POR ACCIÓN DE
LA GLUCINA EN ADIPOCITOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 19 del mes de marzo del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. GERARDO BLANCAS FLORES
DR. JAIME HECTOR GOMEZ ZAMUDIO
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ERIKA CONTRERAS NUÑEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ERIKA CONTRERAS NUÑEZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL

DR. JAIME HECTOR GOMEZ ZAMUDIO

SECRETARIO

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ