



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD
Unidad Iztapalapa**

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA GLICINA INHIBE LA
ACTIVACIÓN DE
NF- κ B INDUCIDA POR TNF- α EN
ADIPOCITOS 3T3-L1**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

M. en B.E. GERARDO BLANCAS FLORES

DIRECTORES:

DR. FRANCISCO J. ALARCÓN AGUILAR

DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ

ASESOR:

DRA. REBECA GARCÍA MACEDO

México D.F., Septiembre 2012

COMITÉ TUTORAL

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Director de tesis

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

Director de Tesis

Investigador titular A

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

mcruzl@yahoo.com

Dra. Rebeca García Macedo

Asesora

Investigador asociado C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

gamareb@yahoo.es

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 “**LA GLICINA INHIBE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B INDUCIDA POR TNF- α EN ADIPOCITOS 3T3-L1.**” que presentó el M. en B.E. Gerardo Blancas Flores el día 14 de Septiembre del 2012.

Dr. Rubén Román Ramos (Presidente)

Profesor titular C

Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

rrr@xanum.uam.mx

Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda (Secretario)

Profesor asociado C

Laboratorio de Toxicología. Dpto. de Farmacología
Facultad de Medicina U.N.A.M.

drefraincampos@gmail.com

Dra. Rebeca García Macedo (Vocal)

Investigador asociado C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS.

gamareb@yahoo.es

Dr. Julio César Almanza Pérez (Vocal)

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología. Dpto. Ciencias de la Salud.

D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

julcesarmac2@yahoo.com.mx

“El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 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-2003IDPTNNN0020”.

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 y en colaboración con el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, jefe del Depto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El trabajo de investigación fue apoyado por el Fondo de Investigación en Salud número FIS/IMSS/PROT/522 y por CONACYT FIS/IMSS/621. El alumno Gerardo Blancas Flores recibió apoyo de CONACYT, número de registro 198534 y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todos aquellos quienes, de una u otra manera, me han acompañado en esta travesía.

A mi esposa

A mi amada compañera, amiga, cómplice, esposa mía. Ángeles, mil gracias por acompañarme en este proceso, por tu amor, comprensión, paciencia y fortaleza que permitieron que pudiese, no sólo trabajar, sino también llegar a buen puerto. Como en todo lo que escribo, estás siempre presente en mi mente, corazón y en el alma de estas líneas. Contigo aprendo constantemente. Amo vivir y estar contigo. Amo saber que tu compañía se extenderá mucho más allá de este período, llegando incluso a lo que hemos imaginado. Te amo vida mía, porque eres mi motivación durante no solamente la producción de esta tesis, sino durante ya doce años de vidas compartidas.

A mi hija

Quiero expresar mi agradecimiento a mi hija Sofía Fernanda, porque ella tuvo que aguantar largas horas sin la compañía de su papá, sin poder entender, a su corta edad, por qué prefería estar frente a la pantalla de la PC y no acostado y/o jugando con ella. A pesar de ello, cada vez que podíamos reunirnos, aprovechábamos hermosos momentos, en los que su sola sonrisa me llenaba de ánimo y fuerza. Gracias hija porque ahora tengo un motivo más por el cual luchar y seguir en el camino correcto.

A mi familia

A mi papá, José Guadalupe Blancas, a mi mamá, María Flores y a mis hermanas, Sonia y Rocío, quienes participaron en mi formación. Sin ustedes esto no habría sido posible. No puedo dejar pasar esta oportunidad sin decirles que les amo y que gracias a ustedes estoy donde estoy. ¡Gracias a ustedes!

A mis suegros, Reina Uribe y Pedro Martínez, por su cariño, comprensión, apoyo y paciencia. Por quererme y cuidarme como uno más de sus hijos.

A mis cuñados, Cesar Martínez, Iván Martínez y Erick Martínez, por su cariño y aprecio, por valorarme. Por sus conversaciones y compañía. Por cada día preguntar cómo iba mi tesis.

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 por el impulso y la motivación que me ha brindado.

A mis amigos

A mis compañeros de UAM-I, con quienes compartí largas conversaciones, en las que muchos de nuestros experimentos se vieron reforzados o reconfigurados. Gracias compañeros, porque con ustedes hicimos escuela y más que letras, ratones, células, etc. Me quedo con el gran cariño mostrado por cada uno de ustedes.

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 CMNSXXI. IMSS, en particular al Laboratorio de Bioquímica

Por su apoyo para la realización de esta tesis. ¡Gracias!

Al Hospital de Bioquímica Salvador Subirán

Por el apoyo brindado por el Dr. José Luis Ventura, la Dra. Irma Mitre y en particular, gracias al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por todo su apoyo que de forma desinteresada me brindó. Mi más sincero agradecimiento. Sin duda usted es una de las personas que más ha contribuido en mi formación profesional.

A Dios

Dejo al final, por ser el más importante de los agradecimientos, a Dios, por trazar el camino por el que mis pies avanzan y en el que mi mente y corazón viven la felicidad.

A todos y todas ustedes, mil gracias...

INDICE GENERAL

PÁGINAS

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Índice de tablas.....	ii
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1.- Introducción.....	5
1.1.- Factor de transcripción NF- κ B.....	6
1.2.- Modulación farmacológica de los procesos inflamatorios.....	9
1.3.- Glicina.....	11
1.3.1 Glicina y su efecto antiinflamatorio.....	11
1.3.2 Uso de glicina en seres humanos.....	12
2.- Antecedentes.....	17
3.- Justificación.....	18
4.- Hipótesis.....	19
5.- Objetivos.....	20
5.1.- Objetivo general.....	20
5.2.- Objetivos particulares.....	20
6.- Diseño experimental.....	21
6.1.- Cultivos celulares.....	21
6.1.2.- Preparación de los extractos citosólicos y nucleares de fibroblastos 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.....	21
6.1.3.- Cuantificación de proteína nuclear y citosólica.....	23
6.1.4.- Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	23

6.1.5.- Western Blot.....	25
6.1.6.- Extracción del RNA de los adipocitos y cuantificación de la expresión de los RNA's mensajeros por RT-PCR.....	25
6.1.7.- Oxidación de proteínas Oxi-Blot.....	28
6.1.8.- Análisis estadístico.....	28
7.- Resultados.....	29
7.1.- La glicina disminuye la translocación de NF- κ B al núcleo.....	29
7.2.- Señalización de I κ B- α por glicina y TNF- α	31
7.3.- La glicina promueve la translocación de NF- κ B al núcleo en células 3T3-L1.....	33
7.4.- Glicina y TNF- α difieren en su patrón de degradación de I κ Bs.....	34
7.5.- ¿La glicina y el TNF- α activan el mismo complejo NF- κ B?.....	36
7.6.- Modulación de la expresión génica de adipocinas por glicina en adipocitos diferenciados 3T3-L1.....	37
7.7.- La glicina disminuye la oxidación de proteínas en células tratadas con TNF- α ..	39
8.- Discusión.....	41
9.- Conclusión.....	48
10.- Perspectivas.....	49
11.- Referencias.....	50

Abreviaturas

A1c: Hemoglobina glicada

IL-10: Interleucina 10

GMS/Ob: Ratones obesos inducidos con glutamato monosódico

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

I κ B- α : Inhibidor κ B- α

I κ B- β : Inhibidor κ B- β

I κ B- γ : Inhibidor κ B- γ

IL-6: Interleucina 6

DT2: Diabetes tipo 2

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IL-1: Interleucina 1

IL-8: Interleucina 8

IL-1 β : Interleucina 1 beta

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

COX-2: Ciclooxygenasa 2

FLA2: Fosfolipasa A2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

GlyR: Receptor de glicina

IFN- γ : Interferón gamma

DMEM: Medio MEM modificado por Dulbecco

SFB: Suero fetal bovino

MIX: Metilhidroxibutilxantina

DX: Dexametasona

EMSA: Ensayo de retardo de movilidad electroforética

RT: Transcripción en reversa

cDNA: DNA complementario

DNPH: 2,4-Dinitrofenilhidrazina

TFA: Ácido trifluoroacético

Índice de figuras

Figura 1. Efectos de la glicina (10 mM) sobre la activación de NF- κ B inducido por TNF- α (5 ng/mL) en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1.....	30
Figura 2. Efecto de la glicina (10 mM) sobre el I κ B- α en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1.....	32
Figura 3. Efecto de TNF- α 5 ng/mL y glicina 10 mM sobre la activación de NF- κ B, en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1.....	33
Figura 4. Western Blot de I κ B- α , β y γ de la fracción citoplasmática de células 3T3-L1 tratadas con 5 ng/ml de TNF- α y con 10 mM de glicina.....	34
Figura 5. Composición de las subunidades del NF- κ B en células 3T3-L1 después del estímulo con TNF- α y glicina.....	36
Figura 6. Efecto de la glicina en la expresión del RNAm de adipocinas.....	37
Figura 7. Efecto de la glicina en la oxidación de proteínas con y sin estímulo de TNF- α	39

Índice de tablas

Tabla 1. Primers de las adipocinas y gen de normalización (36B4).....	27
------------------------------------------------------------------------------	----

Resumen

Numerosos compuestos naturales que poseen propiedades quimiopreventivas o quimioprotectoras son de importancia vital en el manejo de patologías con un componente inflamatorio. Dichas propiedades suelen atribuirse a su actividad antioxidante o antiinflamatoria. La glicina posee actividad quimioprotectora debido a que reduce eficazmente los niveles séricos de citocinas proinflamatorias y aumenta los niveles de citocinas antiinflamatorias en células 3T3-L1. Disminuye significativamente el porcentaje de hemoglobina glicada (A1c), la sensibilidad a estímulos proinflamatorios e incrementa la expresión de interleucina 10 (IL-10) en monocitos. Una dieta suplementada con glicina disminuye el estrés oxidativo y aumenta la actividad de enzimas antioxidantes en ratas sometidas a shock hemorrágico. Recientemente, se ha demostrado que la glicina disminuye la expresión y secreción de adipocinas proinflamatorias en ratones obesos inducidos con glutamato monosódico (GMS/Ob).

Se ha postulado que estos efectos pueden ser explicados por una reducción en la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B). NF- κ B es un factor de transcripción esencial para la respuesta inflamatoria. Hasegawa et al. (2011) reportaron una reducción de NF- κ B por empleo de la glicina. En este sentido, la presente investigación se centró en estudiar la influencia de la glicina sobre la vía del NF- κ B en cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos.

Para evaluar el efecto de la glicina en la activación del NF- κ B, sobre los inhibidores de este factor de transcripción (I κ B's), sus subunidades y la expresión de adipocinas, las células fueron tratadas con TNF- α 5 ng/mL durante 30 min (control positivo) con glicina 10 mM (30 min, 1 h y 2 h), seguido de la adición de 5 ng/mL de TNF- α (30 min), o bien sólo el pretratamiento con glicina 10 mM (30 min, 1 h, 2 h)

sin ningún otro estímulo. La glicina y el TNF- α se disolvieron en DMEM. Las células control fueron tratadas con el mismo volumen del disolvente. Las proteínas nucleares y citosólicas fueron cuantificadas a través de ensayos de EMSA, Western Blot y Oxy-Blot, mientras que la expresión de citocinas se midió por RT-PCR en tiempo real.

Los resultados muestran que el pretratamiento con glicina interfiere con la activación de NF- κ B, que es estimulada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La glicina sola estimula la activación de NF- κ B de una manera inusual, donde la degradación del inhibidor κ B- β (I κ B- β) es más importante que la de inhibidor κ B- α (I κ B- α). El pretratamiento durante 60 minutos con glicina, seguido por TNF- α , suprime la expresión de TNF- α e interleucina 6 (IL-6). Sin embargo, el tratamiento con glicina sin estimulación de TNF- α , no modificó los niveles de expresión de ninguna adipocina. Estos resultados apoyan la idea de que la glicina podría ser utilizada en el tratamiento alternativo de la inflamación crónica que se caracteriza por una elevada producción de citocinas proinflamatorias, que es una característica de la obesidad y otras comorbilidades.

Abstract

Many natural compounds that possess chemopreventive or chemoprotective properties are of vital importance in the management of diseases with an inflammatory component. These properties are attributed to its antioxidant or anti-inflammatory activity. Glycine has chemoprotective activity because it strongly reduces serum levels of proinflammatory cytokines and increased inflammatory cytokine levels in 3T3-L1 cells. Significantly reduces the percentage of glycated hemoglobin (A1c), proinflammatory stimuli sensitivity and increases the expression of interleukin 10 (IL-10) in monocytes. A diet supplemented with glycine reduces oxidative stress and increases antioxidant enzymes activity in rats subjected to hemorrhagic shock. Recently, it was demonstrated that glycine reduces the expression and secretion of proinflammatory adipokines in monosodium glutamate-induced obese mice (MSG/Ob).

It has been postulated that these effects can be explained by a reduction in the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B). NF- κ B is a transcription factor essential for inflammatory response. Hasegawa et al. (2011) reported a reduction of NF- κ B by employing glycine. In this sense, this research focused on studying the influence of glycine on the pathway of NF- κ B in cultured fibroblasts differentiated into adipocytes.

The effects of glycine in activation of NF- κ B, on the inhibitors of this transcription factor (I κ B's) and its subunits, as well as in the expression of adipokines, were evaluated in cells treated with TNF- α 5 ng/mL during 30 min (positive control), 10 mM glycine (30 min, 1 h and 2 h), followed by addition of TNF- α 5 (ng/mL, 30 min), either alone or with pretreatment with 10 mM glycine (30 min, 1 h, 2 h) without further stimulation. Glycine and TNF- α were dissolved in DMEM. Control

cells were treated with the same volume of solvent. Nuclear and cytosolic proteins were quantified by EMSA assays, Western blot and Oxy-blotting, whereas the expression of cytokines was measured by RT-PCR in real time.

The results show that pretreatment with glycine interferes with activation of NF- κ B, that is stimulated by tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The glycine alone stimulates the activation of NF- κ B in an unusual way, where degradation κ B- α inhibitor (I κ B- α) is more important than κ B- α inhibitor (I κ B- β). Pretreatment with glycine for 60 minutes, followed by TNF- α , suppresses the expression of TNF- α and Interleukin 6 (IL-6). However, treatment with glycine alone without stimulation of TNF- α did not change expression levels of any adipokine. These results support the idea that the glycine may be used in alternative treatment of chronic inflammation that is characterized by a high production of proinflammatory cytokines, which is a characteristic of obesity and other comorbidities.

1.- Introducción

El proceso inflamatorio se desarrolla como parte de los mecanismos de defensa que tienen lugar en el organismo en respuesta a diferentes estímulos, como: lesiones provocadas por traumatismos mecánicos, procesos isquémicos, agentes patógenos (virus, parásitos, bacterias), hasta la acción de diversos productos químicos. Sólo en los casos en que estos factores puedan ser eliminados por la activación de los sistemas de defensa del organismo, no se presentan visiblemente las consecuencias de un proceso inflamatorio (Ali et al., 1997). Sin embargo, cuando el organismo no es capaz de contrarrestar el proceso inflamatorio, surge un estado de inflamación crónico y de baja intensidad, el cual se ha asociado con enfermedades metabólicas del tipo de la obesidad, diabetes tipo 2 (DT2), hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardíacas, etc. (Berg y Scherer, 2005; Lau et al., 2005; Fantuzzi, 2005).

Existen diversos compuestos endógenos que participan y regulan la respuesta inflamatoria. Dentro de estas sustancias las más estudiadas y las más importantes son las citocinas (Xing et al., 1999) y los radicales libres (Nathan y Hibbs, 1993), entre otros.

Las citocinas se dividen en proinflamatorias y antiinflamatorias. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), se encuentran dentro del grupo de las citocinas que poseen propiedades proinflamatorias (Beutler, 1990), y pueden ser inducidas en los procesos inflamatorios, atribuyéndose a estas citocinas un papel protagónico y determinante en el desarrollo de la reacción inflamatoria (Vassalli, 1992). A pesar del importante papel que les ha sido atribuido al TNF- α e IL-6 en la fisiopatología de la reacción inflamatoria, no son los únicos mediadores

responsables de este proceso, ya que no basta su simple inhibición para lograr revertir el desarrollo de un proceso inflamatorio (Brandtzaeg et al., 1991).

En este sentido, resulta de gran relevancia el papel que desempeñan los factores de transcripción nuclear, que son los encargados de regular la síntesis de más de 50 genes involucrados en el proceso inflamatorio (Baeuerle, 1998). El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es uno de los factores de transcripción más importantes que está regulando de manera directa al proceso inflamatorio.

1.1 Factor de transcripción NF- κ B

Existen diversas patologías en las cuales está presente el proceso inflamatorio. En ellas existe una desregulación en la expresión de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. La complejidad de este proceso puede atribuirse a la inducción de la expresión de un vasto número de proteínas con diversas acciones que, en conjunto, inducen eventos moleculares y celulares que diferencian al tejido normal del inflamado. La característica principal que distingue a los genes que son activados en las enfermedades inflamatorias es que su expresión puede ser inducida por citocinas como el TNF- α e IL-6, entre otros agentes proinflamatorios. Al interactuar con los receptores de la superficie celular, TNF- α e IL-6 activan una forma citoplasmática del NF- κ B (Baeuerle, 1998; Fox, 2000; Boone et al., 2002), activando más de 50 genes relacionados con la inflamación (Baeuerle, 1998; Hayden y Ghosh, 2004).

El NF- κ B está particularmente preparado para la defensa en aquellas condiciones que atenten contra la vida (infecciones virales y bacterianas o estrés físico) y se encuentra en el citoplasma de casi todas las células (Baldwin, 1996; Gloire et al., 2006).

En el tejido crónicamente inflamado, en el que los estímulos patogénicos externos parecen estar ausentes, TNF- α e IL-6 actúan como inductores endógenos primarios de NF- κ B. Cuando las células son expuestas a TNF- α , una cascada de eventos conduce a la fosforilación y subsecuente degradación de sus inhibidores, por lo que NF- κ B es liberado para entrar en el núcleo, en donde activa la expresión de genes (Baldwin, 1996). Estos complejos citoplasmáticos que son capaces de efectuar una translocación nuclear son conocidos como la familia de transcripción NF- κ B/Rel. Esta incluye a NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, y c-Rel (Chen et al., 1999; Karin y Ben-Neriah, 2000). Muchos miembros de esta familia (con excepción de RelB) pueden "homodimerizarse" y también formar heterodímeros entre ellos. La forma activada de NF- κ B que más prevalece es un heterodímero que consiste en una subunidad p50 o p52 y una p65, la cual contiene dominios de transactivación necesarios para la inducción de genes (Baldwin, 1996; Beinke y Ley, 2004).

La expresión de proteínas de NF- κ B puede proveer especificidad por sitios y eventos en respuesta a estímulos particulares. Las proteínas p50 y p65 desempeñan un papel fundamental en la producción constitutiva de IL-6 en los fibroblastos sinoviales en la artritis reumatoide (Miyazawa et al., 1998), mientras la activación de p65 por trombina regula la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) en células endoteliales (Rahman et al., 1999). Los heterodímeros p50 y p65 están íntimamente involucrados en la activación de genes proinflamatorios inducida por interleucina 1 (IL-1) o TNF- α en monocitos humanos, y estos efectos son bloqueados por las citocinas antiinflamatorias IL-10 (Schottelius et al., 1999) y adiponectina.

Estas diferencias, junto con múltiples variaciones en los sitios de enlace semejantes a NF- κ B que interactúan con ciertos hetero y homodímeros de NF- κ B, permiten a las células responder al ambiente externo en el tiempo adecuado y con los genes estrictamente relacionados con ese estímulo (Baldwin, 2001).

El NF- κ B existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada a proteínas reguladoras llamadas inhibidores de κ B (I κ B), de los cuales las más importantes son I κ B- α , I κ B- β , e I κ B- γ (Chen et al., 1999). La fosforilación de I κ B, un paso importante en la activación de NF- κ B, está mediada por un complejo de proteínas cinasas llamado IKK. El complejo IKK contiene al menos tres subunidades, que incluyen las cinasas IKK- α e IKK- β (también llamadas IKK-1 e IKK-2, respectivamente) (Zandi et al., 1998) y la subunidad reguladora IKK- γ (Saitoh et al., 2002). La activación de IKK inicia la fosforilación de I κ B- α en el extremo amino terminal que contiene residuos de serina. I κ B- α fosforilado es entonces ubiquitinizado, lo que lo convierte en un blanco fácil para la degradación por el proteosoma 26S (Chen et al., 1995). I κ B- α libera a NF- κ B del complejo NF- κ B-I κ B citoplasmático y las proteínas NF- κ Bs se translocan al núcleo, donde se unen a elementos específicos en las regiones promotoras de los genes diana, donde activan a sus genes blanco. IKK también fosforila a I κ B- β e I κ B- γ (Baldwin, 2001; Baeuerle y Henkel, 1994; Chen y Greene, 2004).

NF- κ B es eficientemente activado en sitios de inflamación en diversas enfermedades y puede inducir la transcripción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, e interleucina 8 (IL-8), quimiocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), ciclooxigenasa 2 (COX-2), etc. (Yamamoto y Gaynor, 2001; Karin y Ben-Neriah, 2000; Tak y Firestein, 2001). En la artritis reumatoide NF- κ B es sobre-expresado, y su actividad puede

aumentar el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de mediadores proinflamatorios, tales como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , etc. (Han et al., 1998; Aupperle et al., 1999).

1.2. Modulación farmacológica de los procesos inflamatorios

Como se ha expresado anteriormente, la inflamación es un proceso multicausal y multifactorial, por lo que el estudio de los agentes capaces de inhibir este fenómeno ha llevado al desarrollo de fármacos que actúan a diferentes niveles.

Los esteroides constituyen un grupo muy importante, ya que inhiben de manera eficaz la inflamación cualquiera que sea la causa, en un tiempo relativamente breve, y actúan a través de la inducción de la síntesis de proteínas, como las lipocortinas, que a su vez, inhiben la actividad de la fosfolipasa A2 (FLA2), por lo que se impide la liberación de los mediadores proinflamatorios lipídicos. También son capaces de inhibir la COX-2 por activación de receptores glucocorticoides citoplasmáticos los cuales pueden regular la transcripción de dichas enzimas. Además pueden inhibir la síntesis de citocinas (TNF- α e IL-1) así como la expresión de sus receptores. Estos agentes desempeñan un papel importante como anti-inflamatorios, por la capacidad que tienen para inhibir el reclutamiento de leucocitos y monocitos-macrófagos así como la producción, por parte de las citocinas, de sustancias quimiotácticas y otros factores que intervienen en el proceso inflamatorio (Wozniacka y Sysa-Jedrzejowska, 2001).

También se ha descrito que esta familia de compuestos estimula la síntesis del inhibidor del factor de transcripción nuclear NF- κ B por un mecanismo que consiste en la capacidad de estos compuestos de inducir la expresión de I κ B- α , para aumentar la retención citosólica de NF- κ B. Sin embargo, otros mecanismos

involucran la represión de la ruta NF- κ B mediada por los glucocorticoides. Por ejemplo, la dexametasona puede reprimir la expresión de IL-6 y la transactivación dependiente de p65 en fibroblastos endoteliales de ratón, sin variar los niveles de las proteínas I κ B o la actividad de NF- κ B de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Yamamoto y Gaynor 2001). No obstante su efecto antiinflamatorio potente, éstos compuestos presentan numerosos efectos tóxicos. Por ejemplo, insuficiencia renal aguda, síndromes similares a la reactivación de artritis reumatoide, hipertensión arterial, hiperglucemia etc. (Marks, 1992).

Se sabe que varias sustancias antioxidantes son capaces de suprimir o prevenir los procesos inflamatorios mediante inducción o prolongación de la vida media de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, o el secuestro de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el proceso, hechos que en su conjunto limitan la producción de radicales libres de oxígeno (Conner y Grisham, 1996).

Una fuente importante de productos con importancia farmacológica lo constituyen los productos naturales, minerales y, en tal sentido, la búsqueda de principios activos o compuestos químicos con posible efecto antiinflamatorio, también ha estado dentro de las prioridades de quienes investigan en este campo (Bremner y Heinrich, 2002).

Una gran variedad de sustancias naturales y sintéticas poseen actividad quimiopreventiva o quimioprotectora. Esta actividad suele atribuirse a sus propiedades antioxidantes o antiinflamatorias, como es el caso de la glicina.

1.3 Glicina

1.3.1 Glicina y su efecto antiinflamatorio

La glicina es el más simple de los aminoácidos, ligeramente tóxico y no esencial; como tal, es parte constitutiva de las proteínas. Ha sido bien caracterizada en la médula espinal como un neurotransmisor inhibitorio que facilita el flujo de cloro a través del receptor acoplado al canal de cloro dependiente de glicina como ligando (GlyR), favoreciendo la hiperpolarización de la membrana plasmática. Tiene efectos similares inhibitorios en varios tipos celulares, incluyendo las células de Kupffer, macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos, disminuyendo su sensibilidad a los estímulos proinflamatorios (Wheeler et al., 1999; Matilla et al., 2002). Bajo condiciones fisiológicas los niveles de glicina en humanos oscilan entre 200-400 $\mu\text{mol/L}$ (Zhong et al., 2003).

En estudios *in vitro* se ha corroborado la capacidad de la glicina para inhibir la producción de $\text{TNF-}\alpha$ y del anión superóxido en macrófagos alveolares (Wheeler y Thurman, 1999). Además de corroborar este efecto, Spittler y colaboradores encontraron que la glicina suprime la expresión de $\text{IL-1}\beta$ e incrementa la de IL-10 en monocitos aislados, confirmando los efectos inmunosupresores de este aminoácido (Spittler et al., 1999). En estudios realizados en animales de laboratorio la glicina ha mostrado efectos antiinflamatorios potentes ante ciertos estímulos. Se demostró que una dieta enriquecida con 5% de glicina disminuye las lesiones hepáticas y la mortalidad en un modelo de choque endotóxico en ratas, a la vez que evita la elevación sérica de $\text{TNF-}\alpha$ (Ikejima et al., 1996). En este mismo modelo se observó que la administración de 5% de glicina en la dieta durante 4 semanas disminuye la inflamación pulmonar neutrofilica, en comparación con animales controles que

consumieron 5% de caseína en su dieta (Wheeler et al., 2000). Además, otros estudios en modelos animales han encontrado que la glicina protege al intestino, al riñón y al pulmón de la lesión por isquemia-reperfusión, que es un tipo de lesión donde se considera que los neutrófilos desempeñan un papel importante en la producción del daño endotelial (Omasa et al., 2003; Lijima et al., 1997; Jaeschke y Smith, 1997). También se han encontrado que la glicina disminuye el efecto nefrotóxico, la hipoxia y la producción de radicales libres inducidos por la ciclosporina A (Zhong et al., 1998).

No se sabe con exactitud como actúa la glicina, pero se considera que los efectos inhibitorios se llevan a cabo por medio de los mecanismos de señalización en células que expresan a su receptor. A nivel hepático, en un modelo de sepsis en ratas por ligadura y punción del ciego, se encontró que la glicina (0.6 mmol/Kg), administrada 1 h por vía intravenosa conservó la función hepática, probablemente al disminuir un 80% la producción de TNF- α , medida a las 5 horas. Además, la glicina evitó totalmente la mortalidad de los animales al día 10, que en el grupo control era del 50% (Yang et al., 2001). En modelos animales experimentales con asma, una dieta suplementada con glicina disminuyó el estrés oxidativo, aumentó la actividad de enzimas antioxidantes y disminuyó la expresión de NF- κ B y de la sintasa del óxido nítrico, ambos asociados con la inflamación en esta enfermedad (Rahman y MacNee, 2000). Curiosamente se ha reportado que la glicina y otros aminoácidos, interfieren en la activación de NF- κ B mediada por TNF- α en la línea celular THP1 (Hasegawa et al., 2011; Hasegawa et al., 2012).

1.3.2 Uso de glicina en seres humanos

En el ser humano la glicina se ha utilizado desde hace más de 50 años como solución de lavado en intervenciones quirúrgicas (Nesbit y Glickman, 1948). Como suplemento se administra en forma de polvo blanco de sabor ligeramente dulce, fácilmente soluble en agua. También ha sido utilizada en forma parenteral como complemento de aminoácidos en la alimentación parenteral total y como un antiácido. En México, se ha empleado para el manejo adicional de la diabetes mellitus debido a su capacidad para disminuir la glicación no enzimática de proteínas (Carvajal et al., 1995). En este último estudio, 38 pacientes adultos con diabetes tomaron glicina durante un lapso variable (2 a 57 meses) a dosis de 20 g/día disuelta en líquidos, sin experimentar efectos adversos y obteniendo una disminución de la hemoglobina glicada.

En un estudio reciente se reportó el efecto de la glicina sobre la reestenosis después de angioplastia coronaria; un total de 111 pacientes recibieron glicina por vía oral dos veces al día durante 6 meses (Khan et al., 2006). Si bien la glicina no modificó la proporción de pacientes con reestenosis, tampoco se observaron efectos adversos atribuibles a este aminoácido. Entre el año 1996 y 1999 se estudiaron 33 pacientes con esquizofrenia resistentes a tratamiento, a quienes se les administró glicina por vía oral por 6 semanas a dosis de 0.8 g/Kg/día. En este experimento se observó una reducción importante en los síntomas psiquiátricos y sólo en 3 pacientes hubo náusea y vómito como posibles efectos adversos (Heresco-Levy et al., 1999; Heresco-Levy et al., 1996).

En otro trabajo se estudió a un paciente de 8 años de edad con diagnóstico de acidemia isovalérica, al cual le administraron glicina por vía oral a dosis de 250 mg/Kg/día, asociado a L-carnitina a dosis de 100 mg/Kg/día, por un periodo de 21 días (Fries et al., 1996). El tratamiento fue bien tolerado por el paciente y, como se

esperaba, incrementó la excreción urinaria del ácido isovalérico. También se han estudiado los efectos benéficos de la glicina (2 mg/Kg/día por 7 días) sobre la memoria y atención de 30 adolescentes y adultos jóvenes. Los autores encontraron una mejoría en la memoria y atención, sin efectos adversos (File et al., 1999).

En un estudio aleatorizado doble ciego se utilizó la glicina en 200 pacientes con menos de 6 horas de haber sufrido un evento isquémico cerebral (Gusev et al., 2000). Se administró glicina o placebo (0.5 a 2 g/día) sublingual por 5 días. Los resultados sugirieron que la glicina puede proteger contra la expansión del daño cerebral que generalmente se presenta después de una apoplejía, el efecto se acompañó de una tendencia en la disminución de la mortalidad a los 30 días y mejoró significativamente la evolución clínica. Se confirmó el perfil seguro de la administración de glicina, aunque como único efecto secundario se observó ligera sedación en 9 pacientes. Debido a la capacidad de la glicina de prevenir la activación de las células de Kupffer y la lesión por isquemia-reperusión, algunos investigadores llevaron a cabo un estudio clínico controlado y multicéntrico para investigar los efectos hepatoprotectores de este aminoácido (Luntz et al., 2005). Este grupo de trabajo afirma que los estudios experimentales y clínicos han demostrado que la glicina es segura para su uso en pacientes.

Basados en todos los hallazgos *in vitro* e *in vivo*, tanto en animales como en humanos, se propone a la glicina para el tratamiento de múltiples enfermedades inflamatorias en el humano. Dentro las enfermedades respiratorias se establece que hay suficiente evidencia para probar su utilidad en síndrome de dificultad respiratoria del adulto y asma (Wheeler et al., 1999). En un estudio de casos y controles realizado en 89 adultos asmáticos y 89 controles se encontró que el tratamiento con glicina incrementa la concentración plasmática de este aminoácido y se asoció con

menor riesgo de presentar asma (Fogarty et al., 2004). Los autores de este estudio apoyan un posible papel protector de la glicina al formar parte del glutatión, una molécula que regula el estado de oxidación intracelular y que puede ser importante en la patogénesis del asma, también debido a que en modelos experimentales con suplemento de glicina en la dieta se disminuye el estrés oxidativo, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, disminuye la expresión de NF- κ B y de la sintasa del óxido nítrico, estos últimos asociados con la inflamación en asma (Rahman y MacNee, 2000).

Estos estudios y muchos otros más realizados en humanos y animales no han reportado efectos nocivos por el empleo de glicina (Carvajal et al., 1995; Khan et al., 2006; File et al., 1999), sólo con efectos adversos leves, como malestar abdominal, náusea y vómito, que desaparecen al suspender su administración (Heresco-Levy et al., 1999; Heresco-Levy et al., 1996). Estos trabajos documentan el beneficio que tiene el empleo de la glicina, tanto en modelos celulares como animales, pero aún no se sabe con exactitud cuál es el mecanismo de acción de la glicina a nivel celular.

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 la función de los canales de K^+ dependientes de ATP y/o canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (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- α e induce la respuesta antiinflamatoria por la expresión de IL-10. El efecto de la glicina para modular estos procesos se relaciona con canales de glicina dependientes de cloro a

los cuales se une y provoca hiperpolarización de la membrana, regulando la entrada de calcio (Yamashima et al., 2001; Zhong et al., 2003).

Por todo lo anterior, y considerando que los pacientes con obesidad cursan con un proceso inflamatorio crónico de bajo grado de intensidad y que la glicina tiene efectos antiinflamatorios, sin efectos adversos graves, se propone el siguiente estudio para evaluar la capacidad de este aminoácido para disminuir el proceso inflamatorio relacionado con la activación de NF- κ B.

Dado que a la glicina se le ha atribuido gran variedad de efectos benéficos, el objetivo de la presente investigación fue determinar las rutas de acción de la glicina, sobre la vía del NF- κ B, un factor de transcripción determinante en la respuesta inflamatoria. Aunque previamente demostramos que la glicina puede ser útil como complemento en el tratamiento de diversos trastornos inflamatorios, como la obesidad y DT2, resulta de suma importancia conocer los mecanismos celulares por los cuales este aminoácido ejerce su acción antiinflamatoria.

2.- Antecedentes

Estudios realizados en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en colaboración con el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y de la Unidad de Bioquímica, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, se han encontrado resultados interesantes sobre el uso de la glicina. Recientemente se demostró que la glicina tiene efectos en el paciente con DT2. Los pacientes tratados con glicina presentan una disminución significativa en el porcentaje de A1c (de 8.3 a 6.9 al final del tratamiento), disminución en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias e incremento en los niveles de interferón gamma (IFN- γ) (Cruz et al., 2008).

En otro trabajo se encontró que el tratamiento con glicina provoca disminución en los niveles de expresión del RNAm de IL-6, TNF- α y resistina, en adipocitos de ratón de la línea celular 3T3-L1. Además, la glicina aumenta la producción de adiponectina, citocina que es considerada como antiinflamatoria y capaz de revertir la resistencia a la insulina y es secretada exclusivamente por el adipocito (García-Macedo et al., 2008).

En ratones GMS/Ob (obesos) se encontró que la glicina suprime la expresión de TNF- α e IL-6 en el tejido adiposo y redujo significativamente los niveles de proteína plasmáticas de IL-6, resistina y leptina (Alarcón-Aguilar et al., 2008). Los resultados sugieren que la glicina mejora el perfil inflamatorio *in vivo* a través de la activación de PPAR- γ .

3.- Justificación

Muchas patologías metabólicas, incluyendo la obesidad y la DT2, cursan con 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 mejorar el perfil inflamatorio, es el empleo de la glicina, aminoácido considerado como un nutriente antioxidante protector celular.

Es importante por lo tanto conocer si el mecanismo por el cual la glicina mejora el perfil inflamatorio es a través del NF- κ B, el cual está implicado en la expresión de citocinas proinflamatorias. Si la glicina mejora el perfil inflamatorio es probable que esto sea el resultado, al menos en parte, de la inactivación de este factor nuclear. Si se comprueba la inactivación del NF- κ B por empleo de la glicina en las líneas celulares 3T3-L1, entonces estos datos apoyarían la idea de que este aminoácido puede ser utilizado como tratamiento de los pacientes con resistencia a la insulina, obesidad y DT2, evitando la presencia de múltiples complicaciones como las mostradas por los medicamentos ya existentes.

Los resultados obtenidos contribuirán al conocimiento del proceso inflamatorio y proporcionarán el fundamento para considerar a la glicina como una alternativa para el tratamiento de dichas patologías.

4.- Hipótesis

Si la glicina disminuye el perfil inflamatorio, debe modificar la activación del NF- κ B inducida por TNF- α en células 3T3-L1.

5.- Objetivos

5.1.- Objetivo general

Demostrar la participación de la glicina en la activación del NF- κ B inducida por TNF- α en células 3T3-L1.

5.2.- Objetivos particulares

Determinar en células 3T3-L1 si la glicina afecta:

- La actividad de NF- κ B.
- Las concentraciones citosólicas de su inhibidor ($I\kappa$ B, α y β).
- Las concentraciones de los dímeros que componen al NF- κ B.
- La expresión de los RNAm de IL-6, TNF- α y adiponectina.
- La oxidación de proteínas.

6.- Diseño experimental

6.1.- Cultivos celulares

Los fibroblastos 3T3-L1, una línea celular de preadipocitos comprometida a diferenciarse a adipocitos y derivada de células embrionarias de ratón (Green y Meuth, 1974; Green y Kehinde, 1975), se sembraron y se cultivaron en cajas de Petri (5×10^6 células por caja Petri de 10 cm de diámetro) que contenían 6 ml de medio completo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), suplementado con 25 mM de glucosa, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, gentamicina 10 $\mu\text{g/ml}$ y 10% de suero fetal bovino (SFB). El cultivo se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% y el medio se cambió cada tercer día. Dos días después de alcanzar la confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos fue inducida con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM), dexametasona (DX, 0.25 μM) e insulina (0.8 μM) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina (0.8 μM), sin MIX ni DX y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio se reemplazó cada dos días con DMEM sin insulina y con 10% de SFB. Las células fueron usadas para experimentación el día 8 de diferenciación; en este día, más del 95% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, presentando una forma circular-oval con depósitos de grasa en forma de pequeñas vacuolas (García-Macedo et al., 2008; Fasshauer et al., 2001).

6.1.2- Preparación de los extractos citosólicos y nucleares de fibroblastos 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos.

Para evaluar el efecto de la glicina en la actividad del NF- κ B, los inhibidores de este factor de transcripción (κ B's) y la expresión de adipocinas, las células fueron tratadas con TNF- α 5 ng/mL durante 30 min (control positivo) con glicina 10 mM (30 min, 1 h y 2 h), seguido de la adición de 5 ng/mL de TNF- α (30 min), o bien sólo el pretratamiento con glicina 10 mM (30 min, 1 h, 2 h) sin ningún otro estímulo. La glicina y el TNF- α se disolvieron en DMEM. Las células control fueron tratadas con el mismo volumen del disolvente.

La obtención de extractos proteínicos se realizó como se describió originalmente (Dignam et al., 1983) con pequeñas modificaciones (Debaibo et al., 1993; López-Bojórquez et al., 2004; Estrada-Bernal et al., 2003). Al final de los tratamientos, las células se lavaron con 10 ml de PBS a 4°C y se colocaron en 1 ml de esta misma solución salina, raspando con espátula de plástico y transfiriendo las células a tubos Eppendorf de 1.5 ml para su centrifugación durante 5 min a 800 x g. Luego de retirar cuidadosamente la mayor cantidad posible de sobrenadante, el botón con las células fue congelado rápidamente sumergiendo la punta del tubo en un baño de hielo seco y etanol (5-10 seg). Posteriormente la muestra se descongeló en un baño de hielo (4°C), con la adición de 100 μ l de solución hipotónica (Hepes 10 mM a pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, ditiotritol 1 mM) para promover la lisis de todas las células por choque osmótico. Los núcleos fueron centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente para el análisis de los κ B's en el citoplasma. El botón de núcleos se resuspendió en 20 μ l de un amortiguador salino hipertónico (Hepes 20 mM a un pH 7.9, NaCl 400 mM, MgCl₂ 1.5 mM, glicerol al 25% v/v, EDTA 0.2 mM, ditiotritol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5 mM) para promover el intercambio iónico de las proteínas unidas electrostáticamente al DNA. La muestra se incubó con agitación suave

durante 30 min a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, los núcleos fueron centrifugados durante 20 min a 14000 x g a 4°C. Los sobrenadantes con los extractos de proteínas nucleares fueron colectados en tubos Eppendorf de 0.6 ml. Los extractos se diluyeron 1:1 con el amortiguador salino (Hepes 20 mM a un pH 7.9, KCl 50 mM, glicerol al 20% v/v, EDTA 0.2 mM, ditioneitol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5 mM). Los extractos nucleares y citosólicos se mantuvieron en congelación (-70°C) hasta realizar los ensayos. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento.

6.1.3.- Cuantificación de proteína nuclear y citosólica

Para cuantificar el contenido proteínico de los extractos nucleares y citosólicos se utilizó el método de Bradford. Éste se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante de 465 a 595 nm (Sigma).

6.1.4.- Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Previamente, se marcó radiactivamente un oligonucleótido de doble cadena con 21 pares de bases que contenía 10 bases de la secuencia consenso para el sitio de unión de NF- κ B (5'-AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG-3', Santa Cruz) con \square^{32} P-ATP (NEN, 6000 Ci /mmol) empleando a la cinasa T4 (Boehringer Mannheim) para catalizar la reacción. Se incubaron 0.5 \square l de la enzima con 1 \square l del oligonucleótido y 0.5 \square l del \square^{32} P-ATP junto con 1 \square l de la solución amortiguadora concentrada 10X y 7 \square l de agua en un tubo Eppendorf de 1.5 ml a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo calentando a 65°C durante 15 min. Se agregaron 30 \square l

de TBE 1X y la muestra se conservó en congelación hasta realizar el ensayo de retardo.

EMSA. Este procedimiento se realizó como se describió originalmente (Nabel y Baltimore, 1987; Ghosh y Baltimore, 1990) con pequeñas modificaciones (López-Bojórquez et al., 2004; Estrada-Bernal et al., 2003). Se preparó un gel no-desnaturalizante de acrilamida al 7.5% y se recorrió a 80 volts durante 1 h. La unión entre la sonda premarcada y el factor NF- κ B presente en los extractos nucleares se determinó mezclando proteína nuclear 10 μ g, poli dI/dC 1 μ g, pd (N)₆ 1 μ g y albumina sérica bovina 10 μ g, más la cantidad correspondiente de H₂O para tener un volumen final de 20 μ l. La incubación se realizó en solución amortiguadora HDKE (Hepes 20 mM a pH 7.9, KCl 50 mM, EDTA 1 mM y ditioneitol 5 mM). La sonda marcada (10-50,000 cpm) se adicionó al final para iniciar la reacción de unión. Después de 10 min a temperatura ambiente se terminó la reacción adicionando 6 μ l de una solución de ficol al 15% complementada con colorantes para electroforesis. Las mezclas de reacción se corrieron en el gel con buffer TBE 1X a 200 V. Una vez terminada la corrida, el gel se secó después de envolverlo en papel celofán dulce para secarlo (Gel Dryer Model 583, BIO-RAD) a 90°C bajo vacío (HydroTech™ Vacuum Pump, BIO-RAD) durante 1.5 h. El gel seco se colocó en un “cassette” de auto-radiografía Phosphorimager (Molecular Dynamics/GE) durante toda una noche y la imagen se reveló en un equipo Thyphon 9400 (Molecular Dynamics/GE). Para identificar las diferentes subunidades de NF- κ B se realizó el procedimiento ya mencionado, incubando los extractos proteínicos nucleares con 1 μ g de los anticuerpos contra p50 y p65 (Sta. Cruz, Sta. Cruz, Ca) durante 30 min después de la adición de las sondas κ B. Las imágenes se analizaron por densitometría.

6.1.5.- Western Blot

Para cada ensayo se utilizaron 30 μ g de los extractos de proteínas citoplasmáticas en “buffer” de muestra (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 1% v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1%, 2-mercaptoetanol 2% v/v) se incubaron a 90°C por 5 min. Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y se transfirieron a una membrana de Hybond-ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) 80 Volts 2 h. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios de ratón anti-I κ B- α (C-21), I κ B- β (C-20), I κ B- γ (M-121) (Sta. Cruz, Sta. Cruz, Ca) diluidos 1:1000 en TBS por 2 h a temperatura ambiente. Después del lavado, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de anticabra acoplado a peroxidasa (Pierce, Rockford). Las señales generadas por quimioluminiscencia se detectaron utilizando el sistema de “Super-Signal” (Pierce, Rockford, Il), exponiendo una película autoradiográfica (Kodak) a la membrana tratada con el sistema “Super-Signal”. Las señales de las manchas se cuantificaron por densitometría.

6.1.6.- Extracción del RNA de los adipocitos y cuantificación de la expresión de los RNA's mensajeros por RT-PCR

Se aisló el RNA de las células tratadas mediante el uso de TriPure, un reactivo de aislamiento (Invitrogen) (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para determinar la pureza del RNA se midió la absorbancia a 260 y 280 nm para cada muestra. Para confirmar la integridad del RNA se corrió en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. El gel se visualizó en un analizador de imágenes (BioRad,

EE.UU.). La transcripción en reversa (RT), para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, se realizó mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa del kit ImProm II (Promega) a partir de 2 μ g de RNA total. Se utilizó un volumen total de 20 μ l de reacción, la cual se incubó en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, con el siguiente programa de ciclos: 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 por calentamiento 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 y como gen de normalización se utilizó la proteína ribosomal 36B4 (Tabla 1). El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo, usando iniciadores normales de PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ l contenía 0.5 mM de oligonucleótidos mencionados previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM.

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

seg; una amplificación a 72°C por 10 seg a una rampa térmica de 20°C por seg. La adquisición de la fluorescencia se realizó de manera sencilla al terminar este ciclo de PCR.

Se realizó un programa para el análisis de temperatura de fusión (“melting”) para verificar la amplificación específica, que consiste en el seguimiento de la desnaturalización lenta del producto final de amplificación, donde se obtuvo el punto en el que la pérdida de la fluorescencia refleja la T_m del producto específico de amplificación. El programa consistió de una desnaturalización a 95°C con una rampa térmica de 20°C por seg, un realineamiento a 65°C durante 15 seg, a una rampa térmica de 20°C por seg; y por último, una desnaturalización lenta hasta 95°C a una rampa térmica de 0.1°C por seg y se cuantificó la fluorescencia de manera continua (Fasshauer et al., 2003 a,b).

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

Tabla 1. Primers de las adipocinas. Como gen de normalización se empleó una proteína ribosomal (36B4).

TNF-α	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3' R5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
IL-6	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3' R5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
Adiponectina	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3' R5'- ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
36B4	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'

6.1.7.- Oxidación de proteínas (Oxi-Blot)

Para cada ensayo se utilizaron 20 µg de los extractos de proteínas nuclear. Las proteínas de las muestras se derivatizaron con DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina) en un solución que contenía SDS al 6%, DNPH 10 mM disuelto en 10% de TFA (ácido trifluoroacético). La reacción se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se detuvo por neutralización con Tris base 2 M y glicerol al 30%. Las muestras se prepararon en la ausencia de DNPH como control. Se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida con SDS al 10% a 4°C. Se transfirió el gel a una membrana de PVDF toda la noche a 30-40 volts. Posteriormente las membranas se bloquearon en TBS-Tween con 5% de leche durante 1 h. Las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo primario (anti-DNPH 1:200). Las membranas se lavaron tres veces durante 10 min y posteriormente se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-a-IgG de ratón peroxidasa 1:10000). Las membranas se lavaron tres veces durante 10 min. Después de los lavados, a las membranas se les adicionó el sustrato quimiolumincente (Kit SuperSignal). Las membranas fueron expuestas en un fotodocumentador (Kodak). Las manchas se analizaron por densitometría.

6.1.8.- Análisis estadístico

Los ensayos de EMSA, Western blot y Oxy-blot que se muestran en este trabajo son los resultados representativos (densitometría) de al menos 3 experimentos independientes realizados en cultivos de fibroblastos diferenciados a adipocitos. Los valores de expresión se muestran como media ± S.E.M. Se utilizó

ANOVA para determinar si hay diferencias entre los grupos, complementado con una prueba de Tukey-Kramer. El análisis estadístico se realizó con el software NCSS 2000. Una $P < 0.05$ fue aceptada como estadísticamente significativa.

7.- Resultados

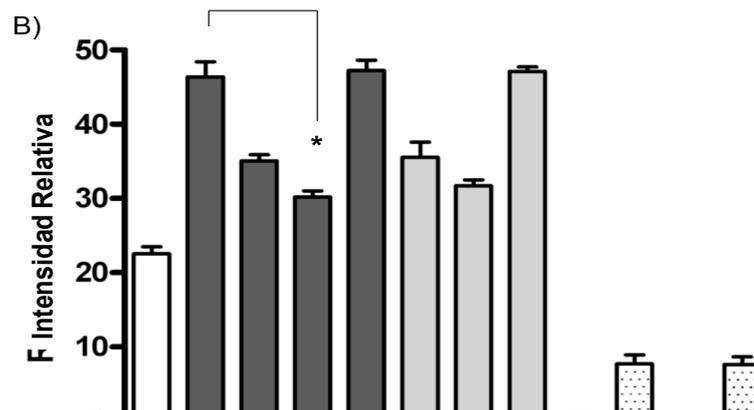
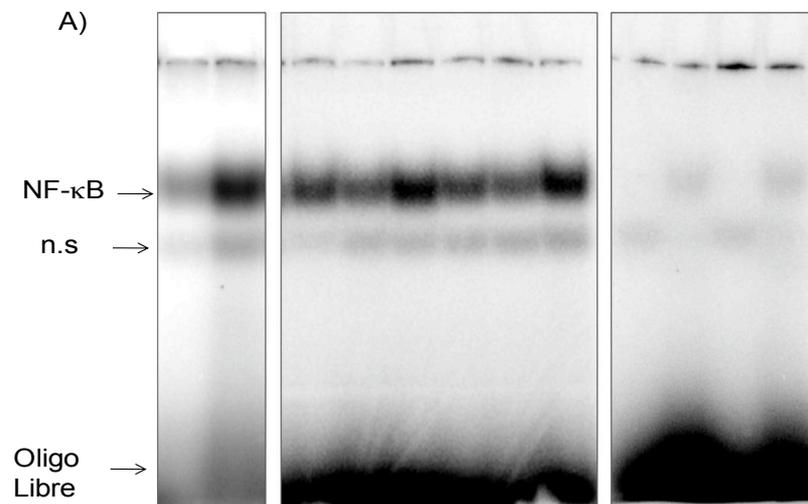
Se utilizó el aminoácido glicina ya que previamente hemos documentado su efecto antiinflamatorio al inhibir la expresión de los genes proinflamatorios. Decidimos evaluar su efecto a nivel intracelular, midiendo posibles alteraciones en la activación de NF- κ B, dado que este es el factor de transcripción principal con el que se inicia la respuesta inflamatoria.

7.1.- La glicina disminuye la translocación de NF- κ B al núcleo

Para investigar si la glicina puede modular la activación de NF- κ B inducida por TNF- α en adipocitos diferenciados 3T3-L1, las células fueron incubadas con 10 mM de glicina durante 30 min antes de la estimulación con TNF- α . Esta concentración reportado por García et al. (2008) mostró cambios significativos en el perfil inflamatorio y sin efectos adversos aparentes.

Los resultados del ensayo de retardo de movilidad electroforética para evaluar la actividad de unión de NF- κ B al DNA bajo diferentes condiciones experimentales se muestran en la Figura 1. En respuesta a TNF- α la señal de NF- κ B aumentó en un 100%. Con media hora de pretratamiento con glicina, la activación del factor de transcripción disminuye 32%, a diferencia del pretratamiento por 1 h, donde el nivel de activación de NF- κ B es menor (50% menos), comparado con el nivel basal de los controles. Este efecto desaparece a las 2 h. Para corroborar que el complejo observado correspondió a NF- κ B se empleó un exceso de competidor en frío y una

sonda mutada. Esto sugiere que el complejo es, en efecto NF- κ B. La identidad de este complejo fue confirmada en la Figura 5 cuando los anticuerpos contra las subunidades p65 y p50 retrasan la señal del complejo NF- κ B.



Glicina (min)	0'	30'	30'	60'	120'	30'	60'	120'	-	-	-	-
Glicina 10 mM	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
TNF- α 5 ng/ml (30 min)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Competidor frio	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Oligo Mutado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Figura 1. Efectos de la glicina (10 mM) sobre la activación de NF- κ B inducido por TNF- α (5 ng/mL) en adipocitos diferenciados de células 3T3-L1. A) Los cultivos fueron tratados con TNF- α solo o después de una preincubación de 30 min, 1 h y 2 h con glicina. Un tercer grupo se trató sólo con glicina en los mismos tiempos. Los extractos nucleares para cada condición se analizaron mediante EMSA. B) El histograma muestra media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El

asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al TNF- α sin glicina. * $P < 0.05$.

Es evidente que el pretratamiento con glicina (30 min y 1 h) disminuyó la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α . Sin embargo, esta caída no se observa con el simple pretratamiento con glicina (sexto, séptimo y octavo carril de la Figura 1), donde se muestra un patrón similar a los carriles tratados con glicina más TNF- α . Resultó interesante, por lo tanto, entender el efecto de la glicina a diferentes tiempos con la aparente activación de NF- κ B.

7.2.- Señalización de I κ B- α por glicina y TNF- α

Con el fin de establecer si el efecto inhibitorio de la glicina en la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α se produce a través de la vía canónica, el contenido citoplásmico del inhibidor I κ B- α se determinó por western blot (Figura 2A).

De acuerdo con los resultados de la Figura 1, donde TNF- α aumentó la actividad de NF- κ B, el contenido citoplásmico de I κ B- α se redujo en un 76% en las células tratadas con TNF- α . Cuando las células fueron pretratadas con glicina antes de la exposición a TNF- α durante 30 min I κ B- α se redujo sólo 61%. Con la adición de glicina por 1 h previa a la adición TNF- α , los niveles del inhibidor I κ B- α incrementaron; el pretratamiento con glicina por 2 h mantuvo el mismo incremento de I κ B- α . Lo que indica que la glicina disminuye la actividad de NF- κ B, aparentemente incrementando los niveles de I κ B- α , en células 3T3-L1 tratadas con TNF- α .

Al tratar las células con glicina sin estímulo de TNF- α se observó un comportamiento totalmente distinto, ya que el I κ B- α incrementó con el paso del tiempo de tratamiento y esto curiosamente no equipara lo observado en la activación

de NF- κ B por el pretratamiento con glicina (Figura 1). En todos los casos se utilizó β -actina para normalizar.

Estos resultados indican que la glicina disminuye la actividad de NF- κ B al interferir con la degradación de I κ B- α dependiente de TNF- α en los adipocitos diferenciados 3T3-L1. Curiosamente, la glicina sola provocó una disminución del contenido de I κ B- α de 26%, o sea, inferior a la provocada por TNF- α (76%) (Figura 2B). Estos cambios en I κ B- α no corresponden con el aumento de NF- κ B en la Figura 1 y sugieren que la glicina activa a NF- κ B con una degradación parcial de I κ B- α .

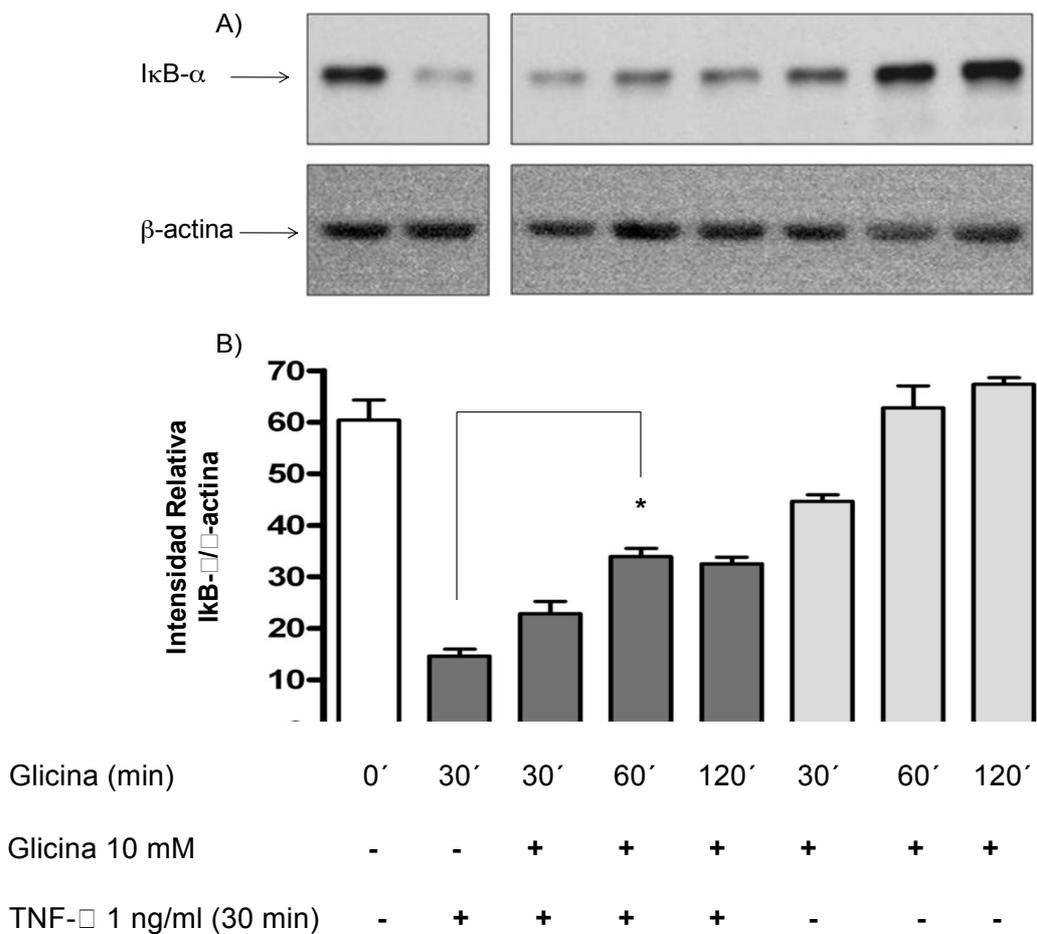
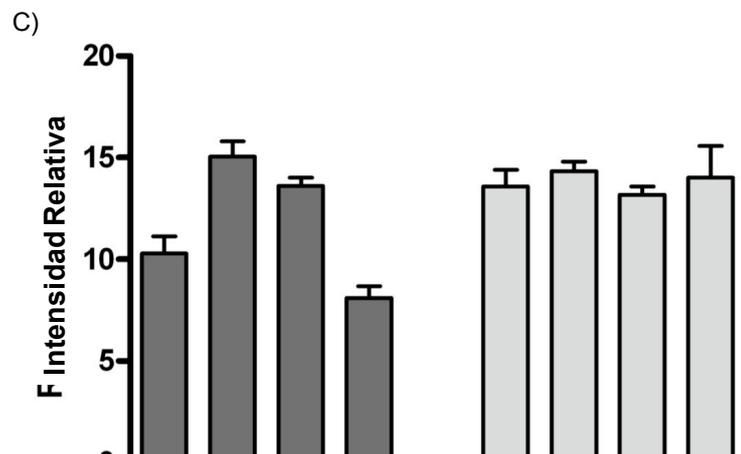
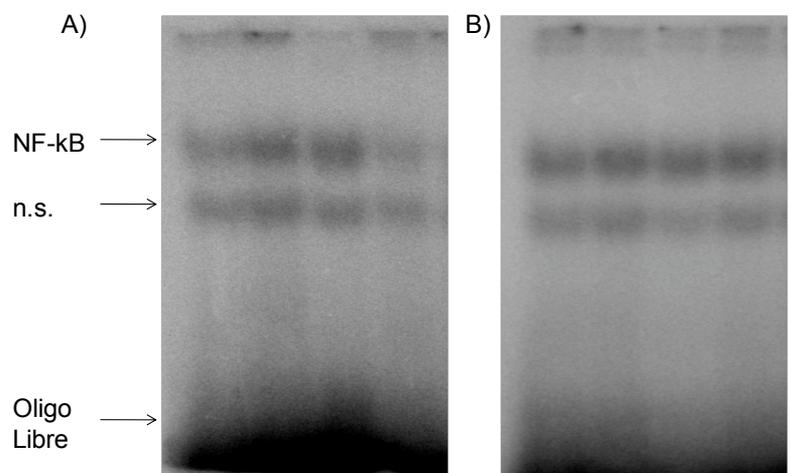


Figura 2. Efecto de la glicina (10 mM) en el contenido de I κ B- α en adipocitos diferenciados 3T3-L1. A) Las células fueron tratadas como se describe en la Figura

1. Los extractos citosólicos se analizaron mediante western blot como se describe en los materiales y métodos. B) El histograma muestra la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. * $P < 0.05$.

7.3.- La glicina promueve la translocación de NF- κ B al núcleo en células 3T3-L1

Para evaluar el efecto de la glicina sobre la actividad nuclear de NF- κ B, se realizó un tratamiento en un curso de tiempo en adipocitos con TNF- α y glicina.



Tiempo (min)	15'	30'	60'	120'	15'	30'	60'	120'
TNF- α 5 ng/ml	+	+	+	+	-	-	-	-
Glicina 10 mM	-	-	-	-	+	+	+	+

Figura 3. Efecto de TNF- α y glicina en la activación de NF- κ B en adipocitos diferenciados 3T3-L1. Las células fueron tratadas con: A) TNF- α por 15, 30 min, 1 y 2 h; B) glicina en los mismos intervalos de tiempo. Los extractos nucleares fueron analizados por EMSA. C) El histograma muestra la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes.

Como se informó anteriormente, el TNF- α induce un desplazamiento rápido y transitorio de NF- κ B al núcleo. El pico máximo se alcanzó después de 30 min y volvió a los niveles basales a las 2 h después del tratamiento (Figura 3A). En contraste, la respuesta de NF- κ B en células tratadas con glicina, se mantuvo durante todos los tiempos (Figura 3B). Este comportamiento también se observa en la Figura 1 con el tratamiento de glicina sin estímulo de TNF- α .

7.4.- Glicina y TNF- α difieren en su patrón de degradación de I κ Bs

Con el fin de caracterizar el mecanismo de acción de la glicina sobre el complejo de proteínas asociada a NF- κ B en adipocitos diferenciados 3T3-L1, se estudió el destino de las tres diferentes isoformas de I- κ B (I κ B- α , I κ B- β e I κ B- γ) en un curso de tiempo de 15, 30 min, 1 y 2 h con TNF- α (Figura 4A) o glicina (Figura 4B).

La Figura 4A muestra una degradación rápida de I κ B- α , que alcanza su nivel mínimo después de 30 min y es seguida por una recuperación a las 2 h después de la estimulación con TNF- α . En contraste, cuando se analizaron los cambios en I κ B- β , se observó una degradación continua y significativa que iban desde -37 hasta -80% después de 15 min y 2 h respectivamente. El contenido de I κ B- γ no se modificó por TNF- α en cualquiera de los puntos de tiempo analizados. La Figura 4B muestra las tasas de degradación de los tres inhibidores estimulados con glicina. Los resultados muestran que el tratamiento con glicina reduce el contenido

citoplásmico de IκB-α en un 10% a los 15 min y un 28% después de 30 min. Después de 1 y 2 h los niveles IκB-α disminuyen en un 19%. La glicina causa una disminución relativamente lenta y gradual de IκB-α que van desde -24 hasta -42% después de 15 min y 2 h, respectivamente. El contenido de IκB-α no presentó cambios en cualquiera de los diferentes puntos de tiempo. Sin embargo, la glicina induce menos degradación de ambos IκB's (α y β) en comparación con TNF-α y en consecuencia su contribución en la vía del NF-κB debe ser menor.

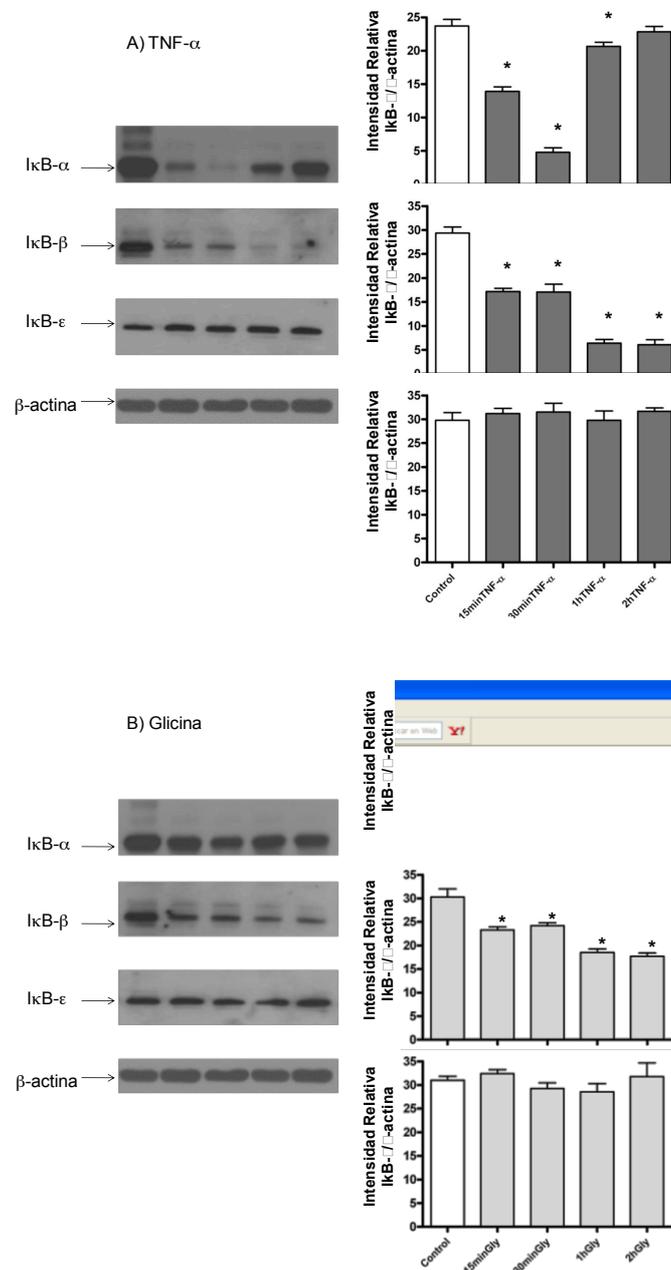


Figura 4. (A) Western blot de I κ B- α , β y γ presentes en la fracción citosólica de adipocitos diferenciados 3T3-L1 tratados con 5 ng/ml de TNF- α o con 10 mM de glicina (B). El histograma muestra la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin tratar. * P <0.05.

7.5.- ¿La glicina y el TNF- α activan el mismo complejo NF- κ B?

Para investigar la composición (homo o heterodímeros) de los complejos de translocación al núcleo de NF- κ B con unión al DNA en respuesta a glicina, se realizaron ensayos de supershift, utilizando anticuerpos contra las subunidades p50 y p65 (Figura 5).

Las pruebas se realizaron con extractos nucleares obtenidos 30 min después de la estimulación, que corresponde al pico de la actividad inducida por TNF- α . La movilidad de los complejos proteína-DNA tratados con TNF- α y/o glicina son idénticos, lo que sugiere una composición similar.

Los ensayos de supershift, confirman la similitud de los componentes de las subunidades. En ambos casos, la adición de anti-p65 redujo significativamente la intensidad del complejo NF- κ B y coincidió con la aparición de un complejo altamente retardado. Se sospecha que este complejo de baja movilidad se forma probablemente por el anticuerpo unido a la subunidad p65 (etiquetada como complejo p65). La adición de anti-p50 redujo significativamente la intensidad del complejo NF- κ B y coincidió con la aparición de un complejo de mayor movilidad electroforética. Sin embargo, este complejo tenía una señal más fuerte en los extractos nucleares de células tratadas con glicina sugiriendo que bajo esta condición más subunidades p50 son reclutadas.

En conjunto, estos resultados indican que tanto la glicina como el TNF- α promueven la translocación nuclear de NF- κ B, en los complejos que contienen subunidades p65 y p50 con un exceso de ésta última.

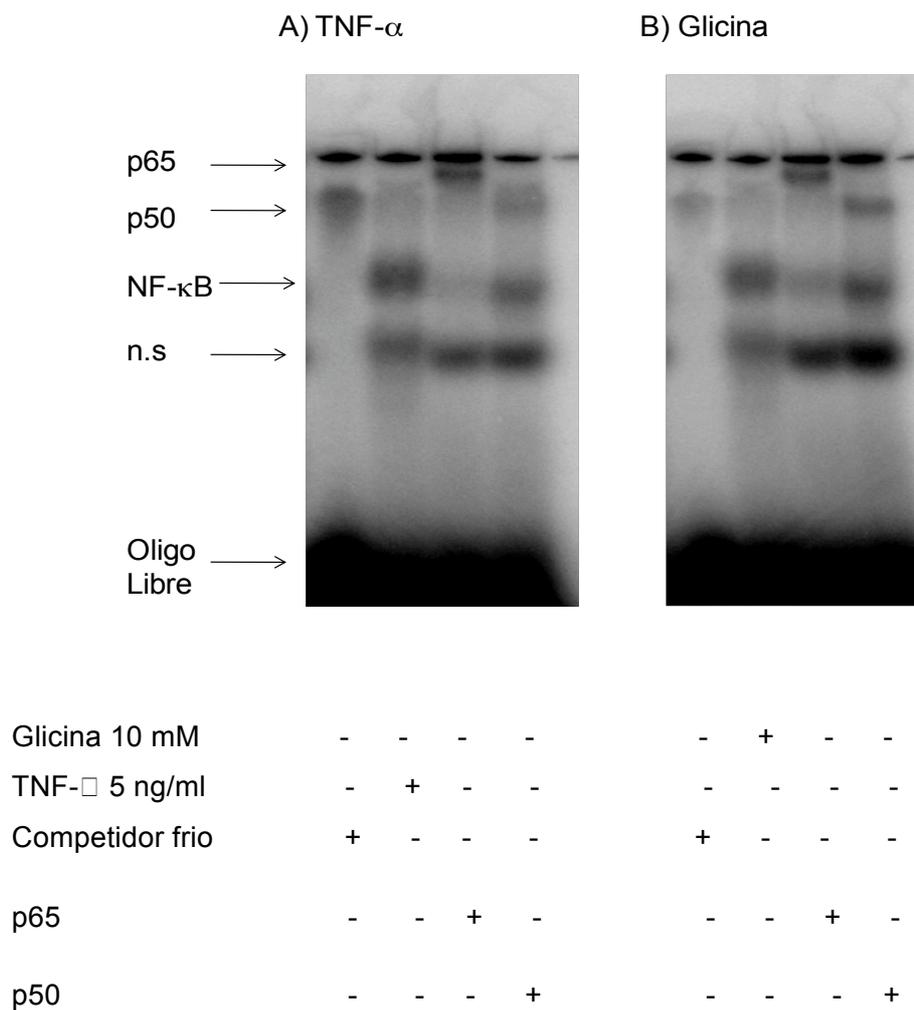


Figura 5. Composición de las subunidades del complejo NF- κ B en adipocitos diferenciados 3T3-L1 después de la estimulación con TNF- α o glicina. Los complejos con diferentes proteínas se etiquetan como inespecíficos (n.s), NF- κ B, anticuerpos anti-p50 + antígeno unido (p50) y anticuerpo anti-p65 + antígeno unido (p65).

7.6.- Modulación de la expresión génica de adipocinas por glicina en adipocitos diferenciados 3T3-L1

La Figura 6A muestra el análisis de la expresión de tres adipocinas por RT-PCR en respuesta a glicina con y sin estímulo de TNF- α . El pretratamiento durante 1 h con glicina, seguido por TNF- α , suprime la expresión de TNF- α e IL-6. La adiponectina reveló una tendencia creciente sin diferencias estadísticamente significativas. Esta disminución en la expresión de TNF- α e IL-6 se invirtió a las 2 h. Por el contrario, el tratamiento sólo con glicina sin estimulación con TNF- α no modificó los niveles de expresión de cualquiera de estas tres adipocinas en cualquiera de los tiempos de tratamiento (Figura 6B). Estos resultados indican que la interferencia mediada por glicina en la activación de NF- κ B inducida por el TNF- α se correlaciona con una reducción transitoria en los niveles de RNAm de TNF- α e IL-6.

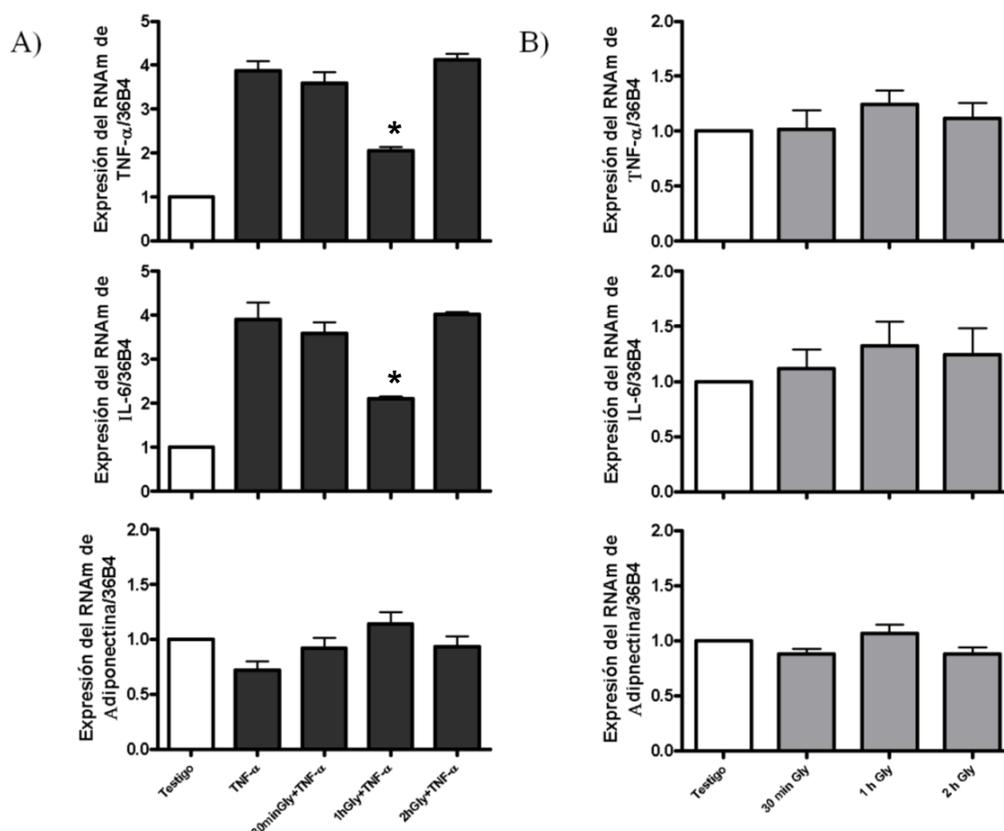
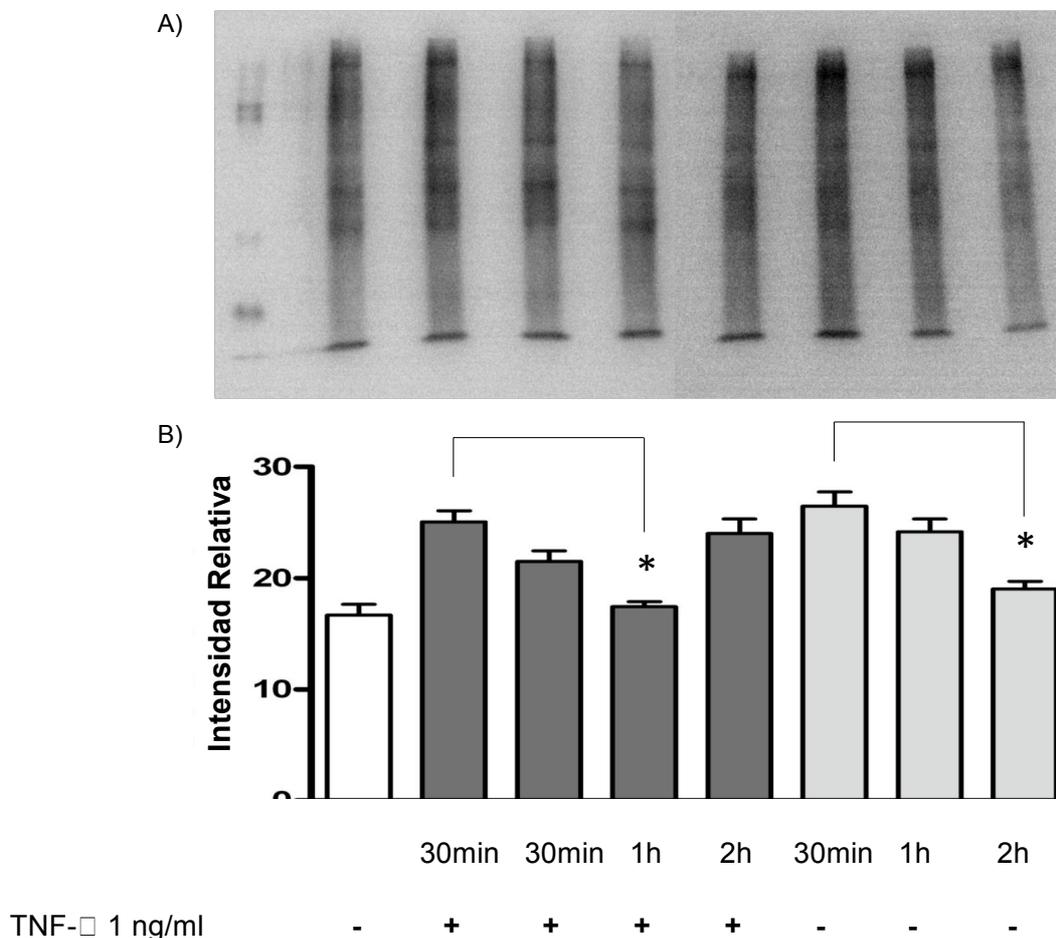


Figura 6. Análisis por RT-PCR de la expresión de adipocinas en adipocitos diferenciados 3T3-L1 tratados con glicina. A) Adipocitos diferenciados 3T3-L1 fueron pretratados con glicina durante los tiempos indicados (30 min, 1 o 2 h) antes de la estimulación con TNF- α durante 30 min. B) El mismo diseño experimental como en A se utilizó, pero sin estimulación de TNF- α . Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con el control. * $P < 0.05$.

7.7.- La glicina disminuye la oxidación de proteínas en células tratadas con TNF- α

Como la glicina es considerada un nutriente con potencial antioxidante, se evaluó la capacidad de este aminoácido para disminuir el estado de oxidación de las proteínas.



Glicina 10 mM - - + + + + + +

Figura 7. Efecto de la glicina sobre el estado de oxidación de proteínas en adipocitos diferenciados 3T3-L1. Las bandas representan el estado de oxidación de cada muestra en los distintos tratamientos. Los resultados son la media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. $*P<0.05$.

Teniendo en cuenta que la intensidad del patrón de bandas es un indicador de estado de oxidación de proteínas, se hizo evidente que el tratamiento con TNF- α aumentó la oxidación de proteínas. Curiosamente, el pretratamiento con glicina a los 30 min y 1 h causó una disminución en la oxidación de proteínas. Este efecto protector no se presentó después de 2 h de preincubación con glicina (Figura 7). Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas sólo con glicina se observó un aumento en el estado de oxidación de proteínas. Después de 30 min de tratamiento el estado de oxidación de proteínas aumentó significativamente y se mantuvo alto hasta 1 h, pero disminuyó a las 2 h.

8.- Discusión

La glicina es parte de muchas proteínas y es el más simple de los aminoácidos. En condiciones normales la concentración sérica de glicina en los seres humanos oscila entre los 200-400 μM (Zhong et al., 2003). Los seres humanos han ingerido glicina durante casi 60 años sin efectos adversos aparentes; del mismo modo, no se han reportado efectos tóxicos en una gran variedad de modelos experimentales (Carvajal et al, 1995; Khan et al, 2006; File et al., 1999; Heresco-Levy et al., 1996, 1999). La glicina se ha utilizado como un complemento en el tratamiento de la DT2 porque su administración disminuye la glicación de proteínas (Andalibi et al., 1993).

El presente trabajo ofrece una serie de datos experimentales que contribuyen al conocimiento sobre las vías de acción de la glicina a nivel celular. En particular revelan un bloqueo en la activación del factor NF- κ B. Este factor de transcripción está implicado en la expresión de una amplia variedad de genes en respuesta a citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno. Previamente nuestro grupo demostró, tanto en un modelo animal de obesidad como en adipocitos 3T3-L1, que el tratamiento con glicina reduce la expresión de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 y resistina, mientras que aumenta la expresión de adiponectina, una citocina antiinflamatoria, y de su regulador el PPAR- γ . Ya que la glicina mejora el perfil inflamatorio, tanto en animales como en cultivos celulares, se esperaría que

disminuyera la activación de NF- κ B, un regulador importante en el proceso inflamatorio.

Nuestros resultados revelan que el pretratamiento con glicina 10 mM durante 30 min y 1 h (Figura 1) antes de la estimulación con TNF- α (5 ng/ml), disminuye la activación de NF- κ B en un 32% y 50%, respectivamente. Este efecto se revierte a las 2 h. Curiosamente se ha reportado que glicina y otros aminoácidos interfieren con la activación de NF- κ B mediada por TNF- α (Hasegawa et al., 2011; Hasegawa et al., 2012).

Teniendo en cuenta que el TNF- α activa una vía canónica, múltiples explicaciones se pueden plantear en la reducción de NF- κ B observada después del tratamiento con glicina. Es posible que la glicina interfiera con la fosforilación o con la degradación dependiente de la ubiquitinación de I κ B, también podría acelerar la eliminación de las formas activas de NF- κ B desde el núcleo, o una combinación de estos mecanismos (Beinke y Ley, 2004; Basseres y Baldwin, 2006). En consecuencia, se postula que la glicina podría activar a los inhibidores de NF- κ B. Sin embargo, dado que la glicina puede hiperpolarizar la membrana celular, este efecto también podría contribuir a la reducción en la activación de NF- κ B en respuesta a TNF- α .

Como era de esperarse, la estimulación con TNF- α promueve la degradación del 76% de la I κ B- α y el tratamiento previo con glicina durante 30 min mostró una pequeña interferencia en la degradación de I κ B- α , ya que I κ B- α se redujo sólo un 61%. Con la adición de glicina por 1 h previa a la adición TNF- α , los niveles del inhibidor I κ B- α incrementaron; el pretratamiento con glicina por 2 h mantuvo el mismo incremento de I κ B- α (Figura 2). El pretratamiento con glicina redujo por la mitad a NF- κ B (Figura 1), pero tuvo un pequeño efecto sobre I κ B- α (Figura 2) en

células tratadas con TNF- α . Este fenómeno es diferente al observado en otros tipos de células expuestas a tratamientos antiinflamatorios, tales como los glucocorticoides (GC), que pueden interferir con NF- κ B (De Bosscher et al., 2003).

En linfocitos y monocitos se ha demostrado que la dexametasona, un glucocorticoide sintético, induce un incremento en la transcripción del gen de I κ B- β , un aumento en el contenido de proteína y una marcada reducción en la activación de NF- κ B (Scheinman et al., 1995).

De acuerdo con lo anterior, la glicina bloqueó la activación de NF- κ B por estímulo de TNF- α . Sin embargo, cuando se da tratamiento únicamente con glicina, sin estímulo de TNF- α , el NF- κ B se activa en los tres tiempos de tratamiento (30 min, 1 h y 2 h) (Figura 1). En contraparte, el inhibidor de NF- κ B debería degradarse en los tres tiempos de tratamiento con glicina. Sin embargo, ocurre lo contrario: el I κ B- β presenta un incremento a partir de la hora de tratamiento con glicina, sosteniéndose este efecto hasta las 2 h. Entonces la glicina inactiva y activa al NF- κ B por igual. Al parecer, cuando existe un estímulo inflamatorio como TNF- α , la glicina es capaz de inhibir a NF- κ B a través del incremento de I κ B- β . Pero cuando no existe ningún otro estímulo más que glicina, se “activa” NF- κ B e incrementa I κ B- β . Por supuesto que la activación ésta acompañada de otras señales celulares que ponen de manifiesto si esta activación lleva a una respuesta inflamatoria. Cabe la posibilidad de que la activación de NF- κ B por la glicina sea por la vía antioxidante.

Hemos examinado por separado los efectos de la glicina y TNF- α sobre la activación de NF- κ B y de sus inhibidores (I κ B- β , I κ B- α e I κ B- γ) en adipocitos diferenciados 3T3-L1. TNF- α induce una translocación rápida y transitoria de NF- κ B al núcleo (30 min) y este desplazamiento disminuye hasta las 2 h (Figura 3A). Este comportamiento es comparable a lo observado en otros tipos celulares estimulados

con TNF- α . Llegamos a la conclusión de que las células 3T3-L1 cuentan con un mecanismo de activación de NF- κ B similar a otros tipos celulares, pero cuya vía de señalización no ha sido completamente descrita. En contraste, la translocación de NF- κ B al núcleo después de la exposición con glicina se mantuvo (Figura 3B). Así, la glicina puede tener un efecto pleiotrópico.

Analizando el patrón de degradación de los inhibidores de NF- κ B (I κ B- α , I κ B- β e I κ B- γ), los resultados revelaron que la glicina difiere en su capacidad para promover su degradación y recuperación (Figura 4). TNF- α induce una degradación rápida de I κ B- α a los 30 min, una rápida recuperación después de 1 h y hasta las 2 h. I κ B- β mostró una degradación gradual, mientras que I κ B- γ se mantuvo sin cambios.

Cuando las células fueron tratadas sólo con glicina, el complejo nuclear NF- κ B con unión al DNA está siempre presente, lo que indica una activación persistente de NF- κ B en el sistema (Figura 3). Curiosamente, la presencia de NF- κ B en el núcleo correlaciona con una disminución en la degradación de I κ B- α después de 15, 30 min, 1 y 2 h de tratamiento (entre 10, 28, 19 y 19%), como se muestra en la Figura 4B.

Este hallazgo sugiere que la glicina no activa la vía canónica de una manera significativa, NF- κ B podría ser reclutado por otros I κ Bs. Una fuente probable de NF- κ B durante la estimulación con glicina podría ser I κ B- β ya que este inhibidor mostró una cinética de degradación significativa en la respuesta a glicina en un curso de tiempo de 15 min a 2 h (-24, -21, -37 y -42%) como se muestra en la Figura 4B. Todo esto concuerda con el efecto antiinflamatorio postulado para la glicina.

I κ B- β fue el único inhibidor cuya degradación en respuesta a glicina correlaciona con el NF- κ B presente en el núcleo, aunque también podría tener una

pequeña contribución I κ B- β . En conjunto, esto indica que la compleja dinámica de activación de NF- κ B comparte algunos aspectos con la activación canónica.

Se considera que I κ B- α es el clásico inhibidor citoplásmico y principal de NF- κ B (Malek et al., 2001). A pesar de que se pensaba que I κ B- α e I κ B- β eran redundantes, los resultados de I κ B- β en ratones knock-out con la sustitución de la I κ B- α han revelado diferencias funcionales después de la isquemia/reperfusión. Esta condición está relacionada con el estrés oxidativo (Chenguang et al., 2004). El mecanismo exacto responsable de la selección de qué forma de I κ B se degrada todavía se desconoce. Se ha informado que I κ B- α se degrada y sirve como una fuente importante de NF- κ B (López-Bojórquez et al., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la subunidad p65 de NF- κ B regula la localización subcelular de I κ B- α y la actividad transcripcional de los dímeros unidos a NF- κ B (Valovka y Hottiger, 2011).

De igual forma que TNF- α , glicina no tuvo ningún efecto sobre el contenido celular de I κ B- α , lo que sugiere que no participa en la activación de NF- κ B mediada por glicina. Sin embargo, todavía es posible que I κ B- α pueda ser degradada después de un tiempo de exposición.

Una de las formas más frecuentes de NF- κ B es el heterodímero p65/p50 (Hayden y Ghosh, 2004).

En los adipocitos diferenciados 3T3-L1, la incubación con glicina o TNF- α condujo a la formación de complejos similares que contenían tanto la subunidad p65 como la subunidad p50 (Figura 5A y B), lo que sugiere que ambos tratamientos conducen a complejos nucleares de NF- κ B similar. Esto quiere decir que dependiendo del tipo celular, del estímulo e incluso de las diferentes combinaciones

de homodímeros o heterodímeros de NF- κ B (de los cinco conocidos), puede translocarse al núcleo y activar o suprimir la transcripción de distintos grupos de genes que contienen el motivo κ B.

Si la glicina suprime la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α , esta reducción probablemente resultará en una disminución en la expresión de genes dependientes de NF- κ B, tales como TNF- α e IL-6 (Figura 6A). La supresión fue transitoria a pesar de que la glicina estuvo presente durante todo el experimento (2 h). Se observó una tendencia a aumentar la expresión de adiponectina, pero ésta no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, cuando glicina por si sola, activa al NF- κ B, la expresión de estas tres adipocinas no mostró cambios significativos en los diferentes tiempos de tratamiento (Figura 6B). A pesar del hecho de que la glicina y el TNF- α activan el mismo heterodímero p50/p65, las consecuencias funcionales son diferentes. Este resultado es relevante cuando se considera el potencial de la glicina como un agente antiinflamatorio, ya que, en ausencia de condiciones proinflamatorias, los niveles de citocinas no caen por debajo de los niveles basales.

La glicina es considerada como un antioxidante. En este sentido encontramos que la glicina redujo el estado de oxidación de las proteínas inducidas por el estímulo con TNF- α . Por sí misma, la glicina condujo primero a un aumento en el estado de oxidación de las proteínas, pero este efecto disminuyó después de 2 h (Figura 7). Se debe tomar en cuenta que las células control presentaron un porcentaje basal de proteínas oxidadas. La glicina provocó una pequeña condición oxidante que activa las defensas antioxidantes de las células, y esta activación puede ser responsable de la reducción del contenido de proteína oxidada a las 2 h después de la exposición con glicina. Cualquiera que sea el mecanismo antioxidante

activado por la glicina, es claramente un efecto complejo que indica una temprana condición prooxidante.

El oxi-blot en la Figura 7 indica que la glicina provoca un ambiente intracelular prooxidante. Esto es interesante porque el estrés oxidante es un conocido activador del NF- κ B en una variedad de sistemas celulares (Andalibi et al., 1993; Meyer et al., 1993; Adcock et al., 1994), incluyendo adipocitos diferenciados 3T3-L1 (Ogihara et al., 2004; Scazzocchio et al., 2009; Zhou et al., 2010). La glicina exhibió efectos benéficos transitorios, sin embargo, es necesario estudiar el efecto de este aminoácido después de largos períodos de tiempo.

El uso de la glicina en el tratamiento de la inflamación es muy alentador, sin embargo, es importante continuar con la elucidación del mecanismo exacto por el cual este aminoácido inactiva al NF- κ B.

9.- Conclusiones

1. La glicina interfiere transitoriamente en la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α .
2. La glicina por sí sola estimula la activación de NF- κ B de una manera inusual, donde la degradación de I κ B- α es fundamental.
3. La inactivación de NF- κ B por empleo de la glicina puede estar asociada con la reducción en la expresión de TNF- α e IL-6, dos citocinas proinflamatorias.
4. Al disminuir el estado inflamatorio presente en los adipocitos, la glicina redujo el porcentaje de proteínas oxidadas, corroborando su capacidad antioxidante.
5. La comprensión de este complejo proceso puede conducir al desarrollo de nuevos moduladores farmacológicos como la glicina, un aminoácido con alto potencial terapéutico para ser empleado en trastornos con un componente inflamatorio sistémico.

10.- Perspectivas

- i) Corroborar el efecto antiinflamatorio observado en este trabajo, utilizando un modelo animal que curse con un proceso inflamatorio (como el ratón GMS/Ob), para demostrar si el tratamiento con glicina disminuye la activación del NF- κ B en tejido adiposo.
- ii) Determinar si la glicina es capaz de intervenir en la inactivación de otros factores de transcripción, como la proteína activadora 1 (AP-1) que responde a diversos estímulos, entre los que se encuentran las citocinas altamente implicadas en el proceso inflamatorio; la proteína STAT también es un blanco importante en la respuesta inflamatoria producida por el desbalance de las citocinas.
- iii) Cuantificar el grado de fosforilación del inhibidor de NF- κ B (I κ B) y la participación del proteosoma durante el tratamiento con glicina.
- iv) Realizar inmunohistoquímica para detectar el comportamiento de NF- κ B en las células 3T3-L1.
- v) Determinar si los fibroblastos diferenciados a adipocitos tienen en su membrana receptores para glicina con el fin de explicar si la glicina ejerce su función directamente sobre el NF- κ B o su efecto es a través de receptores.

11. Referencias

Adcock, I.M., Brown, C.R., Kwon, O., Barnes, P.J. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 199:1518-1524.

Alarcón-Aguilar, F.J., Almanza-Pérez, J., Blancas, G., Ángeles, S., García-Macedo, R., Román, R., Cruz, M. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 599:152-158.

Ali, H., Haribabu, B., Richardson, R.M., Snyderman, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Adv. Rheumatol.* 1997; 81:1-28.

Andalibi, A., Liao, F., Imes, S., Fogelman, A. M., Lusis, A.J. Oxidized lipoproteins influence gene expression by causing oxidative stress and activating the transcription factor NF-kappa B. *Biochem. Soc. Trans.* 1993; 3:651-655.

Aupperle, K.R., Bennett, B.L., Boyle, D.L., Tak, P.P., Manning, A.M., Firestein, G.S. NF- κ B regulation by I κ B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 1999; 163:427-433.

Baeuerle, P.A., Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:141-179.

Baeuerle, P.A. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Current. Biology.* 1998; 8:R19–R22.

Baldwin, A.S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14:649-681.

Baldwin, A.S. The transcription factor NF- κ B and human disease. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:3-6.

Basseres, D.S., Baldwin, A.S. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.* 2006; 25:6817-6830.

Beinke, S., Ley, S. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 2004; 382:393-409.

Berg, A.H., Scherer, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2005; 96:939-949.

Beutler, B. The complex regulation and biology of TNF (cachectin). *Crit. Rev. Oncog.* 1990; 2:9-18.

Boone, D.L., Lee, E.G., Libby, S., Gibson, P.J., Chien, M., Chan, F., Madonia, M., Burkett, P.R., Ma, A. Recent advances in understanding NF- κ B regulation. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2002; 8:201-212.

Brandtzaeg, P., Waage, A., Mollnes, E.T., Oktedalen, O., Kierulf, P. Severe human septic shock involves more than tumor necrosis factor. In *bacterial endotoxins: cytokine mediators and new therapies for sepsis.* Wiley-Liss. Inc. 1991; 367:25-42.

Bremner, P., Heinrich, M. Natural products as modulators of the NF- κ B-pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54:453-472.

Carvajal, G., Juárez, E., Ramos, G., Carvajal, M.E. Inhibición de la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en la diabetes mellitus. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp.* 1995; 8:185-188.

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin. Chem. 1999; 45:7-17.

Chen L, Greene W. Shaping the nuclear action of NF- κ B. Nat. Immunol. Rev. 2004; 5:392-401.

Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballar, D., Maniatis, T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes. Dev. 1995; 9:1586-1597.

Chenguang, F., Qiang, L., Yulong, Z., Xiaoming, L., Meihui, L., Duane, A., Weihong, Z., Engelhardt, J.F. I κ Ba and I κ Bb possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF- κ B induction and inflammation. J. Clin. Invest. 2004; 113:746-755.

Chomczynski, P., Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Annal. Biochem. 1987; 162:156-159.

Conner, E.M., Grisham, M.B. Inflammation, free radicals and antioxidants. Nutrition. 1996; 12:274-277.

Cruz, M., Maldonado Bernal, C., Mondragón-Gonzalez, R., Sanchez Barrera, R., Wacher, N., Carvajal Sandoval, G., Kumate, J. Glycine treatment decreases proinflammatory cytokines and increases interferon- γ in patients with type 2 diabetes. J. Endocrinol. Invest. 2008; 31:694-699

Debaibo, G.S., Obeid, L.M., Hannun, Y. 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. 1993; 268: 17762-17766.

De Bosscher, K., Vanden, B.W., Haegeman, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 2003; 24:488-522.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid. Res.* 1983; 11:1475-1489.

Estrada-Bernal, A., Mendoza-Milla, C., Ventura-Gallegos, J.L., Lopez-Bojorquez, L.N., Miranda-Peralta, E., Arechavaleta-Velasco, F., Zentella-Dehesa A. NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer. Lett.* 2003; 191:239-248.

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2005; 115:911-919.

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

Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., Paschke, R. 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.* 2003a. 35:147-152.

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

File, S.E., Fluck, E., Fernandes, C. Beneficial effects of glycine (bioglycin) on memory and attention in young and middle-aged adults. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1999; 9:506-12.

Fogarty, A., Broadfield, S., Lewis, S., Lawson, N., Britton, J. Amino acids and asthma: a case-control study. *Eur. Respir. J.* 2004; 23:565-8.

Fox, D.A. Cytokine blockade as a new strategy to treat rheumatoid arthritis. Inhibition of tumour necrosis factor. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160:437-444.

Fries, M.H., Rinaldo, P., Schmidt-Sommerfeld, E., Jurecki, E., Packman, S. Isovaleric acidemia: response to a leucine load after three weeks of supplementation with glycine, L-carnitine, and combined glycine-carnitine therapy. *J. Pediatr.* 1996; 29:449-52.

García-Macedo, R., Sánchez-Muñoz, F., Almanza-Pérez, J.C., Durán-Reyes, G., Alarcón-Aguilar, F., Cruz M. Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 587:317-321.

Ghosh, S., Baltimore, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I-kappa B. *Nature.* 1990; 344:678-682.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 2006; 72:1493-1505.

Green, H., Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974; 2:127-33.

Green, H., Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.* 1975; 1:19-27.

Gusev, E.I., Skvortsova, V.I., Dambinova, S.A., Raevskiy, K.S., Alekseev, A.A., Bashkatova, V.G., Kovalenko, A.V., Kudrin, V.S., Yakovleva, E.V. Neuroprotective effects of glycine for therapy of acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2000; 10:49-60.

Han, Z.N., Boyle, D.L., Manning, A.M., Firestein, G.S. AP-1 and NF-kappa B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*. 1998; 28:197-208.

Hasegawa, S., Ichiyama, T., Sonaka, I., Ohsaki, A., Hirano, R., Haneda, Y., Fukano, R., Hara, M., Furukawa, S. Amino acids exhibit anti-inflammatory effects in human monocytic leukemia cell line, THP-1 cells. *Inflamm. Res*. 2011; 60:1013-19.

Hasegawa, S., Ichiyama, T., Sonaka, I., Ohsaki, A., Okada, S., Wakiguchi, H., Kudo, K., Kittaka, S., Hara, M., Furukawa, S. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2012; 167:269-74.

Hayden, M.S., Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes. Dev*. 2004; 18:2195-2224.

Heresco-Levy, U., Javitt, D., Ermilov, M., Mordel, C., Horowitz, A., Kelly, D. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Brit. J. Psychiatry*. 1996; 169:34-7.

Heresco-Levy, U., Javitt, D., Ermilov, M., Mordel, C., Silipo, G., Lichtenstein, M. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1999; 56:29-36.

Ikejima, K., Imuro, Y., Forman, D., Thurman, R.G. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am. J. Physiol*. 1996; 271:G97-G103.

Jaeschke, H., Smith, C.W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J. Leukoc. Biol*. 1997; 61:647-53.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol*. 2000; 18:621-663.

Khan, M., Van Der Wieken, L.R., Riezebos, R.K., Tijssen, J.G., Kiemeneij, F., Slagboom, T., Laarman, G.J. Oral administration of glycine in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. A double blind placebo controlled randomized feasibility trial evaluating safety and efficacy of glycine in the prevention of restenosis after angioplasty. *Acute. Cardiac. Care.* 2006; 8:58-64.

Lau, D.C.W., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E., Verma, S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005; 288:H2031-H2041.

Lijima, S., Shou, J., Naama, H., Calvano, S.E., Daly, J.M. Beneficial effect of enteral glycine in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J. Gastrointest. Surg.* 1997; 1:53-60

López-Bojórquez, L.N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Montes-Sanchez, D., Ventura-Gallegos, J.L., Zentella-Dehesa, A. NF-kappa B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1 beta. *Inflamm. Res.* 2004; 53:567-575.

Luntz, S.P., Unnebrink, K., Seibert-Grafe, M., Bunzendahl, H., Kraus, T.W., Büchler, M.W., Klar, E., Schemmer, P. HEGPOL: randomized, placebo controlled, multicenter, double-blind clinical trial to investigate hepatoprotective effects of glycine in the postoperative phase of liver transplantation [ISRCTN69350312]. *BMC. Surg.* 2005; 17:5-18.

Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., Ghosh, G. Ikappa B-beta, but not Ikappa B-alpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappa B dimers by masking both NF-kappa B nuclear localization sequences in resting cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:45225-35

Marks, R. Adverse side effects from the use of topical corticosteroids. Topical corticosteroids. (Eds Maibach H, Surber Ch, Basel, Karger). 1992; 170-183.

Matilla, B., Mauriz, J.L., Culebras, J.M., González-Gallego, J. González, P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. Nutr. Hosp. 2002; 17:2-9.

Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, P.A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. EMBO. J. 1993; 12:2005-2015.

Mc Clenaghan, N.H., Barnett, C.R., O'Hare, F.P.M., Flat, P.R. Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. J. Endocrinology. 1996; 151:349-357.

Miyazawa, K., Mori, A., Yamamoto, K., Okudaira, H. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappa B and CBF1. Am. J. Pathol. 1998; 152:793-803.

Nabel, G., Baltimore, D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. Nature. 1987; 326:711-713.

Nathan, C.F., Hibbs, J.B. Role of nitric oxide synthase in macrophage antimicrobial activity. Curr. Opin. Immunol. 1993; 3:65-70.

Nesbit, R.M., Glickman, S.I. The use of glycine solution as irrigating medium during transurethral resection. J. Urol. 1948; 59:121-6.

Ogihara, T., Asano, T., Katagiri, H., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., Ono, H., Fujishiro, M., Kushiya, A., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Noguchi, N., Aburatani, H., Gotoh, Y., Komuro, I., Fujita, T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. Diabetologia. 2004; 47:794-805.

Omasa, M., Fukuse, T., Toyokuni, S., Mizutani, Y., Yoshida, H., Ikeyama, K., Hasegawa, S., Wada, H. Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model. *Transplantation*. 2003; 75:591-8.

Rahman, A., Anwar, K.N., True, A.L., Malik, A.B. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Immunol*. 1999; 162:5466-5476.

Rahman, I., MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J*. 2000; 16:534-54.

Saitoh, T., Nakano, H., Yamamoto, N., Yamaoka, S. Lymphotoxin-beta receptor mediates NEMO-independent NF-kappaB activation. *FEBS. Lett*. 2002; 532:45-51.

Scazzocchio, B., Vari, R., D'Archivio, M., Santangelo, C., Filesi, C., Giovannini, C., Masella, R. Oxidized LDL impair adipocyte response to insulin by activating serine/threonine kinases. *J. Lipid. Res*. 2009; 50:832-845.

Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B., Baldwin, A.S. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappa B kinase activity and nuclear factor kappa B DNA binding. *J. Biol. Chem*. 1999; 274:31868-31874.

Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., Baldwin Jr, A.S. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. 1995; 270:283-286.

Spittler, A., Reissner, C.M., Oehler, J.R., Gornikiewicz, A., Gruenberger, T., Manhart, N., Brodowicz, T., Mittlboeck, M., Boltz-Nitulescu, G., Roth, E. Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF- α production and accelerated IL-10 expression. *FASEB. J*. 1999; 13: 563-71.

Tak, P.P., Firestein, G.S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:7-11.

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10:411-452.

Valovka, T., Hottiger, M.O. p65 controls NF- κ B activity by regulating cellular localization of I κ B α . *Biochem. J.* 2011; 434:253-263.

Wheeler, M.D., Ikejema, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R.F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M.L., Rusyn, I., Bradford, B., Thurman, R.G. Glycine; a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell. Mol. Life. Sci.* 1999; 56:843-56.

Wheeler, M.D., Rose, M.L., Yamashima, S., Enomoto, N., Seabra, V., Madren, J., Thurman, R.G. Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2000; 279:L390-L398.

Wheeler, M.D., Thurman, R.G. Production of superoxide and TNF- α from alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:L952-L959.

Wozniacka, A., Sysa-Jedrzejowska, A. Topical steroids-a new approach after 50 years. *Med. Sci. Monit.* 2001; 7:539-544.

Xing, Z., Jordana, M., Gauldie, J., Wang, J. Cytokines and pulmonary inflammatory and immune diseases. *Histol. Histopatol.* 1999; 14:185-201.

Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:135-142.

Yamashima, S., Konno, A., Wheeler, M.D., Rusyn, I., Rusyn, E.V., Cox, A.D., Thurman, R.G. Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr. Cancer.* 2001; 40:197-204.

Yang, S., Koo, D.J., Chaudry, I.H., Wang, P. Glycine attenuates hepatocellular depression during early sepsis and reduces sepsis-induced mortality. *Crit. Care. Med.* 2001; 29:1201-6.

Zandi, E., Chen, Y., Karin, M. Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science.* 1998; 281:1360-1363.

Zhong, Z., Arteel, G.E., Connor, H.D., Yin, M., Frankenberg, M.V., Stachlewitz, R.F., Raleigh, J.A., Mason, R.P., Thurman, R.G. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in the rat kidney: prevention by dietary glycine. *Am. J. Physiol.* 1998; 275:F595-F604.

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

Zhou, Q.G., Zhou, M., Lou, A.J., Xie, D., Hou, F.F., Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010; 26:775-786.