



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE
EXPRESIÓN DEL RNAm DE ADIPOCINAS POR
EFECTO DE LA GLICINA EN RATONES OBESOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:
B.E. GERARDO BLANCAS FLORES

DIRECTORES:
DR. FRANCISCO J. ALARCÓN AGUILAR
DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ

ASESOR:
DRA. REBECA GARCÍA MACEDO

México D.F. Noviembre 2007

COMITÉ TUTORAL

Co-Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Lab. de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

aaasj2@prodigy.net.mx

Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular A

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

mcruzl@yahoo.com

Asesor:

Dra. Rebeca García Macedo

Investigador asociado C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

gamareb@yahoo.es

Jurado:

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor titular C

Jefe del Laboratorio de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

rrr@xanum.uam.mx

Dra. Genoveva Durán Reyes

Investigador asociado D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

genodur@hotmail.com

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

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social en colaboración con el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y el Dr. Miguel Cruz López. El trabajo de investigación fue apoyado por el FOFOI en el proyecto 2005/1/I/045. El alumno Gerardo Blancas Flores recibió apoyo de CONACYT, número de registro 198534 y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, matrícula No. 99092360.

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Determinación de los niveles de expresión del RNAm de adipocinas por efecto de la glicina en ratones obesos”. Con fecha Noviembre del 2007.

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor titular C

Jefe del Laboratorio de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

rrr@xanum.uam.mx

Presidente

Dra. Rebeca García Macedo

Investigador asociado C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

gamareb@yahoo.es

Secretario

Dr. Genoveva Durán Reyes

Investigador asociado D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

genodur@hotmail.com

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más la vida.

A mi Novia y futura Esposa

El principal agradecimiento es para mi novia Ángeles Martínez U. pues me ha apoyado y comprendido, lo cual me ha impulsado y mantenido firme en mis convicciones. Pero sobre todo, le agradezco de todo corazón por su confianza, incondicional apoyo, estímulo y motivación durante no solamente la producción de esta tesis, sino durante ya siete años de vidas compartidas.

A mis Padres

Porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de mis anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo,

amor y confianza que en mi se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que constituyen el legado más grande que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecido. Por esto y más... Gracias.

A mi madre

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. ¡Gracias por darme la vida! ¡Te quiero mucho!

A mi padre

A quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional.

A mis Hermanas

A mi hermana Rocio por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles; a mi hermanita Sonia por enseñarme a nunca dejar de sonreír y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Gracias a ustedes!

A mis maestros

Al Dr. Francisco J Alarcón Aguilar por su gran apoyo y motivación para la culminación de este estudio profesional y para la elaboración de esta tesis, así como por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional. Al Dr. Rubén Román Ramos por su apoyo incondicional en el Laboratorio de Farmacología. Al profesor José Luis Flores por sus consejos durante mis estudios de posgrado. A la Dra. Rebeca García M. por su paciencia y sabiduría. Al Dr. Miguel Cruz L. por el impulso y la motivación que me ha brindado en mi estancia en CMNSXXI.

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

Al Dr. Jesús Kumate

Por el ejemplo de perseverancia que nos muestra día con día y por el impulso que nos brinda para seguir mejorando como investigadores.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y en especial al Laboratorio de Farmacología por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y de gente productiva. Al Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS, en particular al Laboratorio de Bioquímica por su apoyo para la realización de esta tesis. Y a la Fundación IMSS por el apoyo económico brindado a la UIM en BQ, para la realización de los experimentos. ¡Gracias!

INDICE	Pag.
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1.- Introducción.....	5
1.1.- Leptina.....	6
1.2.- TNF- α	7
1.3.- IL-6.....	8
1.4.- Adiponectina.....	9
1.5.- Resistina.....	9
1.6.- DT2 y sus alteraciones.....	10
1.7.- Glicina.....	11
1.8.- Modelo de ratón obeso.....	12
2.- Antecedentes.....	13
3.- Justificación.....	15
4.- Hipótesis.....	16
5.- Objetivos.....	17
5.1.- Objetivo general.....	17
5.2.- Objetivos particulares.....	17
6.- Materiales y métodos.....	18
6.1.- Reactivos.....	18
6.2.- Diseño experimental.....	19
7.- Resultados.....	24
8.- Discusión.....	38
9.- Conclusión.....	46
10.- Perspectivas.....	47
11.- Bibliografía.....	48

RESUMEN

La obesidad es uno de los padecimientos más comunes que aquejan a la población en general, la cual no sólo es un problema social y estético sino también es una enfermedad seria que resulta de diversos factores, entre los que destacan los genéticos, metabólicos y psicológicos. Su prevalencia está aumentando rápidamente y aunque el porcentaje de la población afectada varía de unos países a otros, se considera que en los próximos años la mayor parte de la población mundial será obesa o presentará sobrepeso. La obesidad es una enfermedad crónica que se produce por un desequilibrio entre la energía ingerida y la energía gastada. El exceso de energía se almacena en los adipocitos, mismos que aumentan en tamaño y/o en número.

En la actualidad la obesidad se considera un proceso inflamatorio debido a que se relaciona con una desregulación en los niveles circulantes de marcadores de inflamación, como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF- α), resistina, leptina, entre otros. Estos marcadores desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la obesidad ya que se encuentran desregulados en esta enfermedad. Cabe señalar que estos cambios están asociados con diversas situaciones patológicas, tales como diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión y enfermedades cardiovasculares.

Por otro lado, el conocimiento creciente con respecto a los genes y moléculas implicados en el desarrollo de la obesidad permite entrever nuevas estrategias potencialmente útiles para la prevención y/o tratamiento de la obesidad. Estudios recientes demuestran que la glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos, pero se desconoce su efecto en la obesidad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la glicina sobre la tolerancia a la glucosa, la obesidad y la resistencia a la insulina, así como en otros parámetros bioquímicos y sobre la expresión del RNAm de adipocinas en un modelo murino de obesidad inducido con glutamato monosódico (GMS).

Los resultados indican que los ratones tratados con GMS presentan intolerancia a la glucosa a partir de las 14 semanas de edad; al final del estudio (18 semanas) se observa hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. No se encontraron cambios significativos en los niveles de triglicéridos, colesterol y A1C; tampoco en las actividades de las transaminasas glutámico oxaloacética (TGO) y glutámico pirúvica (TGP) con respecto a los valores de ratones delgados (controles). Se trataron ratones obesos con 0.1g de glicina /kg de peso durante 30 días; al final del tratamiento se determinaron los niveles de expresión de las adipocinas por RT-PCR en tiempo real. Se demostró que el tratamiento con glicina disminuye la expresión de adipocitocinas proinflamatorias y tiende a aumentar adiponectina (adipocina antiinflamatoria).

Con base en nuestros resultados, se puede decir que este aminoácido tiene efectos antiinflamatorios en el modelo de obesidad inducido con GMS, constituyendo una interesante alternativa para reducir el cuadro inflamatorio asociado con este padecimiento.

ABSTRACT

Obesity is one of the most common diseases in the general population. It is not only a social and cosmetic problem but also a serious ailment that leads to several genetic, metabolic and psychological disturbances. Its prevalence is rapidly increasing and although the rate of population affected is variable in different countries, it is thought that in future years most of the world population will be obese or with overweight. Obesity is a chronic disease that results from an unbalance between the food eaten and energy expended. The excessive energy is stored in adipocytes (fat cells), which increase in size and/or number.

Obesity is currently considered an inflammatory process since it is associated with a dysregulation in circulating levels of inflammation markers such as interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α), resistin, and leptin, among others. These markers play a very important role in the pathophysiology of obesity, since they are dysregulated in this disease. It must be noted that these changes are also associated with several diseases such as type 2 diabetes (DT2), hypertension and cardiovascular diseases.

On the other hand, the growing knowledge about genes and molecules involved in the development of obesity allows envisioning new potentially useful strategies for prevention and/or treatment of obesity. Recent studies show that glycine blocks the systemic inflammation found in many pathological states. However, the effect of glycine on obesity is unknown.

The objective of this research was to study the effect of glycine on glucose tolerance, obesity and insulin resistance, as well as other biochemical, and mRNA expression of adipokines in a murine obesity model induced with monosodium glutamate (MSG).

Results indicate that mice treated with MSG have impaired glucose tolerance at 14th week of age and at the end of the study (18th week) hiperinsulinemia and insulin resistance were noted. No significant changes were found in triglycerides, cholesterol and A1C, nor in glutamic-oxaloacetate

transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity compared with values of lean mice (controls). Obese mice were treated with 0.1 g/kg of glycine during 30 days. At the end of treatment adipokines expression was measured with RT-PCR in real time. It was demonstrated that glycine decreases expression of proinflammatory cytokines, showing a trend to increase adiponectina (anti-inflammatory adipokine).

Based on our results, it can be stated that this aminoacid has anti-inflammatory effects in the MSG induced obesity model, representing a very interesting option to balance the inflammation associated with the obesity.

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades asociadas con la obesidad, entre las que destaca la diabetes tipo 2 (DT2), han aumentado dramáticamente en todo el mundo. En el año 2000 se calculó que existían 7.2 millones de casos con diabetes y, por su continuo incremento, se calcula que en la actualidad la incidencia es de alrededor de 10 millones. Las complicaciones que se presentan durante el curso de la DT2 la han ubicado como la primera causa de muerte en personas de 55-64 años de edad (Rivera *et al.*, 2002). Además, durante los últimos 20 años se ha observado incremento en la mortalidad por DT2 a edades más tempranas (Barquera *et al.*, 2003), debido muy probablemente al aumento en la obesidad y a la pérdida de la sensibilidad a la insulina o resistencia a la insulina (RI) (Rivera *et al.*, 2002).

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

El TA, clásicamente considerado como un reservorio de energía, además de sus funciones metabólicas, constituye un órgano con una gran capacidad de recibir y generar información de su medio ambiente. Se ha demostrado que los adipocitos poseen funciones similares a diversas células inmunitarias, como la activación del complemento y la producción de citocinas. Las células precursoras de adipocitos tienen la capacidad de fagocitar y pueden transformarse en células parecidas a los macrófagos en respuesta a diferentes estímulos. La fisiopatología en la generación de señales por el TA tiene una importancia capital en el impacto deletéreo que un exceso de grasa puede ejercer sobre el organismo humano (Recasens *et al.*, 2004).

El TA es un tejido secretor activo que elabora una gran variedad de moléculas conocidas como adipocinas o adipocitocinas, que incluyen al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), leptina, adiponectina y resistina, los cuales pueden mediar muchos de los cambios metabólicos del SM. Mediante la producción de estas moléculas, el TA posee la capacidad de influir sobre la fisiología local del adipocito y la del organismo. De esta forma, la relación del adipocito con la resistencia a la insulina es independiente de la función del TA como depósito de energía.

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

Las principales adipocinas asociadas con la regulación del peso corporal son la leptina, TNF- α , IL-6, adiponectina y resistina. A continuación se hará una descripción de las principales características de cada una de ellas.

1.1.- Leptina

Esta proteína es codificada por el gen de la obesidad *ob* y secretada por el tejido graso. El gen *ob* está localizado en el cromosoma 6 en el caso del ratón y en el cromosoma 7q31.3 en humanos. El gen *ob* posee 650 kb y está constituido por 3 exones separados por 2 intrones. La región que codifica para la síntesis de leptina se localiza en los exones 2 y 3. Cuando se producen mutaciones en el gen *ob*, los animales de experimentación desarrollan el fenotipo típico *ob/ob*. La leptina humana presenta una homología del 84% con la proteína de ratón y del 83% con la leptina de rata.

La leptina es una hormona proteínica constituida por 167 aminoácidos, con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de que la leptina pase al torrente circulatorio. Esta proteína madura de 146 aminoácidos tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, presenta una estructura terciaria similar a la estructura de las citocinas clásicas de hélice larga y contiene un puente disulfuro necesario para su actividad biológica (Sánchez *et al.*, 2005; Simón *et al.*, 2002).

La síntesis de la leptina ocurre principalmente a nivel del tejido adiposo blanco (TAB), aunque también ha sido hallada en otros órganos y tejidos, tales como hipotálamo, hipófisis, placenta, músculo esquelético, mucosa gástrica y epitelio mamario. Este hecho permitió proponer que la secreción de leptina actúa como señal al cerebro, informando sobre el tamaño del tejido adiposo, produciendo supresión de la ingesta de alimentos y aumento en el gasto energético (Sánchez *et al.*, 2005; Simón *et al.*, 2002; Rexford *et al.*, 2000; Paracchini *et al.*, 2005).

1.2.- TNF- α

Es una citocina secretada principalmente por células del sistema inmune, como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T, principalmente CD4+. Se puede producir también en otros tipos celulares, tales como astrocitos, microglías, miocitos y fibroblastos (Anaya, 2003).

El TNF- α es considerado un regulador importante de la sensibilidad a la insulina. Estudios *in vivo* han demostrado que el tejido adiposo de roedores obesos con resistencia a la insulina producen significativamente mayor cantidad de TNF- α que los animales sanos y delgados. La neutralización de éste produce un aumento en la captación de glucosa en respuesta a la insulina. También se ha observado que en la condición de obesidad el TNF- α asociado a la membrana se encuentra aumentado por un defecto en el procesamiento a su forma soluble y parece ser capaz de generar resistencia a la insulina localmente (Hotamisligil *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2002).

La respuesta del TNF- α depende directamente de la unión a sus receptores. Esta citocina cuenta con dos receptores estructuralmente diferentes denominados receptor tipo I (TNF-RI; p55 ó p60) y el receptor tipo II (TNF-RII; p80 ó p75). Ambos son glicoproteínas transmembranales y forman parte de los 21 miembros de la familia de receptores TNF, presentes en todos los tipos de células; esta familia se caracteriza por tener múltiples regiones ricas en cisteínas a nivel de su dominio extracelular N-terminal, además de presentar una gran versatilidad molecular con respecto a sus ligandos (Anaya, 2003).

Las fracciones solubles de su receptor son sintetizadas y secretadas en el tejido adiposo y contribuyen a la concentración circulante de las mismas. El RNAm del TNF-RII se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo de sujetos obesos y se relaciona con el índice de masa corporal (IMC) y el índice de cintura cadera (ICC) (Hotamisligil *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 1998).

1.3.- IL-6

La IL-6 es una citocina de aproximadamente 26 KDa y 212 aminoácidos (Kern, 2001; Mohamed *et al.*, 1997), su receptor contiene un dominio de unión a inmunoglobulinas Ig y pertenece a la superfamilia de las IG's (Abbas *et al.*, 1991). Es una citocina multifuncional producida por diferentes tipos celulares, incluyendo a las células del sistema inmune, células endoteliales, fibroblastos, miocitos y TA. Se ha calculado que la tercera parte de la concentración circulante de IL-6 proviene del TA. Dado que la concentración plasmática de IL-6 es proporcional a la masa grasa, el tejido graso puede ser una fuente muy importante de esta citocina (Anaya, 2003). La producción y concentración de IL-6 circulante se asocia estrechamente con el IMC y otras medidas de adiposidad (Recasens *et al.*, 2004). La IL-6 promueve la síntesis de varias proteínas plasmáticas, como fibrinógeno, para contribuir a la fase de respuesta inflamatoria aguda. Así mismo, funciona como el principal factor de crecimiento de células β y como coestimulador de células T y timocitos (Thomson, 1994).

1.4.- Adiponectina

Es un miembro más de las adipocinas, también llamado Acrp30 o adipoQ, proteína de 244 aminoácidos sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo. Tiene efecto principalmente antiinflamatorio (Wang *et al.*, 2005) y está relacionada con el metabolismo de lípidos, particularmente con niveles altos de colesterol de alta densidad (HDL) y con bajos niveles de triglicéridos. La adiponectina es abundante en el plasma (30 µg/ml) (Ouchi *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2004); en su forma natural existe como trímero o hexámero de alto peso molecular (Schulze *et al.*, 2004). La desregulación de sus niveles plasmáticos está asociada con enfermedades ligadas a la obesidad, incluyendo las de arteria coronaria y DT2 (Ouchi *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2004). Se ha observado que la expresión de los RNAm de esta citocina se encuentra disminuida en humanos y ratones obesos, así como en algunos modelos de diabetes lipoatrófica. El tratamiento agudo con esta citocina disminuye la resistencia a la insulina, los niveles plasmáticos de ácidos grasos y el contenido de triglicéridos de músculo e hígado en los ratones; además, incrementa la capacidad de la insulina para suprimir la producción endógena de glucosa (Saltiel y Kahn, 2001).

1.5.- Resistina

Es una hormona peptídica secretada por los adipocitos. Pertenece a la familia de proteínas secretoras y liberadoras conocidas como moléculas ligadas a resistina (RELMS) y formadas en zonas de inflamación (FIZZ). La proteína humana contiene 114 aminoácidos y comparte un 59% de homología con la del ratón.

Algunos autores sugieren que la resistina puede causar resistencia a la insulina. Estudios recientes han reportado que tanto la expresión de resistina como sus concentraciones séricas se encuentran aumentadas en la obesidad y en la DT2, siendo capaz de disminuir el transporte de glucosa en los adipocitos; sin embargo, estudios subsecuentes no han confirmado aun estos hechos por lo que el papel potencial de la resistina todavía no es claro. La resistina recombinante

promueve la resistencia a la insulina a nivel sistémico cuando es administrada a ratones y disminuye el transporte de glucosa en células de tejido adiposo (Saltiel y Kahn, 2001; Shojima *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2005).

Los marcadores de la inflamación, sobretodo las citocinas, desempeñan un papel importante en la fisiopatología de la DT2 ya que se encuentran aumentadas en esta enfermedad, contribuyendo de manera importante al desarrollo de varias alteraciones y complicaciones características de este padecimiento.

1.6.- DT2 y sus alteraciones

La DT2 se caracteriza por hiperglucemia persistente debida a la deficiencia en la producción o acción de la insulina que afecta al metabolismo de la glucosa, proteínas y lípidos (Rivera *et al.*, 2002). La hiperglucemia genera glucotoxicidad y afecta diversas vías de señalización debido a la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Yuan *et al.*, 2000) y la vía del diacilglicerol, aumento del metabolismo de las hexosas (Du *et al.*, 2001), incremento en la formación de productos avanzados de glucosilación (AGEs) (Uirich y Cerami, 2001) y aumento en la vía de los polioles (Hodgkinson *et al.*, 2001). Todos estos mecanismos coinciden en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la cadena respiratoria y la NAPH oxidasa (Reusch, 2003). Además, la glucotoxicidad induce procesos proinflamatorios que culminan con complicaciones micro y macrovasculares (Singelton *et al.*, 2003).

El principal objetivo de los tratamientos en el paciente con DT2 es disminuir o controlar los niveles de glucosa elevados. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan las complicaciones durante la evolución de la enfermedad, motivo por el cual muchas de las investigaciones se han enfocado a desarrollar terapias que no sólo corrijan la hiperglucemia sino que también disminuyan el estrés oxidativo y modifiquen el metabolismo de los lípidos (Haffner, 1998), así como controlar la presencia de componentes que desencadenan el proceso inflamatorio y la resistencia a la acción de la insulina.

Sin embargo, es necesario encontrar opciones terapéuticas a la atención médica científica que, por principio, no puede ofrecer la curación, sino sólo el control de la obesidad y la diabetes.

Recientemente se encontró que 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 activación de macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios tipo citocinas, los cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria progresiva, característica de la obesidad y la DT2.

1.7.- Glicina

La glicina es uno de los aminoácidos más simples, no esenciales, cuyo radical es sólo un H; se forma a partir del dióxido de carbono y del amoníaco por la acción de la glicina sintetasa, que es una enzima dependiente del fosfato de piridoxal. También se puede formar a partir de la L-serina por la acción de la serina-hidroximetil-transferasa.

Este aminoácido se ha asociado con efectos benéficos en varios estados patológicos como los siguientes: choque inducido por hemorragia o endotoxinas, reducción en la concentración de alcohol en el estómago y aumento en la recuperación de la hepatitis producida por el alcohol; disminución del daño inducido por fármacos hepatotóxicos e inhibición de la apoptosis; disminución de la nefrotoxicidad originada por la ciclosporina A (fármaco inmunosupresor); prevención de hipoxia y de la formación de radicales libres, así como en el tratamiento de varias enfermedades asociadas con procesos inflamatorios, tales como traumas hemorrágicos, sepsis, quemaduras y hemorragias. En general, la glicina es un aminoácido considerado como un nutriente antioxidante y protector celular (Matilla *et al.*, 2002).

La glicina desempeña un papel importante en la estructura de ciertas proteínas y puede participar en varias funciones celulares como modificador biológico. Las funciones están asociadas con su pequeño tamaño y con la falta de una cadena lateral significativa que pudiera afectar sus características físicas por impartirle carga, hidrofobicidad u otras limitaciones estructurales (Matilla *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, podemos considerar a la glicina como un nutriente antioxidante protector celular con potencial para aminorar el estado inflamatorio presente en la obesidad.

1.8.- Modelo de obesidad

Los ratones neurointoxicados con glutamato monosódico (GMS) desarrollan obesidad severa en la edad adulta. La administración neonatal de esta sal produce daños graves en neuronas circuventriculares en la región arcuato hipotalámica, reduciendo el número de células hasta en un 75% (Elefteriou *et al.*, 2003). El efecto neurotóxico del GMS lleva a la muerte neuronal que se debe al efecto excitatorio de receptores específicos que generan un estado de continua despolarización, con un incremento sostenido de la permeabilidad membranal, un influjo pasivo de agua y un notable aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Estos trastornos afectan funciones homeostáticas, tales como la reproducción y, principalmente, el peso corporal ya que los animales neurointoxicados con GMS presentan un aumento en este parámetro que no puede ser atribuido a la mayor ingesta de alimento, sino más bien a un desbalance metabólico que culmina con obesidad severa (Campos *et al.*, 2002).

La RI es uno de los signos más comunes que se presentan tanto en la obesidad como en la diabetes. Se ha demostrado que ratas tratadas con GMS desarrollan obesidad y RI del primero al cuarto mes de edad, presentando una marcada intolerancia a la glucosa (Hirata *et al.*, 1997; de Mello *et al.*, 2001; Dolnikoff *et al.*, 2001).

2.- ANTECEDENTES

Estudios realizados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS han proporcionado resultados interesantes sobre el uso de la glicina como tratamiento contra la DT2. En los pacientes tratados con glicina (15 g/día) se ha encontrado que el porcentaje de la hemoglobina glucosilada (A1C) disminuye hasta 1.1% con respecto al placebo. En otro estudio empleando ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina, la administración de glicina provocó una disminución de 1.5% en el porcentaje de A1C y aumento de la actividad de enzimas antioxidantes. Esta respuesta es sumamente importante ya que varias investigaciones muestran que cuando la A1C disminuye 1% en pacientes diabéticos se reducen los indicadores de complicaciones hasta en 35% y las muertes relacionadas con diabetes en 25% (UKPDS, 1998). De igual modo se ha observado ligera disminución en la concentración de glucosa en sangre en el modelo experimental después del tratamiento con glicina (Alvarado *et al.*, 2003).

Para entender los mecanismos biológicos de la acción de la glicina se han realizado experimentos con cultivos de líneas celulares secretoras de insulina. La presencia de este aminoácido induce ligeros incrementos en la secreción de insulina que puede estar relacionado con los canales de K^+ - ATP y/o canales dependientes del voltaje Ca^{2+} (Mc Clenaghan *et al.*, 1996).

De manera general, el efecto promovido por la glicina en procesos proinflamatorios y de estrés se considera benéfico. En células del sistema inmune, células de Kupffer y de origen endotelial, el tratamiento con glicina inhibe la producción de $TNF-\alpha$ e induce la respuesta antiinflamatoria por la expresión de IL-10. El efecto de la glicina para modular estos efectos se encuentra relacionado con canales de glicina dependientes de cloro a los cuales se une y provoca hiperpolarización de la membrana, regulando la entrada de calcio (Zhong *et al.*, 2003; Yamashima *et al.*, 2001).

En un trabajo realizado recientemente por Almanza (2007) se encontró que el empleo de la glicina disminuye significativamente los niveles de

expresión de IL-6 y resistina en cultivos de fibroblastos, mientras que reduce los niveles de expresión de IL-6 y TNF- α , aumentando los de adiponectina sin afectar los de resistina en cultivos de adipocitos. En un modelo *in vivo* se encontró que la glicina disminuye las concentraciones plasmáticas de IL-6 y aumenta la de adiponectina en ratones sanos, mientras que reduce las concentraciones plasmáticas de resistina en ratones Ob/GMS.

Con base en estas observaciones se plantea que la glicina pudiera ser utilizada en el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio, tales como la obesidad y la DT2.

3.- JUSTIFICACION

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina, DT2 y SM; estas condiciones están acompañadas de un proceso inflamatorio que genera desregulación en los adipocitos, produciendo altos niveles de citocinas proinflamatorias y bajos de antiinflamatorias. Una de las alternativas para tratar de disminuir las complicaciones micro y macrovasculares en la obesidad y en la DT2, es la administración de glicina a los pacientes, aminoácido considerado como un nutriente antioxidante protector celular.

Resulta de gran relevancia conocer si la glicina modifica el perfil de las citocinas en el tejido graso de ratones obesos. Si el efecto antiinflamatorio producido por la glicina en el modelo animal se comprueba, estos datos apoyarían el tratamiento de los pacientes con resistencia a la insulina y DT2 con glicina, evitando la presencia de complicaciones micro y macrovasculares derivadas del estrés metabólico y del proceso inflamatorio. Los resultados que se obtengan serán una contribución más para el conocimiento de dichas enfermedades, así como de una posible alternativa para su tratamiento.

4.- HIPÓTESIS

Si la glicina aminora el proceso inflamatorio característico de la obesidad y la resistencia a la insulina, entonces debe inhibir la expresión de TNF- α , IL-6 y resistina, así como aumentar la expresión de adiponectina en ratones Ob/GMS.

5.- OBJETIVOS

5.1.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la glicina sobre la expresión de los RNA's mensajeros de las adipocinas en el modelo de ratón con obesidad inducida con GMS.

5.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el modelo de estudio: ratones con obesidad y resistencia a la insulina inducida por la administración de GMS.

2. Estandarizar las técnicas para cuantificar la expresión de las adipocinas en tejido graso por RT-PCR.

3. Determinar el efecto de la administración de glicina sobre:

- a) La expresión de los RNAm de adipocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 y resistina).
- b) La expresión del RNAm de adiponectina.
- c) La expresión del RNAm de leptina.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Reactivos

- L-ácido glutámico monohidratado GMS (Sigma-Aldrich).
- Glicina (Gibco BRL, Grand Island NY. USA).
- RNAlater (Ambion)
- Kit para la extracción de RNA de tejido adiposo (QIAGEN).
- Cloroformo (MERK).
- Etanol ABS (MERK).
- Agua libre de RNAsas (Promega, Medison Wi. USA).
- Agarosa (Promega, Madison Wi. USA).
- Bromuro de etidio (Biorad).
- Buffer de carga (10X Biorad).
- Kit DNA Master SYBR Breen I (Roche, Mannheim. Germany).
- Kit Retrotranscripción IpromII (Promega, Madison Wi. USA).
- Tiras reactivas para determinar glucosa (Acutrend sensor, Roche).
- Tiras reactivas para determinar Colesterol total, Triglicéridos (Tg), Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), Transaminasa glutámico pirúvica (TGP).
- Cuantificador de hemoglobina glucosilada.

6.2.- Diseño experimental

A) Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos y hembras cepa CD-1, obtenidos del bioterio de la UAM-I, de un día de nacidos con un peso promedio de 1.5 a 2g, que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos: a uno se le administró solución salina al 0.9% en la región dorsal por vía subcutánea (grupo testigo) y al otro GMS por la misma vía (grupo experimental). Ambos se mantuvieron con acceso libre de agua y alimento.

B) Lotes experimentales

I) Ratones sanos. A ratones recién nacidos se les administró solución salina por vía subcutánea en dosis de 0.01 ml/g de peso corporal, al segundo, cuarto, sexto, octavo y décimo día posnatal. Catorce semanas después de la última administración de solución salina se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos de 5 ratones cada uno:

a. Subgrupo sano sin glicina. Los animales de este grupo se mantuvieron con acceso libre de agua y alimento.

b. Subgrupo sano con glicina. Este grupo también tuvo acceso libre de alimento pero fue tratado con glicina pura (30 días) que se administró por vía oral en el agua de beber a una dosis de 0.1 g/kg de peso corporal. Previamente se cuantificó el consumo de agua por animal/día para colocar las dosis exactas en los bebederos.

II) Ratones Obesos C/GMS. A ratones recién nacidos se les administró GMS (Sigma Chemical) al segundo y cuarto día posnatal por vía subcutánea a razón de 2 mg/kg de peso corporal en 0.01ml de solución salina; y 4 mg/kg de peso corporal, al sexto, octavo y décimo día después del nacimiento. Se mantuvieron con acceso libre de agua y alimento (Campos *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2003; Remke *et al.*, 1988).

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

a. Subgrupo obeso sin glicina. Los animales de este grupo se mantuvieron con acceso libre de agua y comida.

b. Subgrupo obeso con glicina. Este grupo tuvo acceso libre al alimento pero también se trató con glicina pura (30 días) que se administró en dosis de 0.1 g/kg de peso corporal. La administración fue por vía oral, en el agua de beber.

Se cuantificó el consumo de agua por animal/día para colocar las dosis exactas en los bebederos.

C) Curva de tolerancia a la glucosa y determinación de parámetros bioquímicos

A todos los grupos se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa, a los 3 ½ y 4 ½ meses de edad. Se les administró glucosa (dextrosa anhidra pura) a razón de 2 g/kg de peso vía intragástrica y se valoró la glucemia a los tiempos 0 (antes de la administración de glucosa), 30, 60, 90, 120 y 150 minutos (después de la administración de glucosa) de muestras obtenidas de la vena caudal.

Se tomaron muestras sanguíneas del seno orbital del ojo, por medio de capilares heparinizados, para determinar, hemoglobina glicada (A1C), transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvico (TGP), colesterol y triglicéridos.

La glucemia fue determinada usando un glucómetro Accutrend Sensor Comfort (Roche), la A1C en el aparato DCA 2000 (Bayer), TGP, TGO, colesterol y triglicéridos se midieron usando tiras reactivas que se leyeron en un aparato Reflotrón Plus (Roche).

D) Extracción del RNA total

Para la extracción del RNA total se utilizó la metodología descrita por QIAGEN. Después de los tratamientos indicados en el diseño experimental, se obtuvieron 100 mg de tejido graso del epidídimo de los machos y del tejido graso parametrial de las hembras; el tejido graso se cubrió inmediatamente con RNAlater se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a -70°C .

Para el aislamiento del RNA, se pesaron 100 mg del tejido y se homogeneizaron con 1 ml del reactivo de Lisis QIAzol, con un homogenizador, por 20-40 seg. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$) por 5 min. Este paso promueve la disociación de los complejos de las nucleoproteínas. Se adicionaron 200 μl de cloroformo, se agitó por 15 seg y se dejó a temperatura ambiente por 2-3 min. Se centrifugó a $12,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Después de la centrifugación, la muestra se separó en 3 fases: una fase acuosa transparente (superior) que contenía el RNA, una interfase blanca y una fase orgánica de color rojo (inferior). A la fase acuosa se le adicionó 600 μl de etanol al 70% y se mezcló en vortex. Se tomaron 700 μl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pudiera formarse y se pasó por una minicolumna (de aislamiento de RNA total) para filtrar, se centrifugó a $8,000 \times g$ por 15 seg a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$). Se repitió el paso anterior usando el resto de la muestra. Para lavar la columna se adicionó 700 μl de Buffer RW1, se centrifugó por 15 seg a $8,000 \times g$. La columna se lavó dos veces con Buffer RPE, después de cada lavado, se centrifugó a $8,000 \times g$ por 15 seg a temperatura ambiente. Para secar la membrana del gel de silicona, se centrifugó a $11,000 \times g$, por 2 minutos y el filtrado se desechó. El RNA se recuperó en un tubo nuevo, se agregaron dos veces 30-50 μl de agua libre de RNasa sobre la membrana del gel de silicona; para filtrar se centrifugó cada vez por 1 minuto en las condiciones ya indicadas. El RNA se dividió en alícuotas que se almacenaron a -70°C .

E) Cuantificación de la expresión de adipocinas por RT-PCR

Para la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), primero se preparó el DNA complementario (cDNA) a partir de RNA. Los productos de PCR se analizaron por medio de la tecnología SYBER Green (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany).

El equipo que se utilizó fue un LightCycler 2.0, que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo (preincubación 90°/10min, PCR 90°/00seg; 61°/07seg; 72°/10seg, melting 90°/00seg; 65°/15seg; 90°/00seg y enfriamiento 40°/30seg, usando iniciadores normales de PCR y el fluorocromo SYBER Green Dye I® que se intercala en las hebras de doble cadena.

Los iniciadores para las adipocinas seleccionadas fueron los siguientes:

TNF-α	F5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA-3' R5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
IL-6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'
Resistina	F5'-AACATTGGCTTAAATTGCTGGACA-3' R5'-CACAGGCAGAGCCACAGGAG-3'
Adiponectina	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3' R5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
PPAR-γ	F5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3' R5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3'
Leptina	F5'-CTCATGCCAGCACTCAAAAA-3' R5'-AGCACCACAAAACCTGATCC-3'

Como sonda de normalización se utilizó **36Bb4** (F5'-AAGCGCGTCTGGCATTGTCT-3' R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3') (Fashauer *et al.*, 2001).

Se estandarizaron las reacciones para cada uno de los iniciadores y se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ para cuantificar la expresión de cada adipocina. Se verificó la amplificación específica de cada uno de los transcritos por medio del análisis de las curvas de fusión respectivas. La integridad de PCR se determinó por el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

F) Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA, de acuerdo con la distribución de los datos, para evaluar las diferencias dentro de un mismo grupo y entre los grupos. La significancia estadística fue con una $p \leq 0.05$.

7.- RESULTADOS

Inducción de obesidad por la administración de GMS en ratones.

Se obtuvieron ratones con obesidad inducida por la administración de GMS. En la Figura 1A se observa la diferencia a simple vista de la obesidad inducida con respecto a los ratones sanos. En la Figura 1B se observan características del modelo como: acortamiento del cuerpo y de la cola, con un incremento en la grasa abdominal con respecto al sano, que no presenta grasa abdominal.

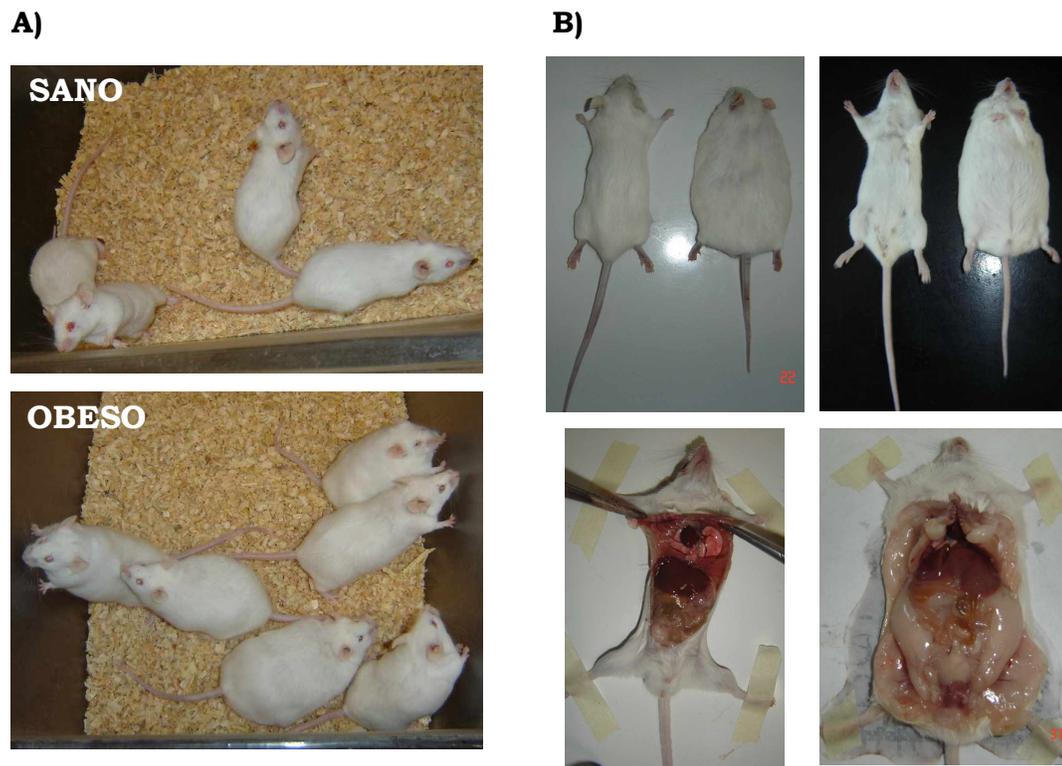


Fig. 1. Modelo de obesidad inducido por la administración de glutamato monosódico (GMS). En las imágenes A y B se observan algunas de las características de los ratones obesos con respecto a los ratones sanos (acortamiento del cuerpo como de la cola e incremento de grasa abdominal).

Prueba de tolerancia a la glucosa a los 3 ½ y 4 ½ meses de edad.

Los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa realizada en los animales a los 3 ½ meses de edad, tanto en ratones sanos como en ratones obesos, se muestran en la Figura 2. Después de un ayuno 12 horas se les midió la concentración de glucosa al inicio (T=0), los ratones sanos presentaron concentraciones promedio de 85 mg/dL. En contraste, los ratones obesos presentaron concentraciones por arriba de 120 mg/dL. Después de la carga de glucosa (2 g/kg) se midió la glucemia en al minuto 30, observándose el pico máximo de glucosa en ambos casos. Posteriormente se observó un descenso paulatino en la concentración de glucosa en ambos casos. Sin embargo, en los ratones obesos se manifiesta un desequilibrio en el metabolismo de la glucosa debido a que sus niveles siempre son más altos que los correspondientes en animales sanos.

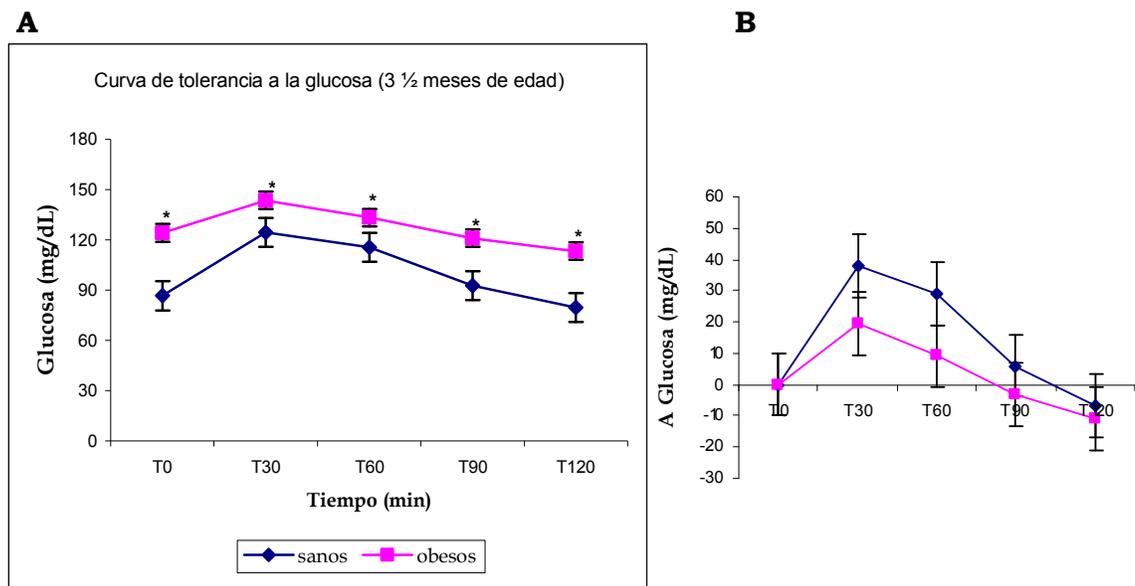


Fig. 2. A) Curva de tolerancia a la glucosa a los 3 ½ meses de edad. A ratones sanos como obesos se les determinó la concentración de glucosa a diferentes tiempos, después de un ayuno de doce horas y una carga de glucosa de 2 g/kg. Los datos son el valor promedio \pm S.E.M., n=10, *(p<0.05). **B)** Δ -Glucosa para determinar el efecto de la administración de glucosa.

Después de los 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se realizó nuevamente una curva de tolerancia a la glucosa (4 ½ meses de edad) en los diferentes grupos (sano sin tratamiento, sano tratado con glicina, obeso sin tratamiento y obeso tratado con glicina). En la Figura 3 se observan estos resultados. Después de un ayuno de 12 horas las concentraciones de glucosa oscilaron entre 80 y 90 mg/dL en todos los grupos, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Después de la carga de glucosa se midió la glucemia en el minuto 30, observándose el pico máximo de glucosa en todos los grupos. Posteriormente se observa un descenso paulatino en la concentración de glucosa en todos los grupos. En los tiempos (60, 90 y 120) se observan diferencias significativas entre los grupos obesos con respecto a los grupos sanos, manifestándose la intolerancia a la glucosa a los 4 ½ meses de edad, tanto en obesos no tratados como en tratados. Ahora bien, el grupo sano que recibió tratamiento con glicina presentó una disminución de la glucemia con respecto a los ratones sanos sin tratamiento al minuto 30, mostrando diferencias significativas en este punto. Sin embargo, en los ratones obesos no se observó el mismo comportamiento, ya que la glicina no disminuyó la glucemia en estos animales.

Los datos de los parámetros bioquímicos medidos a los 3 ½ meses de edad en ratones sanos como en obesos, se muestran en la Tabla 1. Los datos de los parámetros bioquímicos de los ratones obesos no muestran diferencias significativas con respecto a los ratones sanos, salvo una ligera disminución de las transaminasas. A los y 4 ½ meses de edad los parámetros bioquímicos no sufrieron cambios significativos (no incluidos) con respecto a los medidos a los 3 ½ meses.

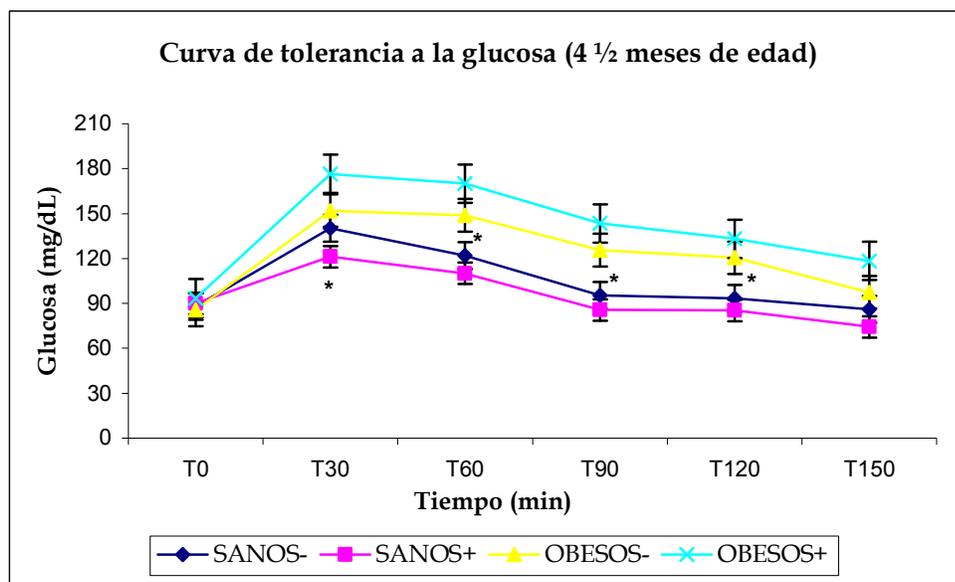


Fig. 3. Curva de tolerancia a la glucosa a los 4 ½ meses de edad. (-) Sin glicina, (+) con glicina. A los cuatro grupos de ratones se les determinó la concentración de glucosa a diferentes tiempos, después de un ayuno de 12 horas y una carga de glucosa de 2 g/kg. Los datos son el valor promedio \pm S.E.M., n=10, *(p<0.05) comparando animales tratados con Gly (+) contra no tratados (-).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos (media \pm S.E.M.) determinados a los 3 ½ meses de edad (N=10).

Grupo	A1C (%)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	TGO (U/L)	TGP (U/L)
Sano	4.04 \pm 0.7	110.2 \pm 9.5	95.2 \pm 33.3	9.2 \pm 6.2	16.7 \pm 11.7
Obeso	3.96 \pm 0.4	112.5 \pm 11.6	95.2 \pm 29.2	<2.25	<2.65

Estandarización de las diferentes citocinas por RT- PCR.

En cuanto a la estandarización por RT-PCR de los mRNA de las diferentes moléculas (TNF- α , IL-6, resistina, adiponectina y leptina) propuestas en este trabajo, incluyendo el mRNA de la proteína ribosomal (36B4), se obtuvo lo siguiente (Figura 4 y 5): la curva de amplificación del segmento seleccionado de 36B4 se realizó mediante diluciones seriales (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000). En la Figura 4 se muestra la amplificación de las diluciones. Con las diluciones se realizó una curva estándar que en este caso es la curva estándar de 36B4. Obteniendo un error de 0.002 y una eficiencia de 2.095. Recordando que la eficiencia debe ser cercana a 2.0. Finalmente, para detectar los fragmentos amplificados en la PCR de las diluciones (amplicones), se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, para determinar el tamaño del producto, que en este caso es de 135 pb (36B4) Figura 4 y 6.

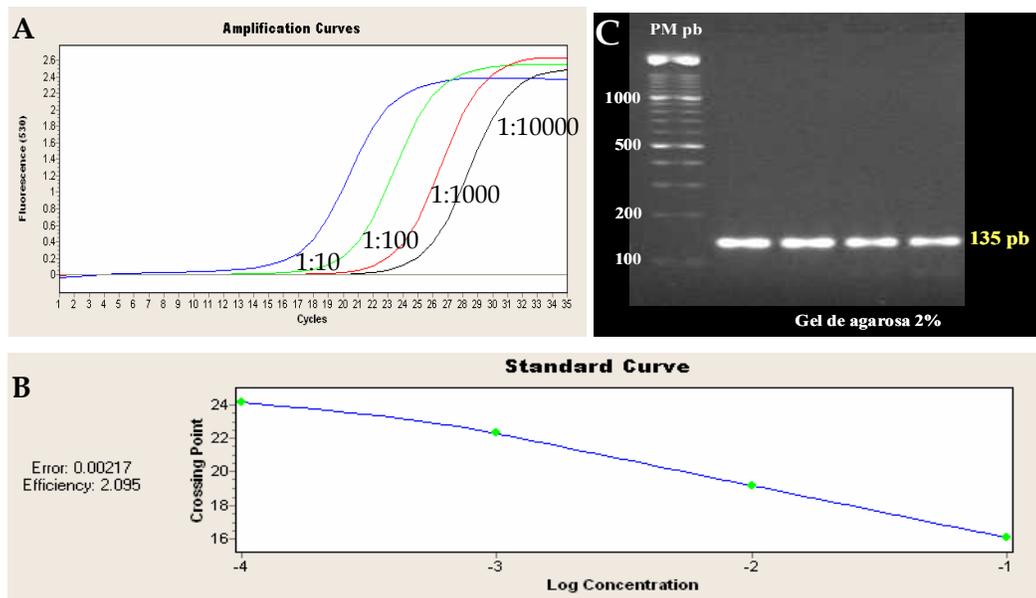


Fig. 4. Estandarización de las reacciones de polimerización en cadena (PCR) en tiempo real para las diferentes adipocinas. Las curvas de amplificación de las diferentes citocinas incluyendo el gen de normalización (RNAm de la proteína ribosomal 36B4). **A)** Se realizaron mediante diluciones seriales (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000), **B)** obteniendo una curva estándar para cada molécula. **C)** Los fragmentos amplificados en la PCR se separaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, para determinar el tamaño del producto de cada citocina.

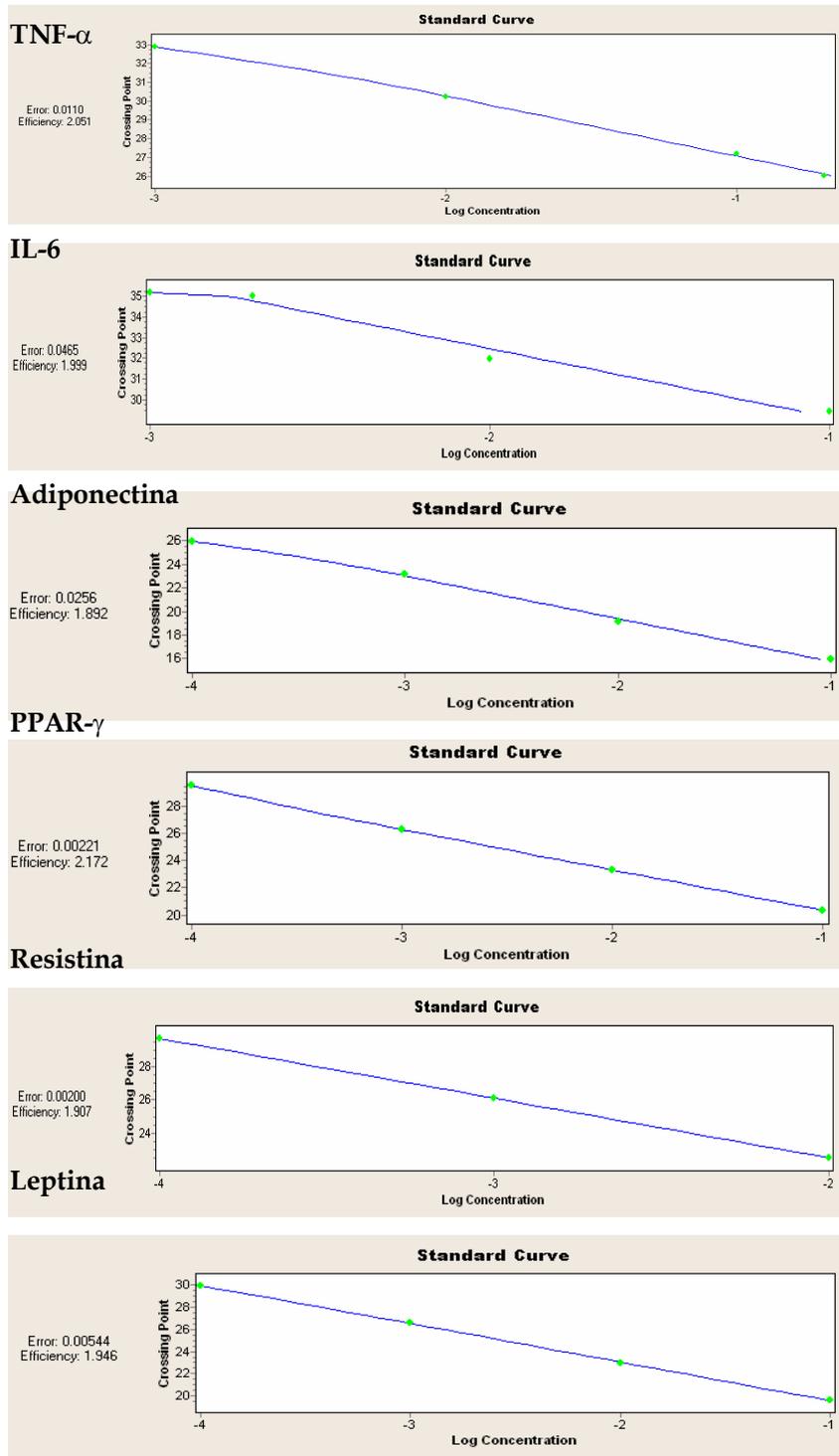


Fig. 5. Curvas estándar de TNF- α , IL-6, resistina, adiponectina, PPAR- γ y leptina. Las curvas estándar se realizaron mediante diluciones seriales del cDNA, amplificados por PCR en tiempo real. La eficiencia y el error fueron cercanos o igual a 2.0 y 0.05, respectivamente.

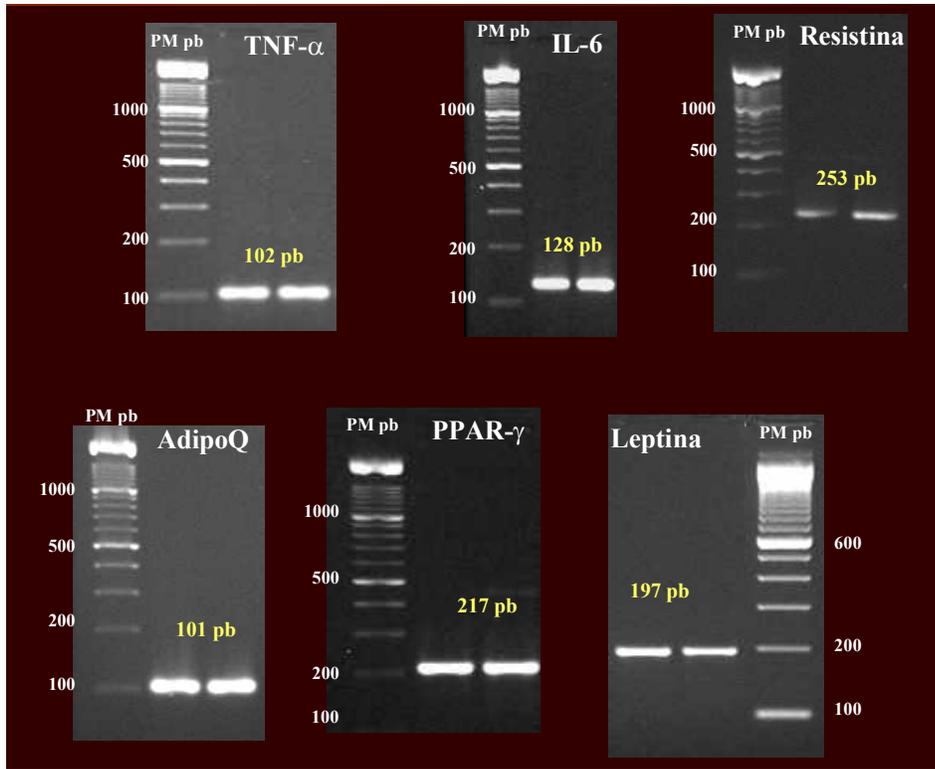


Fig. 6. Productos de PCR de las diferentes citocinas comparando su tamaño con un marcador de peso molecular. Los fragmentos amplificados en la PCR se separaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, para determinar el tamaño del producto de cada citocina. Se muestran dos fragmentos amplificados de cada citocina.

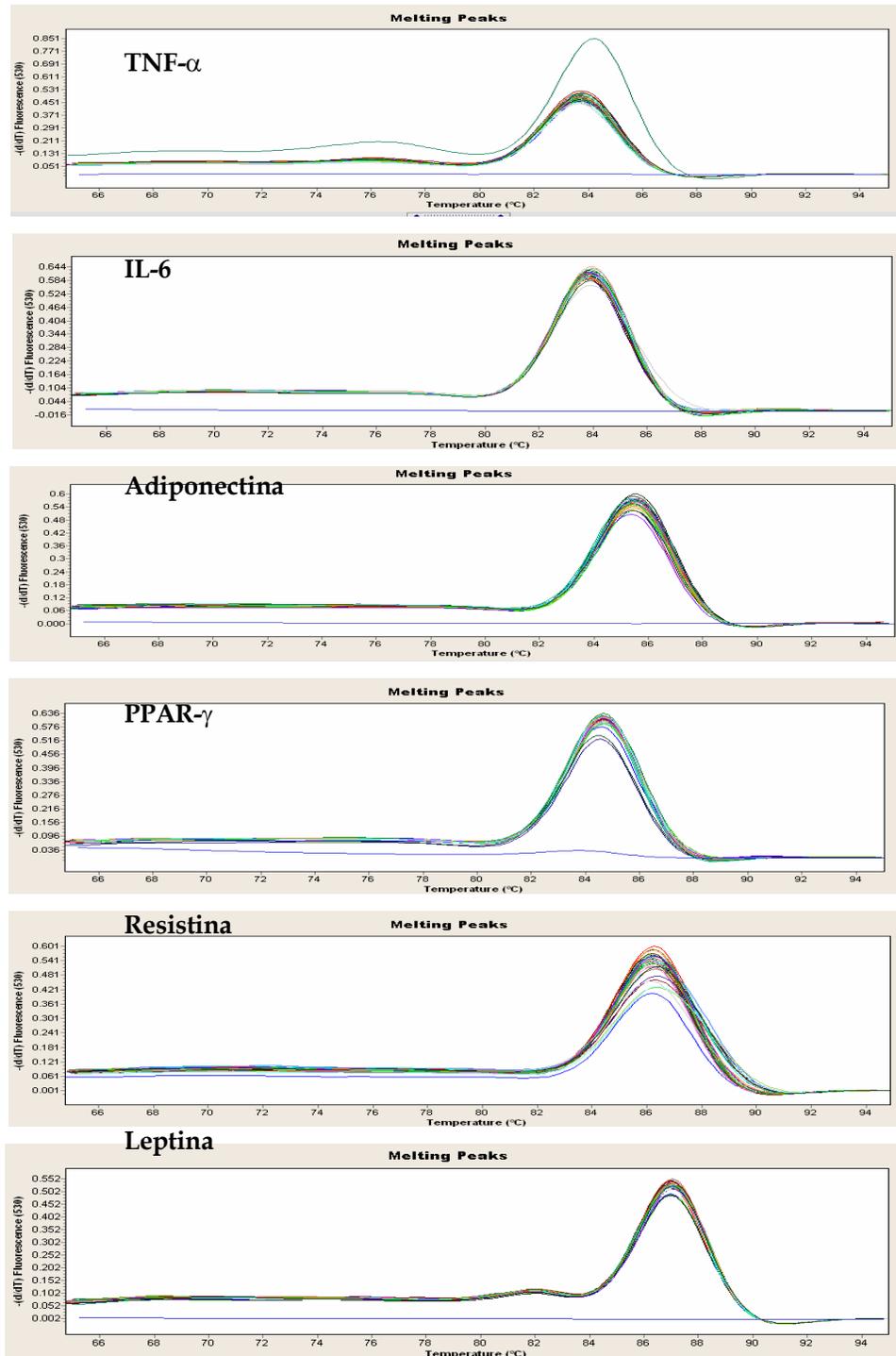


Fig. 7. Curva Melting de TNF- α , IL-6, resistina, adiponectina, PPAR- γ y leptina. Se realizaron curvas melting para determinar la temperatura de disociación de cada molécula y poder determinar la especificidad de los productos de la PCR, al observarse la formación de un solo pico melting.

Expresión del RNAm de las diferentes adipocinas en el tejido adiposo gonadal.

En la Figura 8 se observa que en el tejido adiposo del grupo de ratones obesos, tiene mayor expresión de TNF- α , con respecto al de ratones sanos. En el grupo sano tratado con glicina hay una disminución de la expresión del RNAm de TNF- α con respecto a su control, que fue estadísticamente significativa. Este mismo fenómeno ocurre con el grupo de ratones obesos tratados con glicina, ya que el tratamiento disminuye la expresión de TNF- α .

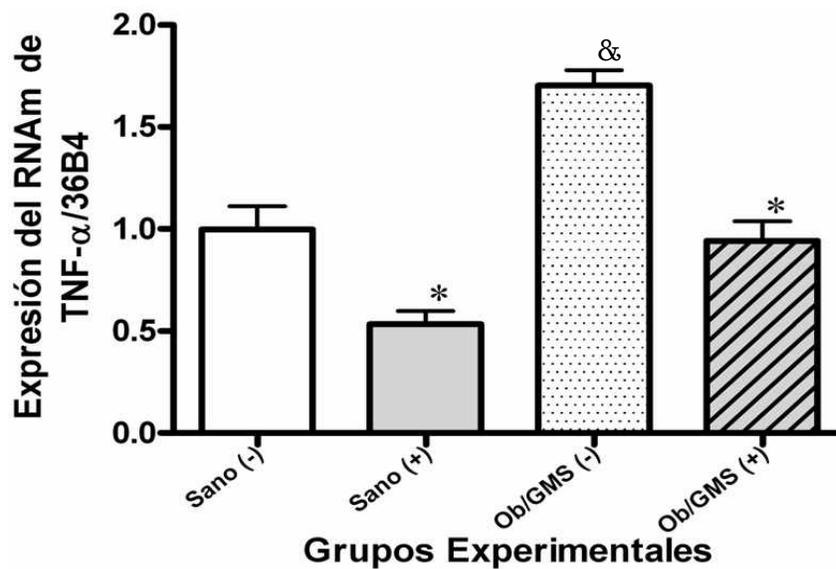


Fig. 8. Expresión del RNAm de TNF- α en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de TNF- α en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, * $p < 0.05$ comparando animales tratados con Gly (+) contra no tratados (-) y & $p < 0.05$ comparando animales Ob/GMS sin tratamiento contra sanos sin tratamiento.

En cuanto a la expresión del RNAm de IL-6 se observa un comportamiento similar a la expresión de TNF- α ya que en el tejido adiposo del ratón obeso se presenta mayor expresión de IL-6 comparada con las del ratón sano. Hay una disminución estadísticamente significativa en la expresión de IL-6 en el grupo de ratones obesos con tratamiento con glicina en comparación con los ratones obesos sin tratamiento. En el grupo sano tratado con glicina se observa una tendencia a disminuir la expresión de IL-6, pero no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo sano sin tratamiento (Figura 9).

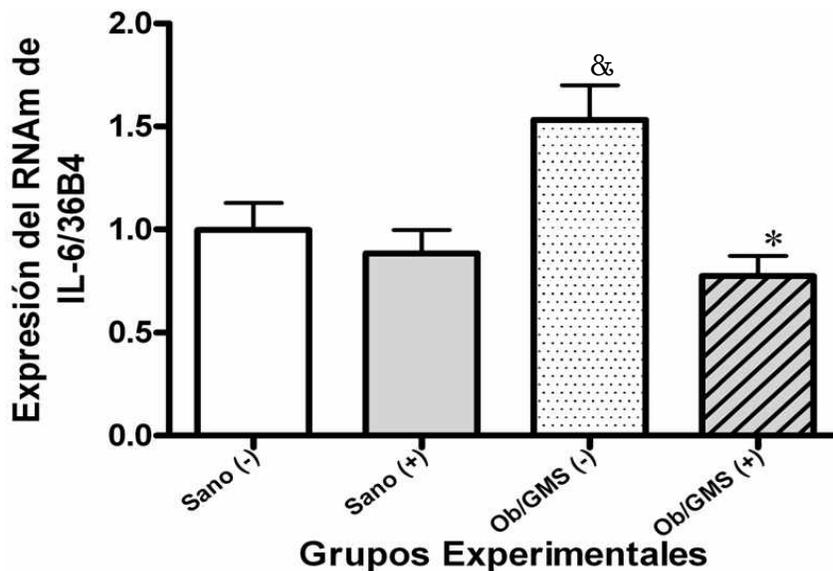


Fig. 9. Expresión del RNAm de IL-6 en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de IL-6 en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, * $p < 0.05$ comparando animales tratados con Gly (+) contra no tratados (-) y & $p < 0.05$ comparando animales Ob/GMS sin tratamiento (-) contra sanos sin tratamiento (-).

En el caso de resistina podemos observar una tendencia, tanto en sanos como en obesos tratados con glicina con respecto a sus controles, a disminuir la expresión del RNAm que codifica para dicha adipocina, no mostrando diferencias estadísticamente significativas (Figura 10).

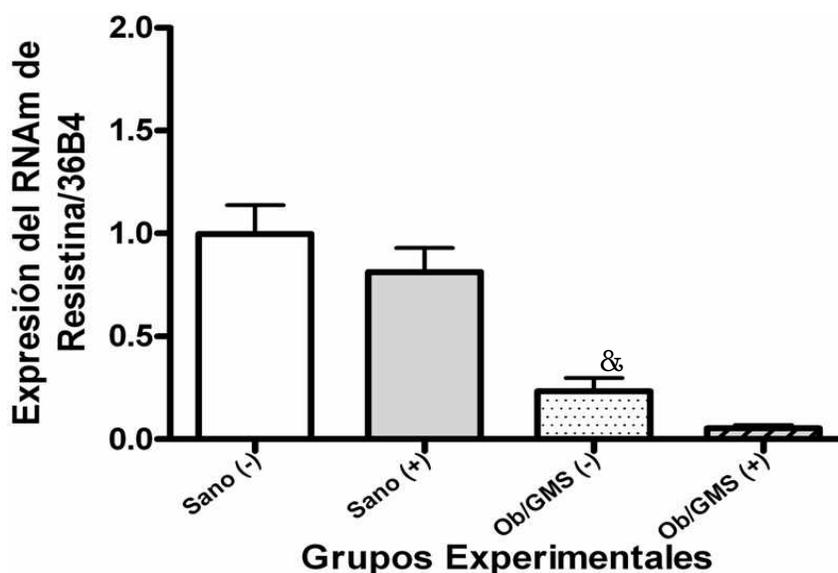


Fig. 10. Expresión del RNAm de resistina en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de resistina en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, $^{\&}p < 0.05$ comparando animales Ob/GMS sin tratamiento (-) contra sanos sin tratamiento (-).

En la Figura 11 se observan bajos niveles de expresión del RNAm de adiponectina en el tejido adiposo del grupo de ratones obesos en comparación con el grupo de ratones sanos. En los grupos tratados con glicina, sanos y obesos, se observa una tendencia a aumentar la expresión de adiponectina, pero no existen diferencias estadísticamente significativas.

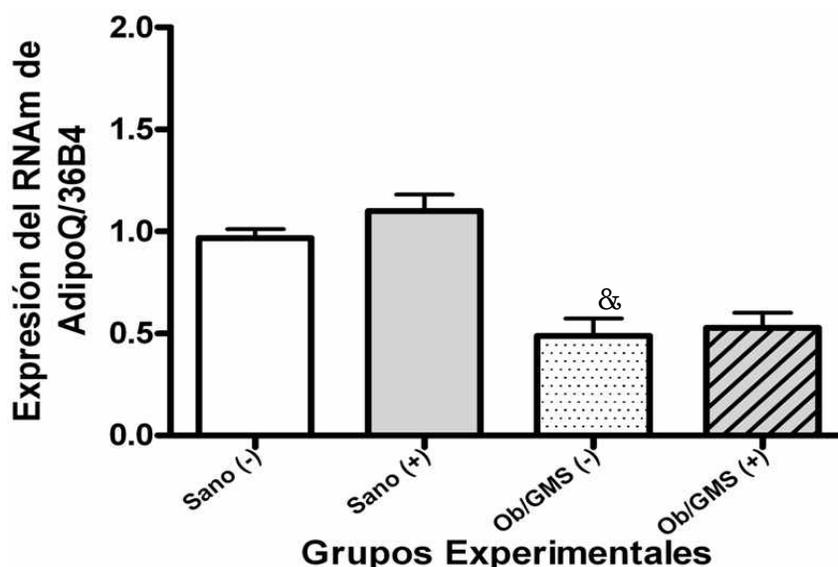


Fig. 11. Expresión del RNAm de adiponectina en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de adiponectina en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, [&] $p < 0.05$ comparando animales Ob/GMS sin tratamiento (–) contra sanos sin tratamiento (–).

En la expresión de PPAR- γ hay similitud con la expresión de adiponectina en cuanto a que existe una tendencia a aumentar en los ratones obesos con glicina, sin haber diferencias estadísticamente significativas. Pero si hay un claro aumento estadísticamente significativo en el caso de los ratones sanos tratados con glicina en comparación con su control (Figura 12).

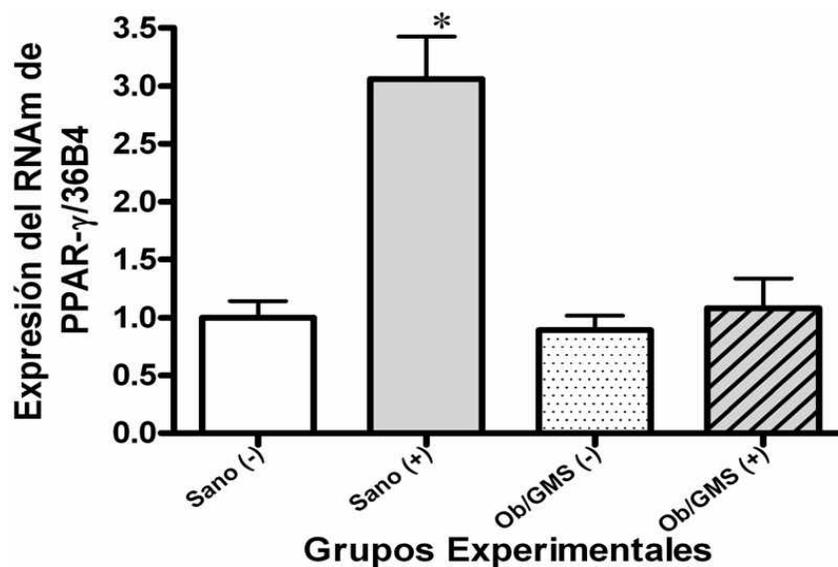


Fig. 12. Expresión del RNAm de PPAR- γ en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de PPAR- γ en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, * $p < 0.05$ comparando animales tratados con Gly (+) contra no tratados (-).

Respecto a la leptina podemos observar un aumento de su expresión en el caso de los ratones obesos, a diferencia de los ratones sanos que tienen baja expresión. El tratamiento con glicina tiende a disminuir la expresión de leptina en ratones obesos aunque no hay diferencias estadísticamente significativas (Figura 13).

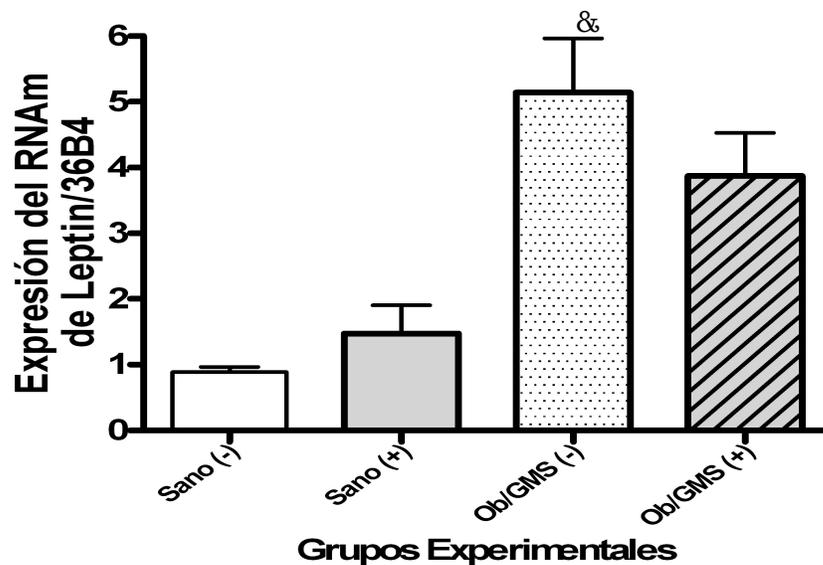


Fig. 13. Expresión del RNAm de leptina en tejido adiposo gonadal. Después de 30 días de tratamiento con glicina (0.1 g/kg) se cuantificó el nivel de expresión de leptina en ratones sanos y obesos por RT-PCR en tiempo real, que se normalizó con la expresión del RNAm de la proteína ribosomal 36B4. Los resultados representan el promedio \pm S.E.M. de 6 determinaciones independientes, $^{\&}p < 0.05$ comparando animales Ob/GMS sin tratamiento (–) contra sanos sin tratamiento (–).

8.- DISCUSIÓN

Durante la última década acrecentó la importancia del tejido adiposo al demostrarse que funciona como órgano endocrino, capaz de participar en la regulación del metabolismo mediante la secreción, por los adipocitos, de moléculas conocidas como citocinas o adipocitocinas, entre las que destacan el TNF- α , IL-6, resistina, leptina y adiponectina.

En general, estas moléculas desempeñan un papel destacado en los procesos de inflamación y en la etiología de la obesidad, que es considerada una enfermedad crónica de etiología multifactorial, asociada con mayor riesgo de morbimortalidad. De ahí la importancia de buscar mejores estrategias para su prevención y tratamiento.

El empleo de nuevos modelos animales experimentales para el estudio de la obesidad es de gran relevancia. En general, un modelo animal puede representar un aspecto o subtipo de obesidad y por tanto, hay que extremar las precauciones cuando se desea extrapolar los resultados al humano.

En este estudio se encontró que los ratones Ob/GMS presentan obesidad severa en su etapa adulta. Paradójicamente, este aumento de peso no se debe al aumento en el consumo de alimento, sino todo lo contrario; estos ratones son obesos pero hipofágicos, siendo similar en este aspecto a otros modelos experimentales de obesidad, como los ratones fat/fat o los ratones tub que presentan ganancia de peso gradual y son hipofágicos (Chua y Leible, 1997; Naggert, 1996). Los ratones Ob/GMS presentaron obesidad a partir de los 3 ½ meses de edad comparados con los ratones sanos, tal como fue reportado en estudios previos (Almanza, 2007).

Como se sabe, la gran mayoría de los sujetos obesos presentan intolerancia a la glucosa. En el modelo empleado en este estudio se encontró que, por los resultados de las pruebas de tolerancia a la glucosa, los ratones manifiestan un desequilibrio en el metabolismo de la glucosa desde los 3 ½ meses de edad, debido a que se encontraron niveles altos de glucosa en sangre. Como se sabe, la insulina estimula la captación de glucosa ya que favorece la

traslocación de los transportadores GLUT, encargados de transportar la glucosa a todas las células. Por consiguiente, altos niveles de glucosa en sangre son el resultado de una deficiencia en la acción de la insulina (Le y Zick, 2001). A los 4 ½ meses de edad se manifiesta resistencia a la insulina, siendo similar este fenómeno al presentado en otros modelos animales de obesidad, como son los ratones db y fa que también presentan resistencia a la insulina. Además, los ratones Ob/GMS son ratones muy dóciles, hecho similar al comportamiento de los ratones db y fa que presentan una disminución en su actividad física (Chua y Leible, 1997).

Después de los 30 días de tratamiento con glicina (4 ½ meses de edad) se observó un comportamiento similar en la prueba de tolerancia a la glucosa al observado a los 3 ½ meses de edad, acentuándose la intolerancia a la glucosa en los ratones obesos sin y con tratamiento. Sin embargo, los ratones sanos tratados con glicina presentaron una disminución en su pico máximo de glucosa, como resultado de la liberación de insulina inducida por la glicina, de acuerdo con los resultados reportados previamente por Almanza (2007). Sin embargo, en los ratones obesos tratados con glicina no se observó el mismo comportamiento de los ratones sanos tratados. Esto puede deberse al daño que se les provocó con el glutamato monosódico en el hipotálamo, ya que no sólo se daña al núcleo arcuato, relacionado directamente con el consumo de alimento y con la regulación del peso corporal, sino también se alteran otros núcleos, como el paraventricular, el ventromedial y el dorsomedial (Horvath *et al.*, 2004), provocando que otras moléculas como la insulina, que tiene sus receptores en la misma región hipotalámica donde están los de leptina, no interactúe con su receptor y la señalización se evite por bloqueo del transporte de glucosa en todas las células.

Con respecto a los parámetros bioquímicos de los ratones obesos (triglicéridos, TGO, TGP, colesterol y A1C) no se encontraron cambios significativos a los 3 ½ meses de edad con respecto al control delgado. Es decir, los niveles plasmáticos estuvieron dentro de lo normal. Después de 30 días de

tratamiento con glicina las actividades enzimáticas de las dos transaminasas (TGO y TGP) en los ratones obesos se encontraron disminuidas, aunque dentro de rangos normales, indicándonos que el tratamiento con este aminoácido aparentemente no afecta el funcionamiento del hígado, riñones y corazón o no es tóxica durante este periodo de tratamiento. Los demás parámetros no se modificaron con el tratamiento de glicina, siendo muy similares en ratones sanos y obesos.

En cuanto a los niveles de expresión, después del tratamiento con 0.1 g/kg de glicina durante 30 días se encontró una disminución estadísticamente significativa en la expresión de TNF- α , una proteína asociada a la inflamación, tanto en ratones sanos como en obesos. Esta disminución se puede atribuir al posible mecanismo de acción de la glicina, ya que, al interactuar con su receptor (GlyR), aunque no se ha encontrado en adipocitos, produce una cascada de señalizaciones en la que se inhibe al NF-kB y por consiguiente se expresa adiponectina, una citocina antiinflamatoria. Los receptores del TNF- α , p55 y p75, se expresan en distintas cantidades en casi todas las células (Schreyer *et al.*, 1998). La unión de TNF- α a su receptor activa las cinasas de la familia IKK, que produce la fosforilación del inhibidor del factor nuclear-kB (IkB), activando al factor nuclear-kappaB (NF-kB), principal mediador de las acciones de TNF- α .

La adiponectina desempeña un papel en la regulación de la respuesta inflamatoria, básicamente a través de la reducción de la expresión de TNF- α (Ouchi *et al.*, 1999). La adiponectina presenta una porción globular similar a la de TNF- α , lo que explicaría la inhibición de la expresión y acción de TNF- α por adiponectina y viceversa (Haluzik M *et al.*, 2004).

La transcripción del gen de la adiponectina y su secreción están reguladas por múltiples factores, entre los cuales la insulina, al menos en ratón, estimula su síntesis y liberación. Los bajos niveles de expresión de adiponectina observados en la obesidad podrían explicarse por la resistencia del adipocito a la acción de la insulina (Yamauchi *et al.*, 2001). Como podemos recordar, los

ratones Ob/GMS presentaron resistencia a la insulina, de acuerdo a lo reportado por Almanza (2007), esta condición estaría contribuyendo a la disminución en la expresión del gen de adiponectina. A pesar de que no se encontraron cambios significativos en la expresión de adiponectina en los ratones tratados con glicina, se logra apreciar una tendencia a aumentar dicha expresión, tanto en sanos como en obesos tratados con glicina.

De igual forma, en otros modelos animales de obesidad se ha reportado disminución en la expresión del RNAm de adiponectina, tal como en los ratones ob/ob (Fruebis *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 2001).

Algunos autores señalan que las concentraciones de resistina se encuentran disminuidas en diferentes modelos de ratones con obesidad genética (ob/ob, db/db y tub/tub), en comparación con ratones normales (Way *et al.*; 2001). Otros estudios detectaron niveles bajos de RNAm de resistina en ratones obesos (Silha *et al.*, 2003). A pesar de que algunos trabajos afirman que en modelos de obesidad hay disminución en las concentraciones plasmáticas y de expresión de resistina, hay otros que indican que la expresión de resistina se encuentra incrementada en la obesidad (Savage *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Vidal-Puig y O'Rahilly, 2001).

En este trabajo se encontró que los ratones Ob/GMS presentan bajos niveles de expresión de resistina lo que correlaciona con lo ya descrito por Way y col. (2001). El tratamiento con glicina presentó una ligera tendencia a aumentar la expresión de resistina, aunque no fue significativa.

Existen factores como la insulina y la glucosa que regulan la expresión del gene de resistina. Se ha sugerido a la insulina como un inhibidor importante de la producción de resistina (Haugen *et al.*, 2001; Shojima *et al.*, 2002), lo cual puede explicar por qué se encuentran bajos los niveles del RNAm de resistina en presencia de resistencia a la insulina. De igual forma el TNF- α elevado en la obesidad inhibe la expresión del gen de resistina (Fasshauer *et al.*, 2001).

Es de interés señalar que la hormona del crecimiento (GH) parece inducir la expresión del gen de resistina en el tejido adiposo en ratas (Delhanty *et al.*, 2002).

La GH es importante en la regulación del crecimiento corporal a lo largo de la vida, su deficiencia causa alteraciones en la composición corporal. La deficiencia de esta hormona genera un incremento en los depósitos de grasa, tanto subcutánea como visceral. En el caso del modelo de ratones obesos podemos sugerir que la GH se encuentra disminuida ya que estos ratones presentan una alta cantidad de tejido graso visceral y subcutáneo, además de presentar una disminución del crecimiento en comparación con los ratones sanos. Al presentar una disminución en su crecimiento, es probable que la hormona del crecimiento en los ratones Ob/GMS se encuentre disminuida y, por consiguiente, no hay inducción en la expresión del gen de resistina.

El receptor de leptina ObRb presenta un elevado nivel de expresión en neuronas de varios núcleos hipotalámicos, como el arcuato, el paraventricular, el ventromedial y el dorsomedial (Elmqvist *et al.*, 1998), todos implicados en la regulación del comportamiento alimentario y del balance energético. El núcleo arcuato no sólo es el que expresa una mayor cantidad de ObRb, sino además es el principal sitio de acción de la leptina en el hipotálamo. Comprende dos poblaciones de neuronas blanco: la primera forma parte de la vía orexigénica (inductora del apetito) y está constituida por neuronas que liberan neuropéptido Y (NPY) y por neuronas productoras de AGRP (AGouti-Related Protein). La segunda forma parte de la vía anorexigénica (inductora de saciedad) y comprende neuronas secretoras de proopiomelanocortina (POMC), así como neuronas que liberan CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript).

En los ratones *ob/ob* y *db/db* coexisten niveles aumentados de NPY/AGRP con niveles disminuidos de POMC/CARTY, por lo que estos ratones presentan hiperfagia (Harvey *et al.*, 2003). Esto nos indicaría que el modelo empleado en este trabajo, al presentar altos niveles de expresión de leptina, tendría que

inhibir la vía orexigénica, que es la vía inductora del apetito y estimular la anorexigénica, inductora de la saciedad; por tanto, los ratones Ob/GMS son hipofágicos. Pero son obesos debido a que hay un desequilibrio en el metabolismo de lípidos y lo poco que comen estos animales se almacena en el tejido adiposo. El tratamiento con glicina en los ratones obesos provoca una disminución significativa en la expresión de leptina.

También se ha encontrado que en individuos obesos, aunque presentan un alto nivel de leptina, desarrollan de forma simultánea una resistencia a la acción de la hormona (Friedman *et al.*, 1998), posiblemente a causa del funcionamiento inadecuado de las cascadas de señalización intracelular asociadas con el receptor.

Además de todo esto, se sabe que la leptina y la insulina se regulan mutuamente. Así, la leptina inhibe la producción de insulina en las células β del páncreas (Seufert *et al.*, 2004), mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito y como los ratones Ob/GMS presentan resistencia a la insulina, ésta podría estar disparando la señal para que se exprese más leptina. Esto se debe a que la insulina es capaz de aumentar la producción de leptina (Rentsch y Chiest, 1996), lo que podría significar que la hiperinsulinemia crónica produce lipogénesis y, con esto, aumento de la masa grasa total y aumento en los niveles de leptina (Widdowson *et al.*, 1998).

Otros investigadores demostraron, tanto en roedores como en humanos, que el TNF- α , citocina producida por las células del sistema inmune y por el tejido adiposo, estimula la expresión y por tanto la producción de la leptina (Sarraf *et al.*, 1997; Zumbach *et al.*, 1997). Esto explicaría por qué el tratamiento con glicina en el modelo obeso produce una contundente disminución de la expresión de TNF- α y una fuerte tendencia a disminuir la expresión de leptina.

La expresión de IL-6 por el tejido adiposo ha sido implicada en la producción de resistencia a la insulina (Kern *et al.*, 2001), condición que se manifiesta en los ratones Ob/GMS, además de una alta expresión de IL-6 en el TA.

El mal funcionamiento congénito de la leptina o de su receptor ObRb, cursan con obesidad, infertilidad y alteraciones en el crecimiento (Montague *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998). Estas características mencionadas anteriormente son similares a los ratones Ob/GMS por lo que se pensaría que hay un mal funcionamiento en la leptina o su receptor.

En la obesidad, el incremento en la expresión de TNF- α induce la expresión de IL-6 y leptina en los adipocitos (Imura *et al.*, 1997; Sarraf *et al.*, 1997). El tratamiento con glicina en ratones obesos disminuye la expresión de IL-6 y este fenómeno se explica como resultado de la expresión de TNF- α , la cual promueve la expresión de IL-6. En este trabajo la glicina disminuye significativamente la expresión de TNF- α y por consiguiente la de IL-6.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten entrever que existe una relación muy estrecha entre las diferentes citocinas y por esto la difícil cuantificación de cada una de ellas ya que existe un fenómeno que se llama cascada de citocinas en el cual la acción de una citocina en su célula diana, hace que esta célula secrete una o más citocinas, que de nuevo al actuar en sus células diana, induce la secreción de nuevas citocinas.

Por otro lado, el tejido adiposo, además de su clásica función como el principal almacén de grasa corporal, tiene una gran diversidad de funciones endocrinas y metabólicas recientemente descubiertas, que son reguladas por insulina, hormonas contra reguladoras y por una gran variedad de moléculas que se producen en el mismo tejido adiposo.

Por su parte, la obesidad, resultado de un incremento de la masa grasa, con aumento en el tamaño y número de células adiposas, se caracteriza también por incremento en la expresión génica de citocinas, hormonas, factores de crecimiento y otras moléculas. Estos cambios en la función endocrina del TA, subsecuentemente promueven alteraciones locales y sistémicas que conducen a las patologías asociadas con el incremento en la masa grasa o hipertrofia. Aunque la red de vías neuroendocrinas que regulan la homeostasis energética

no se conoce del todo, lo que ahora se sabe nos permite vislumbrar la diversidad de funciones en las que participa la célula adiposa.

En este trabajo se demostró que el tratamiento con glicina disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, con una tendencia a aumentar adiponectina (adipocina antiinflamatoria). Estos resultados permiten sugerir que la glicina tiene efectos antiinflamatorios en un modelo de obesidad, constituyendo una alternativa para modular el cuadro inflamatorio característico de este padecimiento.

9.- CONCLUSIONES

- La glicina disminuye la expresión del RNAm de TNF- α en ratones sanos y obesos.
- La glicina disminuye la expresión del RNAm de IL-6 en los ratones obesos, sin presentar efecto en los ratones sanos.
- El tratamiento con glicina disminuye de manera no significativa la expresión del RNAm de resistina en ratones obesos.
- La glicina tiende a aumentar la expresión del RNAm de adiponectina en ratones sanos y obesos, aunque sin significancia estadística
- La expresión del RNAm de PPAR- γ aumentó en ratones sanos tratados con glicina, no mostrándose cambios en la expresión del RNAm de los ratones obesos.
- El tratamiento con glicina no afecta la expresión del RNAm de leptina en ratones sanos ni en obesos.
- Los parámetros bioquímicos no se modificaron en ratones sanos ni en obesos con tratamiento.

10.- PERSPECTIVAS

Los trastornos metabólicos como la obesidad, que a su vez constituyen factores de riesgo como la hipertensión y la diabetes, ocupan un lugar importante en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. El empleo de la glicina como un nutriente antioxidante protector celular es muy alentador, sin embargo, es importante entender el mecanismo de acción por el cual la glicina tiene efectos antiinflamatorios. Una vía importante en la que la glicina pudiera tener su acción es mediante el factor nuclear-kappaB (NF-kB), un factor de transcripción. Ya que diversos estímulos como las adipocinas (TNF- α), al actuar sobre receptores de membrana, activan una serie de enzimas y proteincinasas que en ultimo termino producen la activación de las cinasas IKKa y IKKb que fosforilan al Ikb. El Ikb fosforilado se transforma en una estructura susceptible de ser degradada por el proteosoma 26s, con lo cual el NF-kB libre se activa, puede ser translocado al núcleo y comenzar la transcripción de una amplia gama de genes, entre ellos, 27 citocinas y quimicinas, moléculas de adhesión, receptores de citocinas entre otras. Por esto la gran importancia de entender las posibles vías de señalización en las que pudiera estar implicada la glicina con el NF-kB.

Así mismo, este conocimiento contribuye al entendimiento de la obesidad y otros padecimientos que se caracterizan por un proceso inflamatorio sistémico.

11. REFERENCIAS.

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Ed. W. B. Saunders. E.U.A. 1991.
- Almanza-Pérez JC. Influencia de la glicina sobre la expresión de adipocinas de ratón: estudio in vivo e in vitro. Tesis de Maestría. 2007.
- Alvarado-Vázquez N, Zambudio P, Cerón E, Vanda B, Zenteno E, Carvajal-Sandoval G. Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp. Bioch. Physiol. Part. C.* 2003; 134:521-527.
- American Diabetes Association Translation of the Diabetes Nutrition Recommendations for Health Care Institutions (ADTNRRHI). *Diabetes Care.* 1999; 22:S46-8.
- Anaya JM. Descripción Molecular del TNF- α . *Reumatología.* 2003; 19:112-120.
- Barquera S, Tovar-Guzman V, Campos-Nonato I, Gonzalez-Villalpando C, Rivera-Dommarco J. Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: an epidemiologic transition analysis. *Arch. Med. Res.* 2003; 34, 407-414.
- Campos-Sepúlveda E, Ayala-Guerrero F, Rubio-Poo C, Roman-Ramos R. Neonatal monosodium glutamate increases ethanol susceptibility effects in adult mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2002; 45: 44-46.
- Chua S and Leibel R. Obesity genes: molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes Reviews.* 1997; 2-7.
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998; 392: 398-401.
- Cruz M, García-Macedo R, García-Valerio Y, Gutierrez M, Medina-Navarro R, Duran G, Wachter N, Kumate J. Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in Mexican children. *Diabetes Care.* 2004; 27: 1451-1453.

- de Mello Ma, de Souza CT, Braga LR, dos Santos JW, Ribeiro IA, Gobatto CA, Glucosa tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* 2001; 33:63-71.
- Delhanty PJ, Mesotten D, McDougall F & Baxter RC. Growth hormone rapidly induces resistin gene expression in white adipose tissue of spontaneous dwarf (SDR) rats. *Endocrinology.* 2002; 143:2445-2448.
- Dolnikoff M, Martín-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Internat. J. Obes.* 2001; 25:426-433.
- Du XL, Edestein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldeberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Spl glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 97:12222-12226.
- Eleftheriour F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinol.* 2003; 144: 3842-3847.
- Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1998; 395: 535-547.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M & Paschke R. Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001; 288:1027-1031.
- Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Gutiérrez R, Casamitjana R, Vendrell J. Plasma levels of the soluble fraction of Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and insulin resistance. *Diabetes* 1998; 47:1752-62.

- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395: 763-770.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 2005-2010.
- Haffner S. Management of Dyslipidemia in Adults with Diabetes. *Diabetes Care*. 1998; 21:160-78.
- Haluzik M, Parizkova J, Haluzik MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res*. 2004; 53: 123-9.
- Harvey J, Ashford ML. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacol*. 2003; 44: 845-854.
- Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA & Trayhurn P. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters*. 2001; 507 105-108.
- Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1997; 30:671-4.
- Hodgkinson AD, Sondergaard KL, Yang B, Cross DF, Miiward BA, Demaine AG. Aldose reductase expression is induced by hyperglycemia in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2001; 60:211-218.
- Horvath TL, Diano S, Tschop M. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist*. 2004; 10: 235-246.
- Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM. Differential regulation of the p80 Tumor Necrosis Factor Receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 1997; 46:451-5.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem*. 1996; 271: 10697-703.

- Imura, H, Fukara J, and Mori T. Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clin. Endocrinol.* 1997; 35: 107-15.
- Kern AP, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:E745-E751.
- Le Roith D, Zick Y: Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2001; 24: 588-97.
- Matilla B, Mauriz JL, Culebras JM, González-Gallego J. y González P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria.* 2002; 17:2-9.
- Mc Clenaghan NH, Barnett CR, O'Hare FPM, Flat PR. Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. *J Endocrinology.* 1996; 151:349-357.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis alpha, in vivo. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1997; 82:4196-4200.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997; 387: 903-8.
- Naggert J. What has Fat Got to do with Obesity? Obesity. Understanding and Treatment. Biomed Library Series. 1996.
- Nakayama D, Magami Y, Azuma T, Inokuchi H, Furukawa M, Ohyashiki J, Yoshimoto T, Mizuguchi J, Moriyasu F, Kawai K, i Hattori T. Turnover of Acinar and Islet Cells in the Pancreas of Monosodium Glutamate-Treated Obese Mice. *Obes. Res.* 2003; 11; 87-94.
- Nathan D. Some answers, more controversy, from UKPDS *Lancet.* 1998; 352:832-3.

- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules; adipocytederived plasma protein, adiponectin. *Circulation*. 1999; 100: 2473-6.
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 1304-1309.
- Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of Leptin and Obesity: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2005; 162:101-114.
- Recasens M, Ricart W, Fernandez-Real JM. Obesidad e inflamación. *Rev. Med. Univ. Navarra*. 2004; 48:49-54.
- Remke H, Wilsdorf A, Muller F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol*. 1988; 33; 223-32.
- Rentsch J, Chiest M. Regulation of the ob mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Letters*. 1996; 379: 55-59.
- Reusch JEB Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J Clin. Invest*. 2003; 112:986-988.
- Rexford S, Ahima and Jeffrey SF. Leptin. *Annu. Rev. Physiol*. 2000; 62:413-37.
- Rivera-Dommarco J, Barquera S, Campirano F, Campos-Nonato I, Safdie M, Tovar V. The epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr*. 2002; 14:113-122.
- Saltiel AR, Kahn RC. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414:799-805.
- Sánchez JC, MD, MSc., PhD. Perfil fisiológico de la leptina. *Colomb Med*. 2005; 36:50-59.
- Sánchez MF, García MR, Alarcón AFJ, Cruz LM. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta Médica de México*. 2005; 141:505-512.

- Sarraf P, Frederich RA, Turner EM, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp. Med.* 1997; 185:171-175.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes.* 2001; 50:2199-02.
- Schreyer SA, Chua SC, LeBoeuf RC. Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor- deficient mice. *J Clin. Invest.* 1998; 102:402-11.
- Schulze M, Rimm E, Shal I, Rifal N, Hu F. Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27:1680-1688.
- Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes.* 2004; 53:152-158.
- Shojima N, Sakoda H, Ogihara T, Fujishiro M, Katagiri H, Anai M et al. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes.* 2002; 51:1737-1744.
- Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur. J Endocrinol.* 2003; 149: 331-5.
- Simón E, Del Barrio AS. Leptin and obesity. *ANALES Sis San Navarra.* 2002; 25: 53-62.
- Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular Complications of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes.* 2003; 52:2867-2873.
- The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPD 33). *Lancet.* 1998; 352:837-53.

- Thomson A. The Cytokine handbook. Ed. Academic Press. 2da. Edición. E.U.A. 1994.
- Uirich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progr Horm Res.* 2001; 56:1-21.
- Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Resistin: a new link between obesity and insulin resistance?. *Clin Endocrinol.* 2001; 55:437-8.
- Wang B, Jenkisns J, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF α . *Am. J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288: E731-E740.
- Wang H, Chu WS, Hemphill C & Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in caucasians. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2002; 87:2520–2524.
- Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW et al. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by PPAR γ agonists. *J Biol. Chem.* 2001; (en prensa).
- Widdowson et al. Acute hyperleptinemia does not modify insulin sensitivity in vivo in the rat. *Hor. Met. Res.* 1998; 30: 259-262.
- Xu H, Uysal T, Becherer D, Arner P, Gökhan S, Hotamisligil GS. Altered tumor necrosis factor- α processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF- α in obesity. *Diabete* 2002; 51:1876-83.
- Yamashina S, Konno A, Wheeler MD, Rusyn I, Rusyn EV, Cox AD, Thurman RG. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr. Cancer.* 2001; 40:197-204.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* 2001; 7: 941-6.

- Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003; 6:229-40.
- Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metabolism.* 1997; 82: 4080-4082.
- Yuan SY, Ustinova EE, Wu MH, Tinsley JH, Xu W, Korompai FL, Taulman AC. Protein kinase C activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res.* 2000; 87:412-417.

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Determinación de los niveles de expresión del RNAm de adipocinas por efecto de la glicina en ratones obesos”. Con fecha Noviembre del 2007.

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor titular C

Jefe del Laboratorio de Farmacología

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

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

rrr@xanum.uam.mx

Presidente



Dra. Rebeca García Macedo

Investigador asociado C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

gamareb@yahoo.es

Secretario



Dr. Genoveva Durán Reyes

Investigador asociado D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

genodur@hotmail.com

Vocal

