

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental
que presenta:**

Q.F.B. Fausto Sánchez Muñoz

**REGULACIÓN GÉNICA DE ADIPOCITOCINAS POR
EFECTO DE LA GLICINA EN ADIPOCITOS DE RATÓN**

Co directores:

Dr. Miguel Cruz López.

Dr. Francisco Alarcón Aguilar.

Asesora:

Dra. Rebeca García Macedo.

México DF. a 12 de diciembre del 2005

Co directores:

Dr. Miguel Cruz López. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica,
Hospital de Especialidades, CMN SXXI. macruz1@yahoo.com

Dr. Francisco Alarcón Aguilar. Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud.

Asesora:

Dra. Rebeca García Macedo. Unidad de Investigación Médica en
Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN SXXI. gamareb@yahoo.es

Jurado

Dr. Pablo Damián Matsumura Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa, Departamento de Reproducción Animal

La presente Tesis fue posible gracias al apoyo de:

El CONACYT al programa de Maestría en Biología Experimental (UAM-I 309-1) de la Universidad Autónoma Metropolitana Clave 2002-35-32 que pertenece al PIFOP-Conacyt-SEP y al anterior Padrón de Postgrados de Excelencia de CONACYT con número de Registro 309-0.

El CONACYT por la beca de maestría (176305) otorgada durante dos años.

Al Seguro Social a través del FOFOI por la beca de postgrado y apoyo para reactivos sin los que este trabajo no hubiese podido ser posible.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias
Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

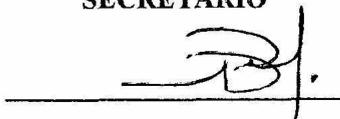
**REGULACIÓN GÉNICA DE ADIPOCITOCINAS POR
EFECTO DE LA GLICINA EN ADIPOCITOS DE RATÓN**

PRESIDENTE



Dr. Miguel Cruz López.

SECRETARIO



Dr. Pablo Damián Matsumura

VOCAL



Dra. Rebeca García Macedo.

México DF. a 12 de diciembre del 2005

Agradecimientos y dedicatorias

A mi esposa Carolina y a mi hija Luciana, por ser las principales motivaciones para el transcurso y conclusión de este trabajo.

A mis Tutores y Asesora quienes me mostraron con paciencia y sabiduría las herramientas, para la conclusión de hasta ahora, la etapa de formación mas satisfactoria de mi vida en el terreno profesional.

A mis Padre por su apoyo a través de su tolerancia y consejo.

A mi Madre por su ejemplo de lucha y perseverancia.

A mis hermanas por sus consejos y apoyo.

A todas la personas con las que sin duda compartí dudas, experimentos y puntos vista que siempre enriquecieron mi formación Javier, Gabriel, Gerardo, Julio, Eduardo, Elizabeth

A mis compañeros maestros de la maestría, que hicieron este viaje placentero.

A los compañeros de trabajo, quienes allanaron y dando la posibilidad para la conclusión de este trabajo.

Al los amigos y amigas, a quienes sin duda les debo el que haya podido vivir para esta experiencia en mi vida. *Que yo pueda ser tan amigo de ellos, como ellos lo han sido de mí.*

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
-DT2 y sus complicaciones	3
-Obesidad, resistencia a la insulina, inflamación y DT2	4
-Tratamiento de la DT2	4
-Glicina y su papel en la DT2	5
-Estreptozotocina como Modelo de estudio de diabetes	5
-Glicina	7
-Activación de los canales de cloro dependientes de glicina y la modulación de los canales de calcio	7
-Efectos de la glicina sobre los radicales libres y la inflamación	9
-Las adipocinas y su órgano secretor el tejido adiposo	10
-Adipocitocinas y la homeostasis metabólica	12
-Proteína estimuladora de acilación (ASP)	13
-Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	14
-Interleucina 6 (IL-6)	15
- Resistina	16
- Leptina	17
- Adiponectina	18
- Adipocinas y la homeostasis vascular	20
- Angiotensinógeno (AGE)	20
- Inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)	21
-Tejido Adiposo y Sistema Inmune	21
- Macrófagos en la obesidad	22
- Teoría evolutiva como explicación del proceso inflamatorio en el TAB	24
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	27

HIPÓTESIS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60

RESUMEN

La morbimortalidad a causa de la diabetes tipo 2 (DT2) representa el principal problema de salud en México. La DT2 y la obesidad son estados de inflamación crónica, como lo indica el incremento de marcadores de inflamación como son la proteína C reactiva (PCR), la interleucina (IL-6) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) cuya última consecuencia es el desarrollo las complicaciones micro y macro vasculares.

La glicina es un aminoácido con propiedades antiinflamatorias, se ha demostrado que disminuye la expresión de los mensajeros de las citocina IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y aumenta la IL-10 en células de linaje inmunitario.

Este proyecto tuvo como propósitos fundamentales evaluar el efecto de la glicina sobre la expresión de adipocitocinas pro inflamatorias de ratón: resistina e IL-6 y antiinflamatoria como adiponectina; así como evaluar el efecto protector en un modelo de diabetes experimental.

En los experimentos *in vitro* se empleó la línea celular de ratón 3T3-L1 diferenciada a adipocitos. Se evaluó el efecto de glicina bajo condiciones de resistencia a la insulina (tratamiento agudo) y después del tratamiento crónico. En los experimentos *in vivo* se emplearon ratones de la cepa CD-1 a los que se les indujo diabetes experimental mediante el tratamiento con estreptozotocina (STZ).

Los resultados mostraron que la glicina disminuye la expresión de los RNAm de IL-6 30% con el tratamiento agudo, además la expresión de resistina y adiponectina tienden a disminuir después del tratamiento crónico. También aumentó la sobrevivencia de los ratones tratados con STZ hasta un 80 %. En síntesis los efectos de la glicina tanto en el modelo animal como en los cultivos celulares sugieren que este aminoácido tiene un papel antiinflamatorio en el adipocito y protector.

ABSTRACT

Type 2 diabetes has become the main problem in Mexican health and it is the first cause of morbi-mortality in México. Obesity and Type 2 diabetes are characterized by inflammatory state with high levels of C reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), plasminogen inhibitor activator 1 (PAI-1) that promote micro and macro vascular complications.

Glycine has anti-inflammatory properties, in immune cells it represses the mRNA of pro inflammatory cytokines interleukin (IL-6) and tumor nuclear factor alpha (TNF- α) and stimulates anti inflammatory interleukin 10 (IL-10).

In this study, the effect of glycine in the mRNA expression of inflammatory adipocytokines resistin, IL-6 and anti-inflammatory adiponectin and also the protective effect were evaluated.

In vitro experiments were performed in 3T3-L1 cell line differentiated to adipocytes under chronic glycine (10 mM) exposure and in an insulin resistance model with or without glycine (10mM) and for *in vivo* experiments streptozotocin treated CD-1 mice with a daily oral dose of glycine were included.

In acute treatment, glycine repressed IL-6 mRNA 30% and after chronic treatment this amino acid showed a tendency to decrease resistin and adiponectin mRNA expression. Therefore this research suggests that glycine has anti-inflammatory effects in adipocytes.

INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades asociadas con la obesidad han aumentado dramáticamente. Esta condición predispone y se correlaciona con el incremento de la diabetes tipo 2 (DT2), la cual se ha convertido en el padecimiento de mayor incidencia y es la primera causa de muerte en personas de 55-64 años de edad (Rivera et al., 2002). En el año 2000 se calculó que existían 3.6 millones de casos con diabetes (2002). Actualmente la morbimortalidad de esta enfermedad representa el principal problema de salud en México. Además, en México durante los últimos 20 años se ha observado el incremento en la mortalidad por DT2 a edades más jóvenes (Barquera et al., 2003), debido al aumento en la obesidad y a la pérdida de sensibilidad en la insulina denominada resistencia a la insulina (Rivera et al., 2002).

DT2 y sus complicaciones

Durante el curso de la DT2 la hiperglucemia genera glucotoxicidad y afecta diversas vías de señalización por: activación de la cinasa C de proteínas (PKC), la activación de la vía del diacilglicerol, el aumento del metabolismo de las hexosas, aumento en la formación de productos avanzados de glucosilación (AGE) no enzimática y la activación de la vía de los polioles. Todos estos mecanismos coinciden con la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) producidos principalmente en la cadena respiratoria (Reusch, 2003). Además, la glucotoxicidad desencadena procesos proinflamatorios que culminan con las complicaciones microvasculares y macrovasculares, donde, las primeras ocurren en pequeños vasos y dan origen a la nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética (40% de todos los casos reportados). Cabe señalar que hasta 70% de los diabéticos sufren en el curso de la enfermedad de alguna forma clínica de neuropatía (Singleton et al., 2003). Las complicaciones macrovasculares ocurren en las venas y arterias que se asocian con un aumento en el riesgo de padecer

arteriosclerosis, misma que está estrechamente relacionada con la hipertensión arterial y algunas dislipidemias (Aronson y Rayfield, 2002).

Obesidad, resistencia a la insulina, inflamación y DT2

En la actualidad se observa un aumento en el peso corporal promedio incrementándose el número de casos de obesidad en la población mundial. Los factores ambientales-nutricionales y genéticos, participan en el desarrollo esta pandemia. Aunado a la obesidad se genera un estado de inflamación crónica que correlaciona con el desarrollo de enfermedades como la hipertensión, el síndrome metabólico y la DT2. Previo a la DT2, la obesidad se asocia con el incremento en la resistencia a la insulina; que es una falla en la sensibilidad a la misma a pesar de que se secreta mayor cantidad de esta hormona para tratar de disminuir los niveles de glucosa en sangre. Así, la hiperinsulinemia y el incremento de glucosa pueden promover la inflamación, como se ha reportado en la obesidad y la diabetes, la cual se caracteriza por el incremento en las concentraciones plasmáticas de la proteína C reactiva (PCR), interleucina 6 (IL-6) y el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), entre otros reactantes de fase aguda (Dandona et al., 2004).

Tratamiento de la DT2

Para el manejo del paciente diabético se han tomado varias alternativas de tratamiento, dependiendo de los niveles de glucosa y el grado de obesidad. En general se prescriben medicamentos hipoglucemiantes, se cambia el régimen alimenticio (mayor consumo de vegetales y menor de carbohidratos) y se recomienda aumentar la actividad física (1998; Nathan, 1998). El principal objetivo del tratamiento es disminuir o controlar la concentración de glucosa, sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan complicaciones durante la

evolución de la enfermedad, motivo por el cual muchas de las investigaciones se han enfocado a desarrollar terapias que además de corregir la hiperglucemia y modificar el metabolismo de los lípidos, también disminuyan el estrés oxidativo asociado con la generación del proceso inflamatorio en la DT2, la misma inflamación y/o la resistencia a la insulina (Haffner, 1998).

Glicina y su papel en la DT2

En diferentes modelos experimentales y pacientes con DT2, se ha observado que la glicina mejora la sensibilidad a la insulina, disminuye los niveles de HbA1c y protege contra la nefropatía diabética, aparentemente por sus propiedades antioxidantes (Zhong et al., 1999a). Con base en estos efectos, la glicina podría ser una alternativa para reducir los efectos colaterales debidos a las complicaciones de la diabetes como el estrés oxidativo o el estado proinflamatorio (Yin et al., 2002).

Estreptozotocina como Modelo de estudio de diabetes

La estreptozotocina es un fármaco altamente utilizado para inducir diabetes experimental. Los mecanismos de acción en las células β del páncreas se han investigado intensamente y actualmente están bien entendidos. La acción citotóxica de la estreptozotocina es mediada por la formación de agentes reactivos del oxígeno. La hiperglucemia inducida por la estreptozotocina se ha descrito como un modelo útil para estudiar la actividad de agentes antidiabéticos con o sin refuerzos de insulina. La estreptozotocina es un derivado 2 desoxi-D-glucosa de la N-metil-N-ditrosourea, denominado químicamente como N-{metilnitrocarbamoil}-D-glucosamina (Kamtchouing et al., 1998). La estreptozotocina entra a las células β vía el transportador de glucosa (GLUT2) y causa alquilación del DNA. El daño al DNA activa la poli-ribosilación de ADP, un proceso que es más importante para la diabetogenicidad de la estreptozotocina que el daño al ADN. La poli-ribosilación lleva a la

depleción del NAD⁺ celular y del ATP. La defosforilación aumentada del ATP, después del tratamiento con estreptozotocina, suministra un sustrato para la xantina oxidasa y resultando en la formación de radicales superóxido. Como consecuencia de esto, también se generan peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Además, la estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico, el cual inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño al ADN. Como resultado de esta acción, la célula β presenta destrucción por necrosis (Szkudelski, 2001). Por tal motivo, la estreptozotocina es considerada un potente agente alquilante del ADN que actúa como donador de óxido nítrico en las células pancreáticas, principalmente debido a que las células beta son particularmente sensibles al daño por el NO y por radicales libres a causa de los bajos niveles de enzimas que los atrapan (Singh et al., 2001).

Se ha determinado también que la administración de superóxido dismutasa a ratas 10 ó 15 minutos antes de la administración de estreptozotocina previene o atenúa significativamente los efectos de esta última (Diaz-Flores et al., 2005). Otros trabajos han reportado la pérdida de la acción diabetogénica de la estreptozotocina en ratas cuando éstas son tratadas previamente con nicotinamida, glucosa o epicatequina lo cual indica que agentes antioxidantes pueden prevenir su efecto (Kamtchouing et al., 1998).

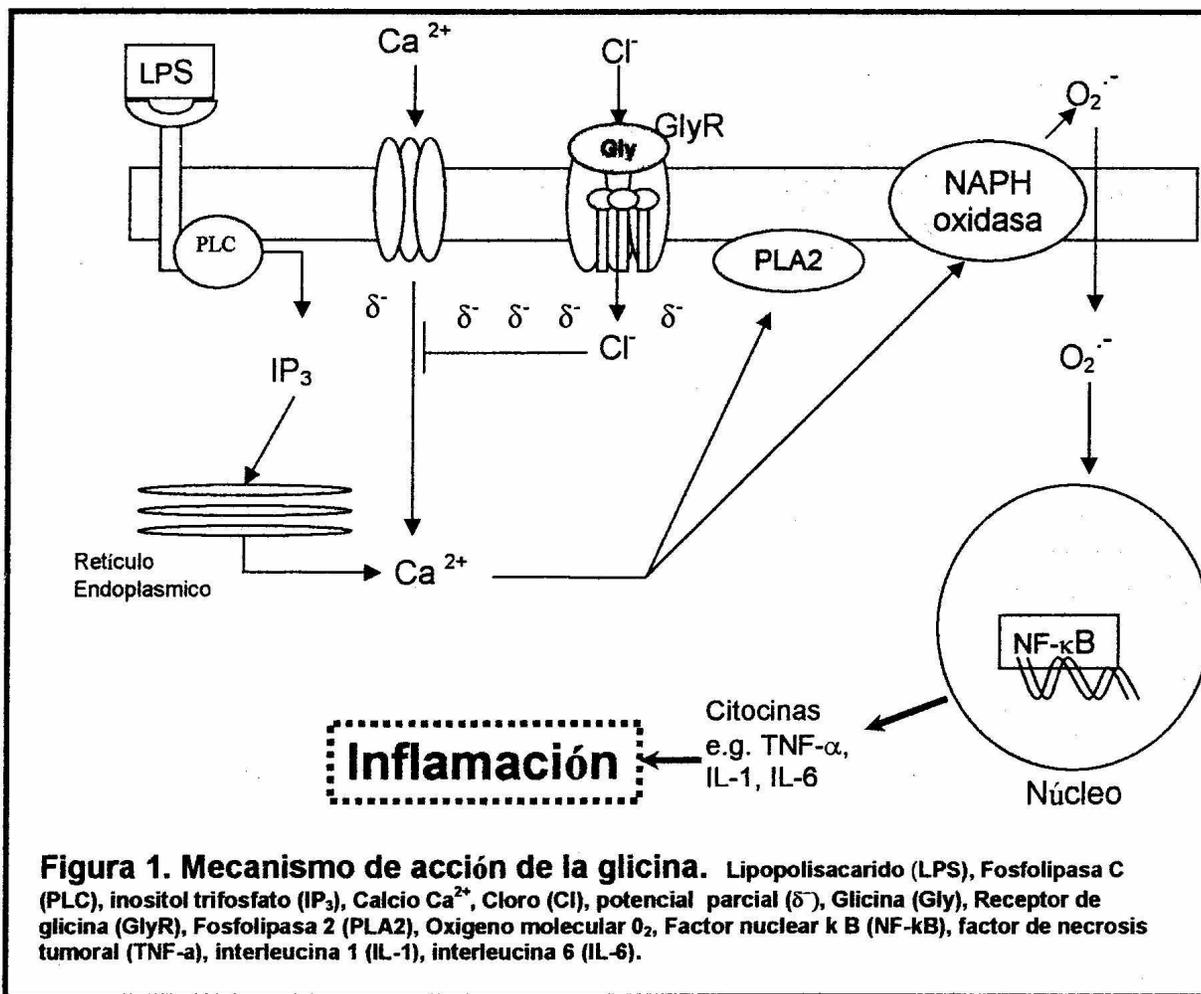
Glicina

La Glicina es el aminoácido más sencillo, se encuentra dentro del grupo de los aminoácidos no esenciales y está compuesto por un molécula de carbono enlazada a un grupo amino y a un grupo carboxilo. La glicina puede actuar como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, y recientemente se le ha atribuido, en diversos modelos experimentales, un efecto protector de lesiones isquémicas, trasplante, hepatitis alcohólica, fibrosis hepática, artritis y por toxicidad medicamentosa. Los mecanismos por los cuales la glicina protege permanecen sin comprenderse del todo. Los mecanismos propuestos incluyen la supresión de la señalización por calcio, la disminución en la formación de radicales libres y el bloqueo de la permeabilización de la membrana plasmática que precede a la necrosis oncolítica. En este sentido, recientes evidencias han mostrado que la glicina es un agente antiinflamatorio, inmunomodulador y citoprotector (Zhong et al., 2003).

Activación de los canales de cloro dependientes de glicina y la modulación de los canales de calcio

La activación de los canales de cloro dependientes de glicina es uno de los mecanismos postulados para los efectos de la glicina. La glicina es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, teniendo su efecto inhibitorio al unirse a sus receptores (GlyR) que están localizados en la membrana celular de las neuronas postsinápticas neuronales de la espina dorsal. La activación de los GlyR lleva a un incremento en la conductancia por cloro (Werman et al., 1967), que hiperpolariza las membranas postsinápticas y contrarresta la acción despolarizante de los neurotransmisores excitatorios. La estricnina, un alcaloide vegetal, a bajas concentraciones bloquea de manera selectiva el efecto de la glicina sobre su receptor, pero puede actuar como un agonista parcial en altas concentraciones. El GlyR se expresa en una amplia variedad de células que participan en repuestas inflamatorias e inmunes como los macrófagos, monocitos, neutrófilos y linfocitos (Ikejima et al., 1996; Wheeler et al., 2000b);

(Stachlewitz et al., 2000). También se expresa en otras células como hepatocitos, células endoteliales y células de los túbulos proximales (Miller y Schnellmann, 1994; Qu et al., 2002; Yamashina et al., 2001; Zhang et al., 2000). El GlyR está compuesto por subunidades: la α , que es la subunidad de unión a ligando; la β o subunidad estructural y la gefrina, subunidad de anclaje al citoplasma. Se organizan como un pentámero constituido por subunidades α o combinaciones de α y β que se unen a gefrina (Pfeiffer y Betz, 1981). La glicina tiene una constante de afinidad a su receptor (EC_{50}) de 20 a 50 μ M. Otros agonistas pueden unirse al GlyR como el glutatión reducido ($K_i= 10 \mu$ M) y el dipéptido cisteinil-glicina. La glicina bloquea el incremento intracelular de iones de calcio en respuesta a diferentes estímulos, como las endotoxinas, los polisacáridos como el peptidoglicano (PG-PS) y el péptido bacteriano formilmetionina-leucina-fenilalanina (FMLP), ácidos biliares, D-galactosamina, proliferadores peroxisomales, ciclosporina A, prostaglandina E_2 (PGE_2), fenil epinefrina, factor de crecimiento vascular del endotelio, concanavalina A y anticuerpo anti-CD3 (Ikejima et al., 1996; Li et al., 2001; Stachlewitz et al., 2000; Stachlewitz et al., 1999; Wheeler et al., 2000a; Wheeler et al., 2000b). El incremento de calcio intracelular induce la señalización para varios eventos intracelulares, entre los que se encuentran la producción de citocinas y de mediadores de la inflamación, la activación de enzimas tipo proteasas y la fosfolipasa A (PLA), que inducen proliferación y muerte celular. La activación de macrófagos lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. La activación del GlyR suprime estos eventos dependientes de calcio, al inducir el influjo de cloro y, consecuentemente, la hiperpolarización de las membranas celulares y la inhibición de la apertura de los canales de calcio dependiente de voltaje (**Figura 1**).



Efectos de la glicina sobre los radicales libres y la inflamación

La glicina disminuye el estrés oxidativo en varios modelos y estados de enfermedad (Mauriz et al., 2001; Yin et al., 2002; Zhong et al., 1999a; Zhong et al., 1999b). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden dañar varias moléculas que son importantes en la actividad biológica de todas las células, como son: los lípidos, el DNA y las proteínas (Hensley et al., 2000; Ryan y Aust, 1992). Las ERO activan a la fosfolipasa A₂, la cual aumenta la producción de mediadores lipídicos quimioatrayentes y vasoactivos como son los eicosanoides y el factor activador de plaquetas (Goldman et al., 1997).

La glicina ejerce varios efectos para prevenir la formación de ERO. En la nefrotoxicidad por ciclosporina, la glicina inhibe la vasoconstricción y la repercusión posterior a la isquemia (Zhong et al., 1999a). La glicina previene el shock hemorrágico inducido por la activación de las células Kupffer del hígado al mejorar el estrés oxidativo y minimizar la desregulación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la glutatión peroxidasa y la catalasa (Deters et al., 1997; Mauriz et al., 2001; Yin et al., 2002; Zhong et al., 1999a; Zhong et al., 1999b). Otra acción demostrada en los macrófagos es inhibir su activación por la vía de factores de transcripción y la síntesis de citocinas. La glicina también disminuye la formación de superóxidos en macrófagos activados por PG-PS, neutrófilos por FMLP y macrófagos alveolares por lipopolisacárido (Li et al., 2001; Wheeler et al., 2000b). También inhibe la activación de NF- κ B en varios modelos incluyendo a los de shock hemorrágico en ratas (Mauriz et al., 2001), macrófagos del bazo expuestos a PG-PS (Li et al., 2001) y células Kupffer de hígados expuestos al proliferador peroxisomal WY-14,643 o a ácidos grasos poliinsaturados (Rusyn et al., 1999; Rusyn et al., 2000). En estos modelos, la glicina por ende inhibe el aumento sistémico de las citocinas pro inflamatorias TNF- α e IL-6, y promueve la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Grotz et al., 2001). Se ha encontrado que disminuye la expresión de IL-1 y TNF- α pero aumenta la expresión de IL-10 en monocitos y la secreción de TNF- α , en células Kupffer (Rose et al., 1999; Spittler et al., 1999).

Las adipocinas y su órgano secretor el tejido adiposo

En años recientes se ha reconocido que el tejido adiposo secreta varias moléculas bioactivas llamadas adipocinas o “adipocitocinas”. Estas provienen principalmente del tejido adiposo blanco (TAB) y tienen un papel primordial en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen; la ingesta de alimentos, la regulación del balance energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa (por ejemplo, la proteína estimuladora de acilación (ASP), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6

(IL-6), la resistina, la leptina y la adiponectina); también participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación (como el angiotensinógeno y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (Bays et al., 2004).

En el humano el tejido adiposo se divide en: tejido adiposo marrón (TAM), que es el encargado de la termogénesis, y el TAB, encargado del almacenamiento de la grasa y la secreción de citocinas. Como tejido secretor, el TAB presenta varias características inusuales: *i)* no está confinado en una sola región, se encuentra distribuido a través de todo el organismo en depósitos individuales que no están conectados físicamente y no es clara la regulación de la secreción de moléculas por los depósitos ni cómo se regula su conexión a través de estímulos humorales y nerviosos; *ii)* está constituido por diferentes tipos celulares, que incluyen fibroblastos, preadipocitos, adipocitos maduros y macrófagos, los cuales contribuyen y además participan, en mayor o menor grado, en la función secretora del TAB; *iii)* el tejido adiposo es sumamente heterogéneo en término de sus capacidades metabólicas, de acuerdo con su localización visceral o subcutánea (Dusserre et al., 2000; Fried et al., 1998); *iv)* algunas adipocinas también son secretadas por tejidos diferentes al adiposo y no se puede determinar con exactitud cuál es la contribución de este tejido a las concentraciones de adipocinas circulantes. Además, es poco lo que se conoce con respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la biosíntesis y la exocitosis de las adipocinas, aunque existe evidencia de algunos mecanismos de regulación en las vías de secreción en los adipocitos (Mora y Pessin, 2002).

La síntesis de las adipocinas se encuentra desregulada en respuesta a las alteraciones de la masa del TAB. Se ha observado que la obesidad y las patologías asociadas a la misma presentan una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por: producción anormal de citocinas, aumento de los reactantes de fase aguda y activación de vías de señalización relacionadas con las respuestas inflamatorias (Wellen y Hotamisligil, 2003). Una característica muy interesante es que la inflamación crónica interrelaciona con la obesidad, la diabetes tipo 2 (DT2), la enfermedad cardiovascular y el síndrome metabólico.

En la actualidad es importante visualizar, a través de un panorama general, la expresión de las adipocinas en el tejido adiposo y el de aquellas asociadas al aumento en la masa del TAB, la relación de este tejido con células del sistema inmune y el por qué de las similitudes entre los diferentes tipos celulares que componen al tejido adiposo desde los puntos de vista evolutivo y funcional.

Adipocitocinas y la homeostasis metabólica

Uno de los principales efectos de las adipocinas es la homeostasis metabólica, ya sea a través de la sensibilización o desensibilización de la acción de la insulina en los diferentes tejidos blanco (resistencia a la insulina). La obesidad se caracteriza clínicamente por un índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m^2 , donde ocurre un aumento desmesurado de la adiposidad, principalmente la del TAB visceral. En estos tejidos se ha demostrado un incremento de las adipocinas pro inflamatorias (TNF- α , IL-6, ASP, resistina) y un decremento de las adipocinas antiinflamatorias (adiponectina), las cuales modifican la sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina), desencadenando la arteriosclerosis y otras complicaciones microvasculares (Pittas et al., 2004) (**Figura. 2**).

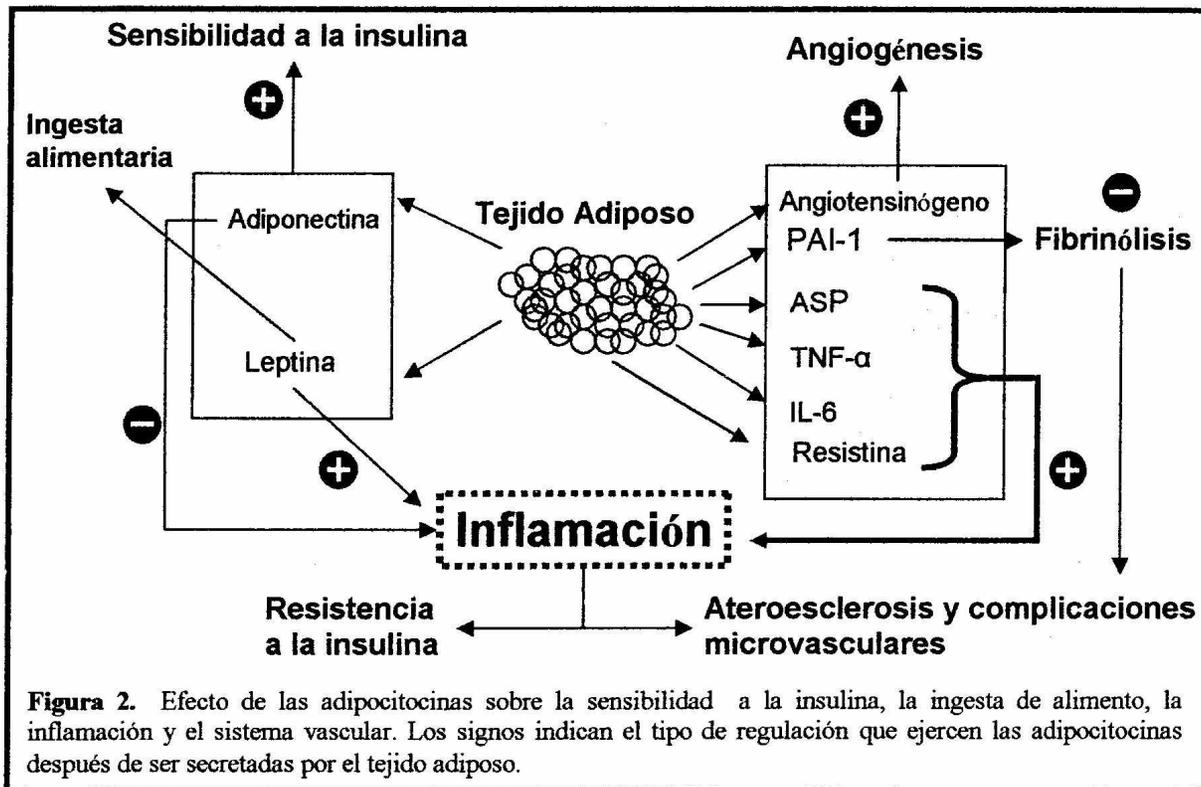


Figura 2. Efecto de las adipocitocinas sobre la sensibilidad a la insulina, la ingesta de alimento, la inflamación y el sistema vascular. Los signos indican el tipo de regulación que ejercen las adipocitocinas después de ser secretadas por el tejido adiposo.

Proteína estimuladora de acilación (ASP)

El TAB produce varias proteínas de la vía alterna del complemento, entre las que se encuentra la adipsina que es una proteasa de serinas idéntica al factor D de esta vía (Cook et al., 1987). En este sentido, el TAB del humano libera gran cantidad de ASP, que es una proteína derivada del factor C3 que es conocido también como C3desArg (Cianflone et al., 2003). En el plasma de sujetos obesos se presentan aumentos substanciales de ASP acompañados de una sobre expresión moderada del RNAm de C3 en el TAB. No se sabe si el incremento en la concentración plasmática de ASP produce un aumento en su actividad o una resistencia. La resistencia a ASP podría promover la redirección del flujo de ácidos grasos libres del TAB al hígado (Cianflone et al., 2003). En el hepatocito, la ASP estimula el almacenamiento de triglicéridos a través de la estimulación del transporte de glucosa, el aumento de la reesterificación de ácidos grasos libres y la inhibición de la lipólisis (Cianflone

et al., 1999; Van Harmelen et al., 1999). Sin embargo, su receptor y la vía de señalización no se han caracterizado. Los estudios en ratones muestran que la ausencia de ASP da como resultado un decremento en el almacenamiento de triglicéridos y la reducción moderada de la masa del TAB, tanto en una dieta normal como en una alta en grasas; además, el ratón deficiente de ASP es más sensible a insulina (Murray et al., 2000).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α fue el primero de los productos del tejido adiposo que a nivel molecular se encontró incrementado en la obesidad y que contribuye a la resistencia a la insulina (Cheung et al., 1998; Xu et al., 2002). El TNF- α es una proteína que se expresa como un péptido de 26 kDa en la membrana celular y sufre un corte que da lugar a su forma soluble de 17 kDa (Moller, 2000). A pesar de que en humanos los niveles del RNAm y de la proteína de TNF- α son bajos, en el TAB correlacionan positivamente con la adiposidad y disminuyen en sujetos obesos después de la pérdida de peso, mejorando la sensibilidad a la insulina (Kern et al., 2001). Un artículo reciente reporta que en individuos obesos la mayor parte de la liberación de TNF- α en el tejido adiposo se presenta en las células no adiposas (Fain et al., 2004). A nivel molecular, TNF- α induce la lipólisis, activa las isoformas inflamatorias de las MAPK cinasas: la cinasa N-terminal de c-Jun y la de p38 MAPK (Hotamisligil et al., 1993) y disminuye tanto la actividad de IRS-1 al inducir su fosforilación en residuos de serina, como la expresión del transportador de glucosa (GLUT-4) (Stephens et al., 1997). En la obesidad se han observado aumentos de la forma de TNF- α unida a la membrana (26 kDa) y esta forma puede actuar de manera autócrina alterando profundamente la biología del TAB (Xu et al., 2002). De manera local, el TNF- α aumenta la expresión de los genes de PAI-1 y C3 y disminuye la de adiponectina en el TAB (Ruan et al., 2002). En síntesis, en la obesidad el TNF- α regula vías en el TAB mediando, al menos en parte, las alteraciones en los niveles plasmáticos de otras adipocinas (Fasshauer y Paschke, 2003).

Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es secretada por varios tipos celulares entre los que se encuentran las células del sistema inmune, fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético y por supuesto el tejido adiposo. Esta proteína es secretada en forma glucosilada cuyo peso molecular es de 22 a 27 kDa y se une a su receptor transmembranal (Mohamed-Ali et al., 1998). El TAB humano produce grandes cantidades de IL-6 (10 al 30 % del total de la proteína circulante) (Mohamed-Ali et al., 1998). La IL-6 es secretada principalmente por el tejido adiposo visceral y no por el subcutáneo (Fried et al., 1998); sin embargo, es posible que la mayor liberación de esta citocina se deba a las células del estroma vascular (Fain et al., 2004). La IL-6 plasmática correlaciona positivamente con la adiposidad y negativamente con la sensibilidad a la insulina. La IL-6 tiene un efecto directo sobre la sensibilidad a la insulina por varios mecanismos ya que es secretada por el TAB en los depósitos viscerales, llega al hígado y puede estimular la secreción hepática de triglicéridos y la gluconeogénesis (Nonogaki et al., 1995). Se sugiere también que IL-6 participa en la resistencia a la insulina alterando la señalización en los hepatocitos por la inducción de la proteína SOCS-3 (siglas en inglés Supresor of Cytokine Signaling-3), inhibiendo la autofosforilación del receptor de la insulina dependiente de insulina (Senn et al., 2002). Aunado a esto, en adipocitos de ratón disminuye también la activación del IRS-1 y la PI-3 cinasa por lo que induce resistencia a la insulina (Senn et al., 2002). En modelos de roedores con diabetes, la IL-6 induce también resistencia a la insulina en el músculo y apoptosis en las células β (Sandler et al., 1990; Shimabukuro et al., 1998). En conclusión, IL-6 puede actuar a varios niveles, tanto de forma parácrina y autócrina en el tejido adiposo, como de manera endocrina, en los tejidos periféricos alterando el peso corporal, la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina.

Resistina

Una nueva proteína secretada en el TAB, también conocida como ADSF (siglas en inglés Adipose Tissue Specific Secretory Factor) es la resistina (Han et al., 2001; Steppan et al., 2001). Esta adipocitocina pertenece a una familia de proteínas de secreción ricas en cisteína llamadas FIZZ (siglas en inglés Found Inflammatory Zone), ahora conocida como Retn. El RNAm de la resistina codifica para un polipéptido de 114 aminoácidos, con 20 de ellos como péptido señal, que es secretado en forma de dímero (Steppan y Lazar, 2002). La resistina también se expresa en células inmunocompetentes (Milan et al., 2002; Savage et al., 2001). La proteína humana presenta 59% de homología con el ratón, su expresión en el TAB humano es menor a la de los ratones y no está del todo claro cuál es su papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina en humanos (Savage et al., 2001). En ellos, la principal fuente de resistina parecen ser los macrófagos (Nagaev y Smith, 2001; Savage et al., 2001) y su expresión correlaciona con la resistencia a la insulina (Gustafson et al., 2003; McTernan et al., 2002). Estudios recientes han reportado que tanto la expresión de la resistina en el TAB como sus concentraciones séricas se encuentran aumentadas en individuos obesos y con DT2 (Combs et al., 2002; McTernan et al., 2002; Savage et al., 2001). La resistina recombinante promueve la resistencia a la insulina a nivel sistémico cuando es administrada a ratones y disminuye el transporte de glucosa por células del tejido adiposo, mientras que el anticuerpo para resistina produce el efecto contrario (Steppan et al., 2001). La infusión de resistina en ratas induce la resistencia a la insulina en el hígado y aumenta la producción de glucosa (Combs et al., 2003). Lo anterior correlaciona con los datos en humanos en donde también se ha asociado con resistencia a la insulina a nivel hepático, pero no en el músculo (Bays et al., 2004; Gustafson et al., 2003).

Leptina

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos que es secretada por los adipocitos. La cantidad es directamente proporcional a la masa del tejido adiposo, aunque también puede ser secretada por células inmunocompetentes y endoteliales (Considine et al., 1996). La leptina circula junto con la forma soluble de su receptor y ejerce su función al unirse con sus receptores (Ob-R), siendo el mejor caracterizado el Ob-Rb que activa la vía de señalización del sistema de Jak-Stat (Pittas et al., 2004). La leptina participa en la regulación normal a largo plazo de la ingesta de alimentos, el peso corporal, el gasto energético y las funciones neuroendocrinas. Sin embargo, es paradójico el hecho de que la leptina se encuentra sobreexpresada en el TAB en la mayoría de los obesos, lo que ha llevado al desarrollo del concepto de la resistencia a la leptina. A nivel fisiológico, la leptina induce un efecto sensibilizador de insulina, al promover la oxidación de ácidos grasos libres y la reducción de la acumulación de grasa ectópica en tejidos no adiposos (Muoio et al., 1997; Shimabukuro et al., 1997). A nivel molecular, este efecto se encuentra mediado directamente por leptina a través de la activación de AMPK en el músculo esquelético e indirectamente en el eje del sistema nervioso simpático hipotalámico (Minokoshi et al., 2002). Lo anterior favorece la inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria por malonil CoA y la oxidación de ácidos grasos (Ebihara et al., 2001; Shimomura et al., 1999). Un mecanismo planteado de la resistencia a leptina puede ser la inducción del supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS-3), que puede inhibir la señalización intracelular de leptina (Bjorbaek et al., 1999).

En la inflamación la leptina actúa directamente sobre los macrófagos para aumentar su actividad fagocítica y la producción de citocinas pro inflamatorias (Chandra, 1980; Fernandes et al., 1978; Gainsford et al., 1996). También se ha involucrado a la leptina en la inflamación asociada con la arteriosclerosis y el síndrome metabólico (Pickup y Crook, 1998). La leptina actúa como una señal en la regulación de la sensibilidad a la insulina a nivel de todo el organismo. De manera más puntual, la resistencia a la leptina es en sí uno de los factores causales de las complicaciones cardiovasculares en la obesidad.

Leptina

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos que es secretada por los adipocitos. La cantidad es directamente proporcional a la masa del tejido adiposo, aunque también puede ser secretada por células inmunocompetentes y endoteliales (Considine et al., 1996). La leptina circula junto con la forma soluble de su receptor y ejerce su función al unirse con sus receptores (Ob-R), siendo el mejor caracterizado el Ob-Rb que activa la vía de señalización del sistema de Jak-Stat (Pittas et al., 2004). La leptina participa en la regulación normal a largo plazo de la ingesta de alimentos, el peso corporal, el gasto energético y las funciones neuroendocrinas. Sin embargo, es paradójico el hecho de que la leptina se encuentra sobreexpresada en el TAB en la mayoría de los obesos, lo que ha llevado al desarrollo del concepto de la resistencia a la leptina. A nivel fisiológico, la leptina induce un efecto sensibilizador de insulina, al promover la oxidación de ácidos grasos libres y la reducción de la acumulación de grasa ectópica en tejidos no adiposos (Muoio et al., 1997; Shimabukuro et al., 1997). A nivel molecular, este efecto se encuentra mediado directamente por leptina a través de la activación de AMPK en el músculo esquelético e indirectamente en el eje del sistema nervioso simpático hipotalámico (Minokoshi et al., 2002). Lo anterior favorece la inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria por malonil CoA y la oxidación de ácidos grasos (Ebihara et al., 2001; Shimomura et al., 1999). Un mecanismo planteado de la resistencia a leptina puede ser la inducción del supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS-3), que puede inhibir la señalización intracelular de leptina (Bjorbaek et al., 1999).

En la inflamación la leptina actúa directamente sobre los macrófagos para aumentar su actividad fagocítica y la producción de citocinas pro inflamatorias (Chandra, 1980; Fernandes et al., 1978; Gainsford et al., 1996). También se ha involucrado a la leptina en la inflamación asociada con la arteriosclerosis y el síndrome metabólico (Pickup y Crook, 1998). La leptina actúa como una señal en la regulación de la sensibilidad a la insulina a nivel de todo el organismo. De manera más puntual, la resistencia a la leptina es en sí uno de los factores causales de las complicaciones cardiovasculares en la obesidad.

Adiponectina

La adiponectina, que también es conocida por los nombres adipoQ, ACRp30, apM1, GBP28, está compuesta por una cola de colágeno y una cabeza globular, que forma dímeros y trímeros; estos complejos de alto peso molecular se encuentran en la circulación, aunque no se ha determinado cuál es la forma bioactiva (Pajvani et al., 2003). Hoy en día, las únicas células que se conoce que secretan adiponectina son los adipocitos del TAB y del TAM (Viengchareun et al., 2002). La adiponectina ejerce su función al unirse a sus receptores Adipo R1 y Adipo R2 (Yamauchi et al., 2003).

De manera contrastante con las otras adipocinas, la expresión de adiponectina y sus concentraciones en el plasma no se encuentran aumentadas sino más bien disminuidas en una amplia variedad de enfermedades que presentan resistencia a la insulina y obesidad. Se sugiere que los individuos con altas concentraciones de adiponectina son menos propensos a desarrollar diabetes tipo 2 que aquellos con concentraciones bajas, razón por la cual se le considera un importante marcador tanto de resistencia a la insulina como de riesgo de enfermedad cardiovascular (Lindsay et al., 2002; Spranger et al., 2003). Un estudio con niños obesos realizado en nuestro laboratorio mostró que las concentraciones de adiponectina plasmáticas pueden encontrarse disminuidas de manera previa al desarrollo de la DT2 (Cruz et al., 2004). Tanto los tratamientos nutricionales como farmacológicos para mejorar la sensibilidad a la insulina, que implican la pérdida de peso por la restricción calórica y el tratamiento con tiazolidinedionas (TZD), aumentan la expresión del gene de adiponectina en el TAB y aumentan los niveles plasmáticos de la proteína (Bruun et al., 2003; Combs et al., 2003; Combs et al., 2002; Maeda et al., 2001). El efecto estimulante de las TZD es regulado vía la activación del heterodímero PPAR γ /receptor retinoico X y por la subsecuente unión de éste al elemento de respuesta al PPAR (PPRE), que se encuentra en el promotor del gene humano de adiponectina (Iwaki et al., 2003). El TNF- α y la IL-6 son potentes inhibidores de la expresión y secreción de adiponectina en las biopsias de TAB humano y en células en cultivo (Bruun et al., 2003; Fasshauer et al., 2003b). Esto sugiere que la inducción de la

resistencia a la insulina por TNF- α e IL-6 puede también ejercer una inhibición autócrina parácrina de la liberación de adiponectina. Estudios recientes, revelan que la administración de adiponectina recombinante, ya sea en su forma completa o en la forma aislada (cabeza globular), ejerce efectos hipoglucémicos y disminuye la resistencia a la insulina en modelos de ratones con obesidad o diabetes (Berg et al., 2002; Tsao et al., 2002). También, la adiponectina tiene propiedades antiaterogénicas al inhibir la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y la transformación de macrófagos a células espumosas *in vitro* (Ouchi et al., 1999; Ouchi et al., 2001). El fenotipo del ratón knockout para adiponectina confirmó que existe un efecto protector mediado por adiponectina contra la aterosclerosis y la inducción de la resistencia a la insulina (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2001). El efecto sensibilizador de insulina por adiponectina es mediado en parte por un incremento en la oxidación de ácidos grasos a través de la activación de AMPK en el músculo esquelético (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002); de manera similar a la acción de la leptina, la adiponectina activa a la AMPK en el hígado y como resultado, disminuye la síntesis de glucosa por el tejido hepático (Combs et al., 2001; Yamauchi et al., 2002).

Adipocinas y la homeostasis vascular

La regulación de la homeostasis vascular juega un papel primordial en el incremento del tejido adiposo. Cuando este tejido se expande, participan varios factores tróficos que pueden desencadenar complicaciones a nivel sistémico, ya sea por sí mismos o por el aumento en la obesidad. Un ejemplo de esto es la hipertensión relacionada con el síndrome metabólico. Entre las citocinas que participan en dichos procesos se encuentra el angiotensinógeno (AGE) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)(Bays et al., 2004) (**Figura 2**).

Angiotensinógeno (AGE)

Estudios epidemiológicos han mostrado que los niveles circulantes del AGE, que es el precursor del péptido vasoactivo angiotensina II, correlacionan positivamente con la presión arterial. El hígado es la fuente principal de AGE, aunque el TAB es considerado como una de las principales fuentes extrahepáticas en sujetos obesos. En los estudios con ratones, cuando se introduce el gene de AGE tejido específico en el TAB se sobreexpresa el RNAm de AGE en el tejido adiposo y se observa un aumento de esta proteína en el plasma, acompañado de hipertensión y crecimiento del TAB. La reexpresión de AGE en el tejido adiposo en el ratón nulo para AGE, animal que es hipotenso y delgado, es suficiente para reestablecer el volumen del tejido adiposo blanco y normalizar la presión arterial (Massiera et al., 2001a),(Massiera et al., 2001b). En conclusión, la producción de AGE por el TAB aumenta los niveles circulantes de la proteína en sujetos obesos, favoreciendo la hipertensión (Ailhaud et al., 2000). El incremento en la síntesis de AGE puede contribuir al aumento del TAB, atribuible al hecho de que la angiotensina II actúa localmente como factor trófico para la formación de nuevas células adiposas (Saint-Marc et al., 2001).

Inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)

En años recientes se ha observado que en la obesidad el deterioro del sistema fibrinolítico participa en las complicaciones cardiovasculares, defecto asociado con la presencia de altas concentraciones del PAI-1, el cual es principal inhibidor de la fibrinólisis. El PAI-1 es una proteasa de serinas que inhibe al activador de plasminógeno, cuya función es dar origen a la plasmina para activar la cascada fibrinolítica. El TAB, las células del estroma vascular y los preadipocitos de la grasa visceral, son la principal fuente de PAI-1 plasmático (Bastelica et al., 2002; Mavri et al., 2001; Mavri et al., 1999). En el TAB y otros tejidos, el PAI-1 afecta la migración celular y la angiogénesis mediante la competencia con vitronectina por el sitio de unión para integrina en la matriz extracelular, efecto observado *in vitro* para la migración de los preadipocitos (Crandall et al., 2000). Es a través de esta función que PAI-1 puede afectar el crecimiento del TAB. También se ha observado que la sobreexpresión del RNAm de PAI-1 en el TAB disminuye la hipertrofia en ratones sometidos a una dieta rica en grasa (Lijnen et al., 2003). En ratones genéticamente obesos la inhibición del gene de PAI-1 reduce la adiposidad (Schafer et al., 2001) pero no tiene ningún efecto significativo sobre la masa del TAB en el modelo de inducción de obesidad por dieta (Morange et al., 2000). En conjunto estas observaciones sugieren que en la obesidad el aumento en la secreción de PAI-1 por el TAB, aunque inhibe la fibrinólisis, ejerce un efecto protector contra el crecimiento excesivo del TAB. Por último, en la resistencia a la insulina, la secreción de PAI-1 por el TAB se encuentra aumentada (Alessi et al., 1997; Birgel et al., 2000), ligando a la enfermedad vascular con la resistencia a la insulina, la obesidad y la DT2 (Bays et al., 2004).

Tejido Adiposo y Sistema Inmune

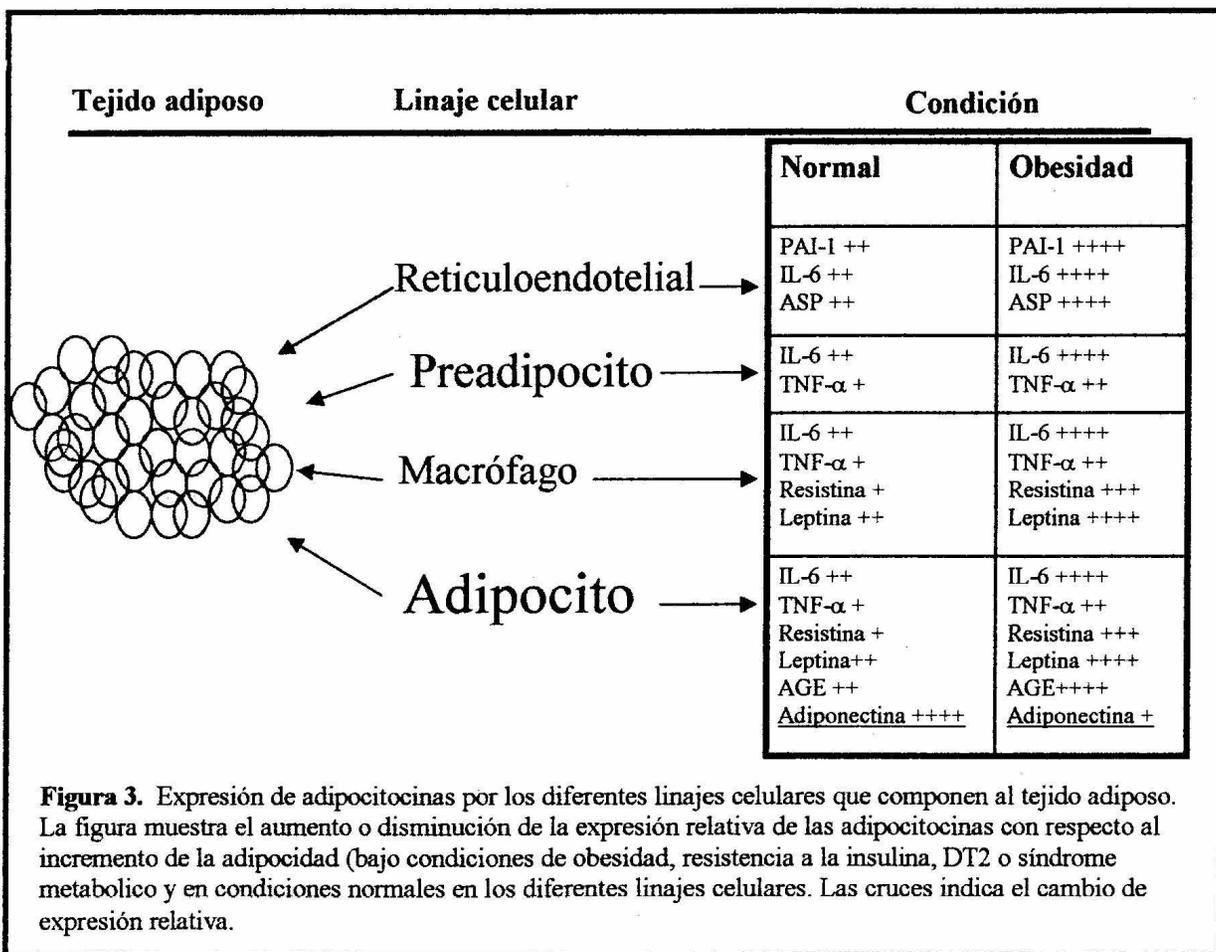
La mayoría de los estudios han examinado al tejido adiposo y a los adipocitos para la búsqueda de los mecanismos subyacentes de la obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y la arteriosclerosis, que presentan defectos tanto en las vías metabólicas como en las

inflamatorias. Mientras que se conoce bastante acerca del papel de los adipocitos en el metabolismo energético, es poco lo que se sabe de su papel en la inflamación. Se ha observado que los adipocitos y varias células del sistema inmune, tales como las células T y los macrófagos, poseen características similares en cuanto a la producción de citocinas pro inflamatorias y a las vías de señalización (Hotamisligil et al., 1993; Rosen et al., 1989). Por ejemplo, las células precursoras de los adipocitos (preadipocitos) poseen potente actividad fagocitaria (Charriere et al., 2003). Aunado a esto, muchos genes críticos para los adipocitos, incluyendo aquellos que codifican para factores de transcripción, citocinas, moléculas inflamatorias, transportadores de ácidos grasos y receptores basureros (scavenger) también son expresados en los macrófagos y tienen un papel importante en la biología del macrófago (Makowski et al., 2001; Tontonoz et al., 1998). Sin embargo, se encuentran pocas excepciones a esta redundancia funcional y molecular entre los preadipocitos y los macrófagos. En este sentido, se ha observado que los preadipocitos pueden sufrir una transdiferenciación y adquirir la capacidad fagocítica al ser introducidas en el peritoneo expresando F4/80, Mac-1 y CD45, pero este fenómeno es dependiente de la presencia de macrófagos (Ron et al., 1992).

Macrófagos en la obesidad

A partir de la comparación de patrones de expresión de genes entre muestras de tejidos adiposos humanos y de ratones obesos contra controles delgados, así como de estudios que correlacionan los patrones de expresión genética en sujetos con diferentes grados de obesidad (Weisberg et al., 2003), se ha encontrado que la infiltración de macrófagos al tejido adiposo en la obesidad puede ser parte integral de los cambios inflamatorios en el TAB (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Esto sugiere que una gran cantidad de genes que se regulan en la obesidad proviene de la expresión de genes de los macrófagos infiltrados en el TAB y de las células reticuloendoteliales y no solamente de los preadipocitos o adipocitos (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003) (**Figura 3**). Recientemente se llegó a la conclusión de que algunas

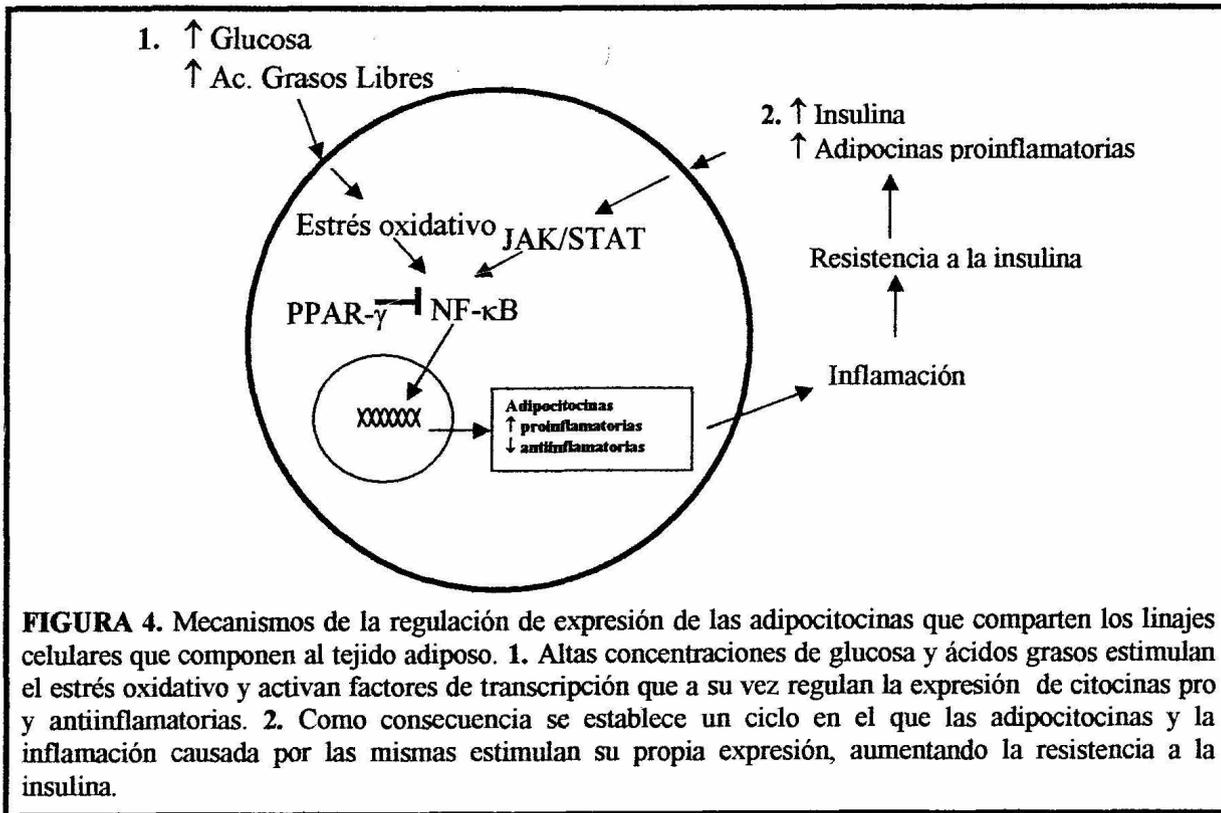
adipocinas, principalmente leptina, provenientes de los adipocitos maduros activan células endoteliales y por ende la estimulación de la diapédesis de los monocitos y la acumulación de macrófagos en el TAB. Bajo estas condiciones, el incremento en la masa TAB y el subsecuente aumento de la expresión de las adipocinas inflamatorias y la disminución de adiponectina contribuyen al estado de inflamación crónica característico de la obesidad y el síndrome metabólico (Curat et al., 2004).



Teoría evolutiva como explicación del proceso inflamatorio en el TAB

Existen varias propuestas con respecto a la relación estrecha que ocurre entre las respuestas metabólicas y las respuestas de tipo inmunológico. Una de las maneras de explicarlo es la evolutiva. De acuerdo con ésta, las estructuras que controlan funciones metabólicas e inmunológicas claves han evolucionado de ancestros evolutivos comunes. El mejor ejemplo de esto es el cuerpo graso que se encuentra en el dorso de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el cual posee funciones que son homólogas a las células del hígado del sistema hematopoyético y del sistema inmune del humano. Se observó que evolutivamente este sitio corresponde al tejido adiposo humano ya que para ambas especies es ahí donde se lleva un control estricto de la adipogénesis (Tong et al., 2000). En éste escenario es posible deducir qué moléculas y vías en común pueden regular tanto las funciones metabólicas como las inmunológicas. Aunado a esto, el factor de transcripción NF- κ B y el sistema JAK/STAT en humanos regulan la expresión de citocinas, primero bajo el estímulo de nutrientes (e.g. glucosa y ácidos grasos) y después por la retroalimentación de las adipocinas producidas en los diferentes tipos celulares que componen al TAB (adipocitos, preadipocitos, macrófagos y células retículo endoteliales) y en la resistencia a la insulina (**Figura 4**), el mecanismo es similar a sus homólogos expresados en el cuerpo graso de *Drosophila* (Tong et al., 2000).

Además, esta cercanía entre la regulación de las funciones metabólicas e inmunológicas parece ser ventajosa, ya que el organismo necesita organizar y redistribuir sus reservas metabólicas durante el desarrollo de una respuesta inmune o inflamatoria. De hecho, las respuestas más primitivas integran tanto las vías sensibles a patógenos como a nutrientes. Es así que los nutrientes pueden evocar respuestas inmunes y los patógenos pueden regular respuestas metabólicas (Wellen y Hotamisligil, 2003).



JUSTIFICACIÓN

Actualmente la morbimortalidad a causa de la DT2 representa el principal problema de salud en México. En los últimos 20 años se ha observado que el incremento en la mortalidad por DT2 a edades más jóvenes está íntimamente relacionado con la obesidad donde se generan estados de inflamación crónica en los diferentes tejidos.

Con los antecedentes sobre el efecto de la glicina que disminuye la expresión de los mensajeros y la proteína de IL-6 y TNF- α y que aumenta el de IL-10 en células del sistema inmune, se propone conocer si la glicina modifica el perfil de citocinas proinflamatorias (IL-6, resistina) y antiinflamatoria (adiponectina) en un modelo *in vitro* de adipocitos de ratón, donde se induce la resistencia a la acción de la insulina y se conoce cómo se expresan los genes que codifican para las citocinas inflamatorias. Además, tomando en cuenta que la glicina mejora la sensibilidad a la insulina, disminuye los niveles de HbA1c y protege contra la nefropatía diabética, es probable que este aminoácido sea una alternativa para reducir los efectos colaterales debidos a las complicaciones de la diabetes originados por estrés oxidativo o estados inflamatorios.

Esta investigación tiene como propósito conocer los efectos de la glicina a nivel básico para sustentar su aplicación y posibles efectos para controlar las acciones deletereas de la hiperglucemia en el paciente diabético, particularmente para disminuir su proceso inflamatorio y las complicaciones micro- y macrovasculares.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la glicina, sobre la expresión de adipocitocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en un modelo *in vitro* (adipocitos 3T3-L1) y sobre parámetros asociados a la DT2 en un modelo de diabetes experimental inducida en ratones.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un modelo de resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1.
2. Cuantificar la expresión del RNAm que codifica para las adipocitocinas durante el proceso de diferenciación de los adipocitos 3T3-L1.
3. Determinar el efecto de la administración de glicina sobre la expresión del RNAm de adipocitocinas durante la diferenciación y bajo condiciones de resistencia a la insulina en células 3T3-L1.
4. Determinar el efecto de la glicina sobre las concentraciones de de glucosa, HbA1c, colesterol, triglicéridos, TGO y TGP, así como los parámetros de peso corporal, consumo de agua y alimento, y sobrevida en ratones sanos y diabéticos.

HIPÓTESIS

Si la glicina tiene un efecto benéfico en los procesos inflamatorios y en el estrés oxidativo, entonces actuará inhibiendo la expresión de las adipocitocinas proinflamatorias IL-6 y Resistina e incrementando la expresión de la adipocitocina antiinflamatoria, adiponectina en adipocitos 3T3-L1, así como la disminución de la HbA1c y aumentando la sobrevivencia de ratones tratados con STZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium de GIBCO)
- Placas de cultivo CORNING de seis pozos.
- Suero fetal bovino (SFB) qualified (GIBCO)
- Metilhidroxibutilxantina (SIGMA, St. Louis, MO)
- Dexametasona (marca SIGMA, St. Louis, MO)
- Insulina bovina (marca SIGMA, St. Louis, MO)
- MEM (GIBCO 61100)
- 2 Desoxi- (2,6-³H)glucosa (Amersham,)
- Reactivo de Lowry (BioRad)
- TriPure (Roche)
- Cloroformo (MERK)
- Agua libre de RNAsas (Promega)
- Kit DNAsaQ (Promega)
- Bromuro de etidio (Biorad)
- Buffer de carga (10X Biorad)
- Kit DNA Master SYBR Green I (Roche)
- Kit DNA TaqMan Master (Roche)
- Estándar de DNA 100 pb (Roche)

Cultivo celular

Diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos

Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 se cultivaron en botellas de 75 cm², durante 5 días, posteriormente las células se resembraron en placas de cultivo de 6 pozos (aproximadamente 80 a 90 mil células por pozo) y se proliferaron hasta confluencia con medio DMEM, conteniendo 10% de suero fetal bovino más glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y gentamicina con una concentración de glucosa de 25.5 mM, en una incubadora a 37° C, con atmósfera de CO₂ al 5%. Dos días después de la confluencia (día 0, con aproximadamente 700 mil células por pozo) se indujo la diferenciación con metilhidroxibutilxantina (0.5 mM), dexametasona (0.25 µM) e insulina (0.8 µM o 5 µg/ml) en DMEM con 10% de suero fetal bovino. Después de dos días se cambió el medio suplementado solamente con insulina (5 µg/ml). A partir del cuarto día el medio se cambió cada dos días sin la adición de insulina. Las células fueron usadas para inducir resistencia a la insulina entre los días 8 y 12 de diferenciación, en donde 90% de las células expresaron el fenotipo de adipocitos, caracterizado por la acumulación de gotas de grasa (Gregoire et al., 1998), en otros casos las células se utilizaron en los días de diferenciación que se indicarán más adelante.

Inducción de resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1

Las células 3T3-L1 completamente diferenciadas se incubaron en medio de cultivo MEM suplementado o no con glicina 10 mM. Para la inducción de la resistencia a la insulina (R), al cultivo se le adicionó insulina 10 nM y se incubaron durante 8 horas en las condiciones que ya se indicaron; el medio más la hormona se cambió cada 2 horas y el efecto del tratamiento se verificó midiendo la incorporación de 2-Desoxi-(2,6-³H) glucosa dependiente

de insulina 100 nM, comparando con la incorporación de glucosa en células control sin inducción de resistencia a insulina (C) (Thomson et al., 1997).

Incorporación de 2-desoxi-³H glucosa

Después de la incubación por 8 horas, las células se lavaron 3 veces con 2 ml de Krebs Ringer Fosfatos (KRP) + glucosa 20 mM y albúmina de suero bovino (ASB) al 1%, incubando 20 minutos cada vez, a 37° C, en una cámara Boekel. Posteriormente se lavaron 3 veces con KRP (2 ml) sin glucosa y sin ASB, dejando a las células en 1 ml de esta misma solución. Para determinar la incorporación de glucosa radioactiva, las células se estimularon con insulina 100 nM por 20 minutos a 37° C y se incluyeron células sin insulina para calcular la incorporación debida a la adición de hormona exógena. Después se adicionó 2-desoxi-glucosa 10 mM fría, que contenía 2-desoxi-³H glucosa (0.5 µCi/ml final) y se incubó 20 minutos más. Al final de la incubación las placas se colocaron sobre hielo y se lavaron tres veces con PBS frío. La solución se eliminó y las células se lisaron con 1 ml de tritón X 100 al 1 % en PBS. Se tomó una alícuota de 700 µl sobre 5 ml de líquido de centelleo para medir la 2-desoxi-³H glucosa incorporada y otra de 30 µl para cuantificar proteínas mediante el método de Lowry; la absorción a 690 nm del compuesto colorido se determinó en un lector de ELISA (Lab Systems). Se calculó el porcentaje de la glucosa incorporada y se expresó en relación a los mg de proteína de la muestra.

Extracción del RNA

Otros lotes del cultivo se utilizaron para extraer el RNA total. En algunos experimentos, las células se crecieron induciendo la diferenciación en presencia y en ausencia de glicina 10 mM; en este caso, las células se lisaron a los 0, 2, 4 y 8 días de diferenciación.

En otros experimentos las células se crecieron y diferenciaron únicamente en ausencia de glicina y se indujo la resistencia a la insulina tanto en presencia como en ausencia de glicina, como ya se indicó. Al final del tratamiento las células se lisaron. En todos los casos la extracción del RNA total se realizó utilizando el reactivo TriPure. El método se basa en una extracción acuosa mediante isotiocianato de guanidina y fenol descrita por Chomsky y Sacchi. Las células se lisaron con 0.5 ml del reactivo Tripure por cada pozo, se usaron 2 pozos de cada tratamientos (el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar), la suspensión de células se pasó a tubos conicos Ependorf de 1.5 ml. Se incubó por 3 minutos a 4° C, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g (Centrífuga Beckman Avanti 30) durante 10 minutos a 4° C, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos nuevos. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo por ml de Tripure, se agitó vigorosamente con la mano por 1 minuto y se dejó en reposo 3 minutos a 4° C. Se centrifugaron de nuevo a 14,000 x g por 15 minutos a 4° C y la fase acuosa se recuperó. Se agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 20 minutos; se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4° C y posteriormente el sobrenadante se eliminó. El precipitado se lavó con 1 ml etanol al 75% y se centrifugó a 10,000 x g por 5 min a 4° C; el sobrenadante se eliminó y el precipitado se dejó secar en la campana. Por último se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNAsas y se calentó a 55 °C por 10 minutos.

Posteriormente el RNA se trató con DNAsaQ agregando 5 µl de Buffer 5X y 5 µl de la DNasa y se incubó a 37° C por 10 min. La reacción se detuvo agregando 150 µl de agua libre de RNAsas y 500 µl de Tripure, se dejó reposar 3 minutos y se continuó con la extracción del RNA como se describió anteriormente pero con la mitad de los volúmenes. Posteriormente el RNA se resuspendió en 35 µl y se guardó en alícuotas de 7 µl a -70° C.

Para la cuantificación y determinación de pureza del RNA se midió la absorción a 260 y 280 nm (RNA y proteínas, respectivamente) en un espectrofotómetro (Perkin Elmer). Para que se considerara adecuada la muestra de RNA, la relación A260/A280 debió ser superior a 1.7 y para la cuantificación se usó la relación: $1U_{A260nm}=40 \mu\text{g/ml}$ de RNA. La integridad del RNA se analizó en minigeles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, el gel se corrió

a 75-80 V por 45 minutos, se observó en un transiluminador (BioRad) bajo luz UV y se capturó la imagen como la que se muestra en la **figura 5**.

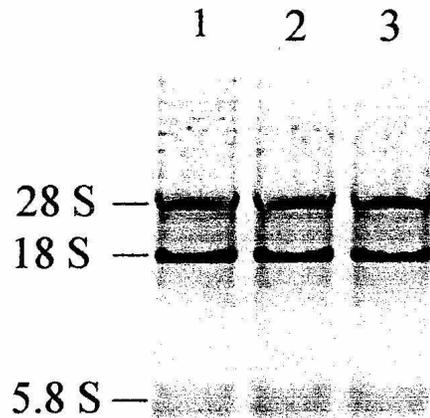


Figura 5. Ejemplo de RNA total extraído por el método de isotiocianato de guanidina con el reactivo Tripure. Se muestra la extracción de tres muestras.

Reacción de transcripción reversa

La transcripción reversa (RT), para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, se realizó mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa MMLV a partir de 1 µg de RNA total; también se utilizaron iniciadores al azar (random primers) que están formados por seis nucleótidos, éstos se unen aleatoriamente al RNA total para su retrotranscripción. Posteriormente se amplificó el cDNA para los protocolos con SYBR Green y con sondas TaqMan.

Cuantificación de los genes de las adipocitocinas por RT-PCR cuantitativa en tiempo real mediante SYBR Green

Se amplificó el cDNA mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master plus SYBR Green 1” para las adipocinas: adiponectina, resistina, el factor de transcripción PPAR- γ y β -actina (**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 de PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA emitiendo fluorescencia (**Figura 6**). La mezcla de reacción de 10 μ l contenía 0.5 mM de iniciadores de los genes y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM.

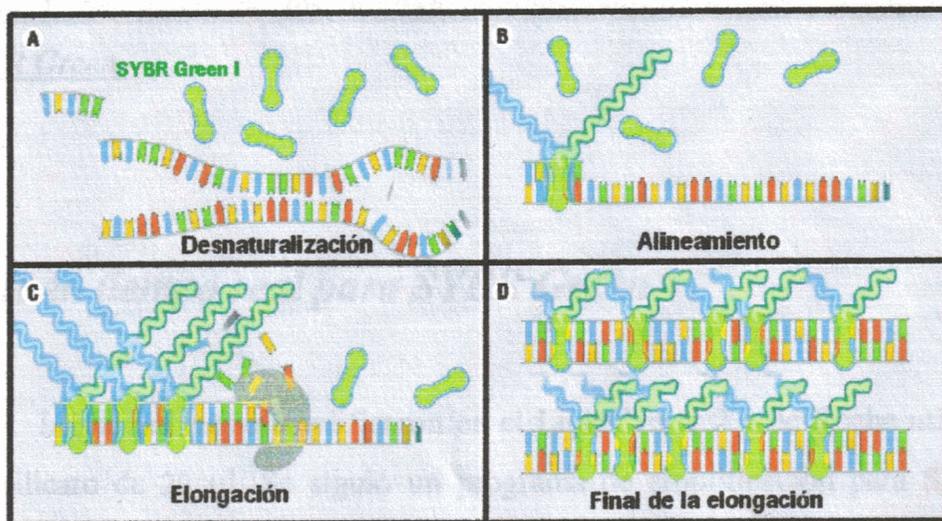


Figura 6. Mecanismo de emisión de fluorescencia por el SYBR Green. En la desnaturalización el SYBR Green no emite fluorescencia al encontrarse libre (A); en el alineamiento la fluorescencia que se emite sólo es proporcional a los iniciadores y las copias del ciclo anterior (B); en la elongación la fluorescencia detectable aumenta debido al aumento del número de surcos menores por el aumento de la cadena sintetizada (C); al final de la elongación la fluorescencia es máxima para el total de amplificado por ciclo (D)(Bustin et al., 2005).

<i>Gene</i>	<i>No. Genebank</i>	<i>Oligonucleotidos</i>	<i>Tamaño (bp)</i>
<i>Adiponectina</i>	<i>U37222</i>	5'-AGGACAAGGCCGTTCTCT 19pb 3'5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG 23pb	209
<i>Resistina</i>	<i>AF323080</i>	5' -GTACCCACGGGATGAAGAACC 21pb 3'5'-GCAGAGCCACAGGAGCAG 18 pb	252
<i>β-actina</i>	<i>X03672</i>	5' - CAAAAGCCACCCCCACTCCTAAGA 24 pb 3'5' - GCCCTGGCTGCCTCAACACCTC 22 pb	230
<i>PPAR-γ</i>	<i>NM_011146.1</i>	5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG 20 pb 3'5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC 21 pb	198

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleotidos específicos para los genes amplificados por SYBR Green.

PCR en tiempo real para SYBR Green

Las muestras se amplificaron en el LightCycler 2.0 de Roche utilizando capilares de borosilicato de 20 μ l. Se siguió un programa de amplificación para SYBR Green con un primer segmento de 10 min a 95° C para la preincubación de la enzima, un segundo segmento de amplificación constituido por 35 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95° C por 0 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.

Especificidad de los productos de PCR para los ensayos con SYBR Green

Se realizó un programa por el análisis de temperatura de fusión (melting) para verificar la amplificación específica, que consiste en el seguimiento de la desnaturalización lenta del producto final de amplificación, donde se obtiene el punto en el que la pérdida de la fluorescencia refleja la T_m del producto específico de amplificación. El programa consistió de una desnaturalización a 95° C con una rampa térmica de 20° C por seg, un realineamiento a 65° C durante 15 seg, a una rampa térmica de 20° C por seg; y por último, una desnaturalización lenta hasta 95° C a una rampa térmica de 0.1° C por seg y se cuantificó la fluorescencia de manera continua (Fasshauer et al., 2001a; Fasshauer et al., 2001b; Fasshauer et al., 2002; Fasshauer et al., 2003b) Posteriormente se verificó la especificidad de los productos del PCR mediante el corrimiento de los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos mediante bromuro de etidio.

Ensayos con sondas TaqMan para IL-6 y 18S

Para los ensayos de IL-6 y 18S se emplearon sondas de hidrólisis (TaqMan *assay on demand*, Applied Biosystems, marcados IL-6 con FAM y 18S con VIC), que son sondas con una secuencia específica, marcadas de manera dual: en el extremo 5' contienen una molécula reportera de fluorescencia (FAM o VIC) y en el 3' una molécula apagadora. El principio de la liberación de la fluorescencia consiste en que durante el paso de extensión de la PCR se lleva a cabo una reacción de hidrólisis que libera al fluorocromo reportero y lo aleja físicamente del apagador, emitiendo fluorescencia (**Figura 7**). Para lo anterior, se utilizó el kit de Roche TaqMan Master en un volumen de 10 µl que contiene: la mezcla 1X de la sonda que contiene oligonucleótidos y las sondas de los genes 18S e IL-6, más la mezcla de reacción 1X que contiene enzima Fast start, buffer y $MgCl_2$ 3.5 mM.

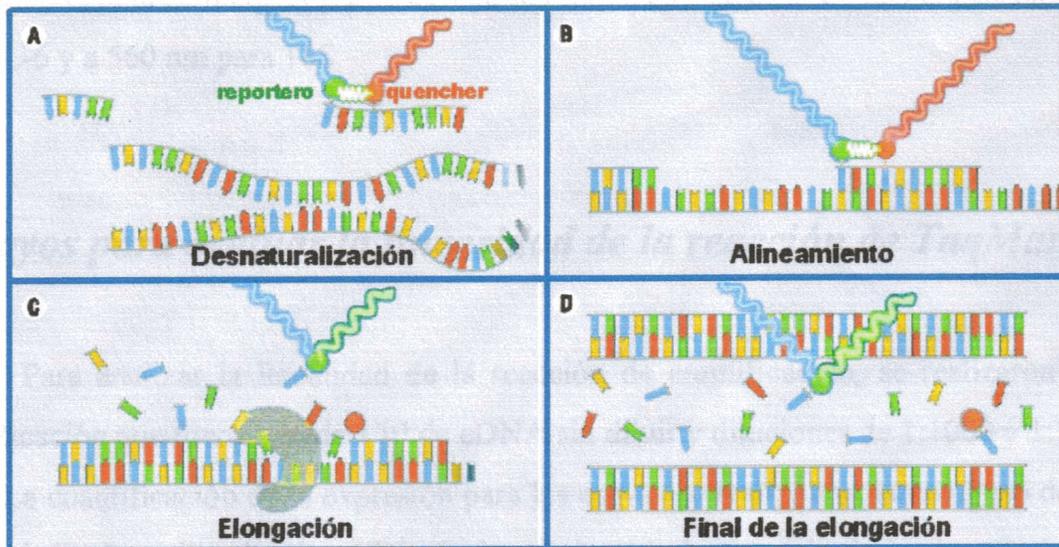


Figura 7 Mecanismo de emisión de fluorescencia por las sondas TaqMan. Las sondas TaqMan están compuestas por un oligonucleótido marcado de manera dual: en el 5' tiene un fluorocromo reportero y en el 3' un fluorocromo que actúa de apagador. La sonda reconoce de manera específica una secuencia dentro del amplificado de la secuencia a cuantificar. La fluorescencia se libera cuando la polimerasa con su actividad 3' exonucleasa hidroliza a la sonda durante la elongación (C), por lo que al final de la misma se obtiene la fluorescencia correspondiente a cada ciclo de la amplificación (D)(Bustin et al., 2005).

PCR en tiempo real para las sondas TaqMan

Las muestras se amplificaron en el LightCycler 2.0 de Roche utilizando capilares de borosilicato de 20 μ l. Se siguió un programa de amplificación con un primer segmento de 10 min a 95° C para la preincubación de la enzima, un segundo segmento de amplificación constituido por 35 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95° C por 10 seg. a una rampa térmica de 20° C por seg, un alineamiento a 60° C por 30 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 en este ciclo de manera sencilla a 530 nm para IL-6 y a 560 nm para 18S.

Ensayos para evaluar la linealidad de la reacción de TaqMan

Para analizar la linealidad de la reacción de amplificación, se realizaron curvas de amplificación que fueron desde 1 µl de cDNA sin diluir y diluciones de 1:1000 y 1:10000 para 18S. La cuantificación de la expresión para las curvas se realizó mediante el uso del software del LightCycler utilizando el análisis de la máxima de la segunda derivada que determina el punto de cruce de cada una de las muestras de manera individual mediante un algoritmo que identifica el primer punto de inflexión en la reacción de PCR representado por la ganancia en la fluorescencia. Este punto corresponde a una relación que es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración inicial de templado.

Análisis de cuantificación relativa

Para el análisis de la expresión de las muestras se utilizó el método del $\Delta\Delta Ct$ debido a que la eficiencia de amplificación para cada primer fue muy similar 1.91 +/- 0.01

$$\Delta Ct = C_p \text{ blanco} - C_p \text{ referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta C_p \text{ tratamientos experimentales} - \Delta Ct \text{ tratamiento calibrador}$$

$$\text{Resultado final } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Animales de experimentación

Se trabajó con ratones *Mus musculus*, cepa CD-1, machos (30-40g) criados en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en una dieta básica para roedores y con libre acceso a agua y alimento. Con 20 animales se formaron dos grupos control con 10 ratones cada uno: un grupo control sano (GCS1) recibió el vehículo (amortiguador de citratos 0.1 M pH 5); el segundo grupo fue el control diabético (tratado únicamente con STZ, GCD2). A otros dos grupos de 10 animales cada uno se les dió glicina y pioglitazona (tiazolidinediona empleada en el tratamiento de la DT2) diariamente por vía oral durante 15 días, antes de la inyección de STZ y durante el tiempo que vivieron. La STZ se disolvió en el vehículo antes de su uso. Los animales recibieron STZ a razón de 200 mg/kg por vía intraperitoneal.

Al inicio y a los días 14, 23, 32, 35, 37 y 45 se determinaron peso corporal (PC), consumo de alimento (CA), consumo de agua (CW) y glucemia de las muestras obtenidas de la vena caudal. Al inicio y los días 23 y 36 se tomaron las muestras sanguíneas del seno orbital del ojo de animales seleccionados al azar para determinar, hemoglobina glucosilada HbA1c, transaminasa glutámico oxálica (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), colesterol y triglicéridos.

Determinación de parámetros bioquímicos

Se tomaron muestras sanguíneas del seno orbital del ojo antes de la administración de la primera dosis de vehículo, STZ o glicina y cada 15 días durante 3 meses para determinar: peso corporal, el consumo de alimento y agua, glucemia, HbA1c, TGO, TGP, triglicéridos y colesterol. La glucosa en sangre se determinó usando un glucómetro Accutrend Sensor Comfort (Roche), la HbA1c en el aparato DCA 2000 (Bayer), TGP, TGO, colesterol,

triglicéridos, ácido úrico y creatinina se midieron usando tiras reactivas para Reflotrón Plus (Roche).

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de las medias individuales \pm suma de los errores estandar, las diferencias estadísticas para cada tratamiento se evaluaron mediante la prueba de *t-student*.

RESULTADOS

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

La línea celular 3T3-L1 se diferenció de fibroblastos a adipocitos mediante un “coctel” de diferenciación que incluye insulina, acetato de dexametasona y metil-isobutil xantina. Los adipocitos 3T3-L1 se caracterizaron por tener acumulación de grasa en múltiples vesículas lo que se denomina multilocular. Las vesículas son visibles al microscopio de luz. La diferenciación se consideró exitosa cuando más del 90% de las células adquirieron el fenotipo de adipocitos (**Figura 8**).

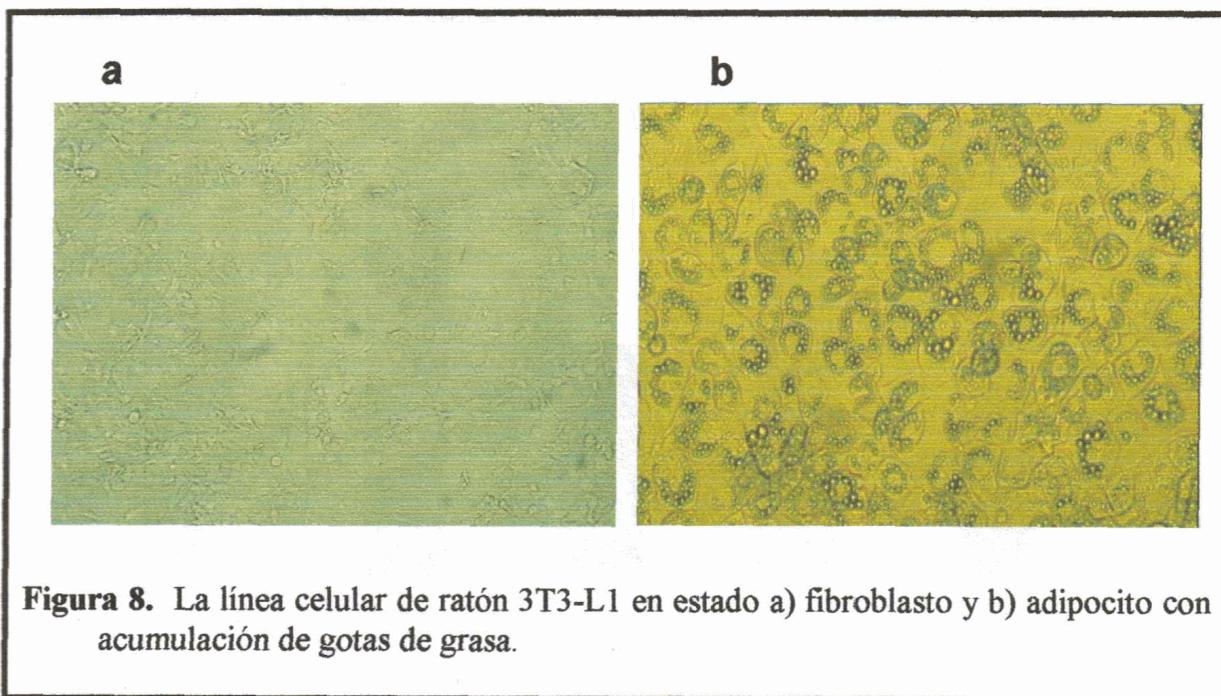


Figura 8. La línea celular de ratón 3T3-L1 en estado a) fibroblasto y b) adipocito con acumulación de gotas de grasa.

El tratamiento con insulina 10 nM por 8 horas disminuye la incorporación de glucosa en adipocitos 3T3-L1

Se cuantificó la cantidad de 2-DO-³H glucosa que incorporaron los adipocitos 3T3-L1 en cuatro experimentos independientes, entre los días de diferenciación 8 y 10 en presencia de insulina 100 nM durante 20 minutos. Se presentó una disminución del transporte de la glucosa dependiente de insulina del 40 % al comparar el tratamiento control normal (C) contra el tratamiento de inducción de resistencia a la insulina (R) y fue de 52% al compararlo contra el de la resistencia más glicina 10 mM (R+ Gly) $p < 0.01$. La glicina 10 mM por 8 horas no mostró efecto significativo sobre el transporte de la glucosa (Gly) (**Figura 9**).

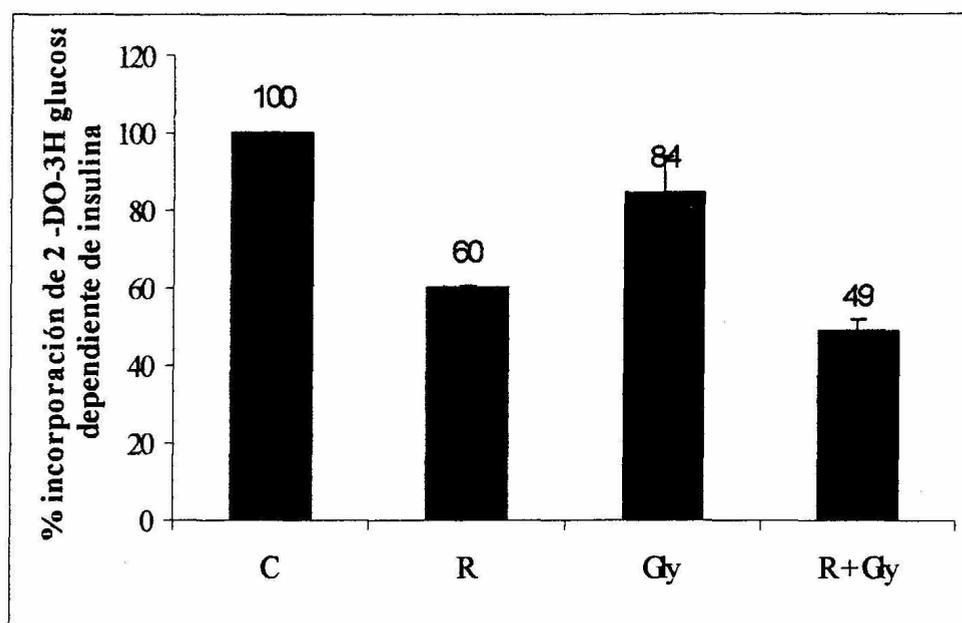


Figura 9. La incorporación de 2- DO ³H glucosa disminuye con el tratamiento de insulina. Adipocitos 3T3-L1 entre el 8 y 10 día de diferenciación fueron tratados con 10 nM de insulina (R), 10 mM de Glicina (Gly), 10 nM de insulina más 10 mM de glicina (R+Gly) y un tratamiento control sin estimular (C). Los resultados son las medias de cuatro experimentos independientes más los errores estándar. $P > a 0.05$ al comparar C con R, R + Gly y Gly con R + Gly.

Linearidad y especificidad en los ensayos de PCR en tiempo Real

Se evaluó la linealidad de los ensayos para cuantificar la expresión del RNAm de las diferentes adipocitocinas mediante reacciones de PCR en tiempo real, los experimentos se realizaron por duplicado y al menos en dos corridas y con dos cDNA independientes y con diluciones seriales del cDNA de adipocitos 3T3-L1 sin tratamiento (1, 1:10, 1:100, 1:1000) para los genes de adiponectina, resistina, PPAR- γ y β -actina empleado SYBR Green como reportero de fluorescencia. La especificidad se evaluó al determinar el tamaño de los productos de amplificación en geles de agarosa y al analizar la temperatura de disociación mediante el análisis melting observándose un solo pico para cada uno de los protocolos de amplificación de SYBR Green (**Figuras 10-12**).

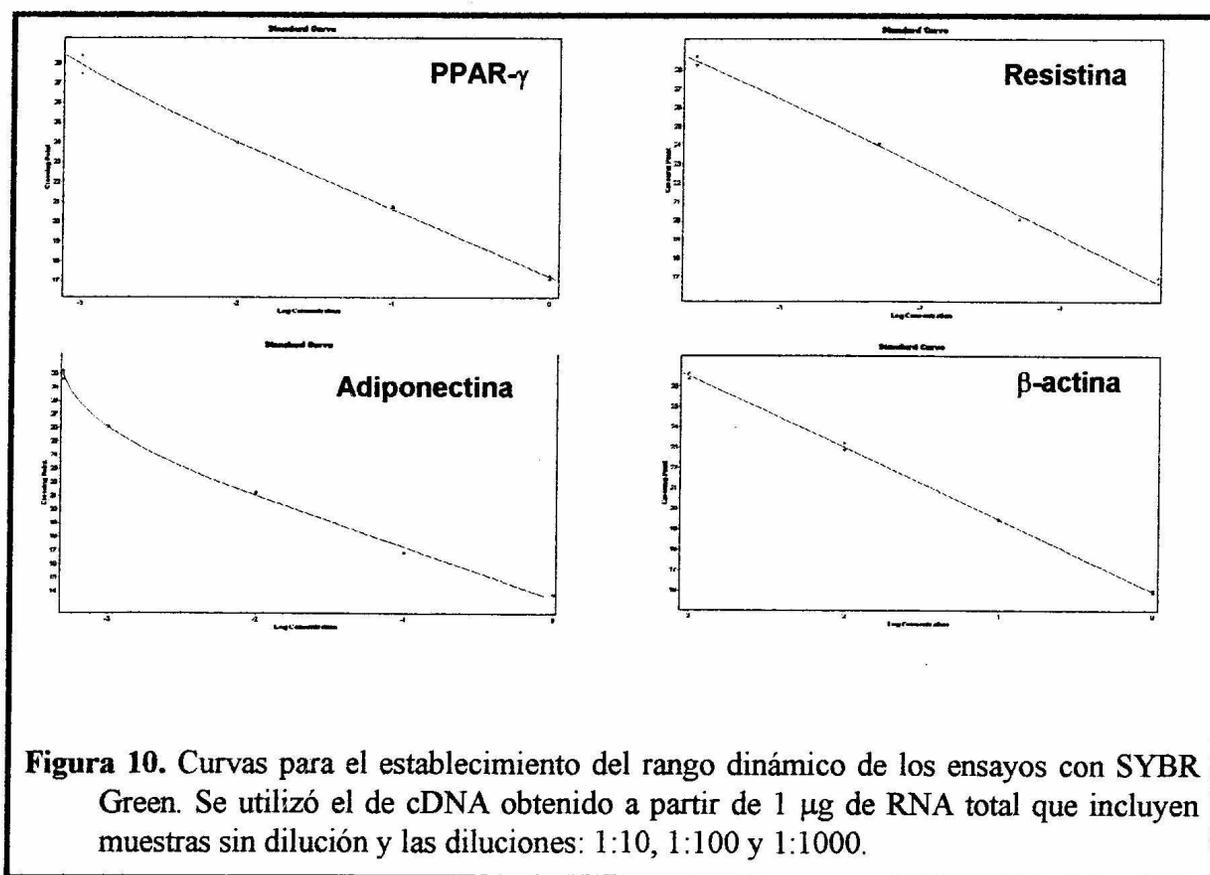


Figura 10. Curvas para el establecimiento del rango dinámico de los ensayos con SYBR Green. Se utilizó el de cDNA obtenido a partir de 1 μ g de RNA total que incluyen muestras sin dilución y las diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000.

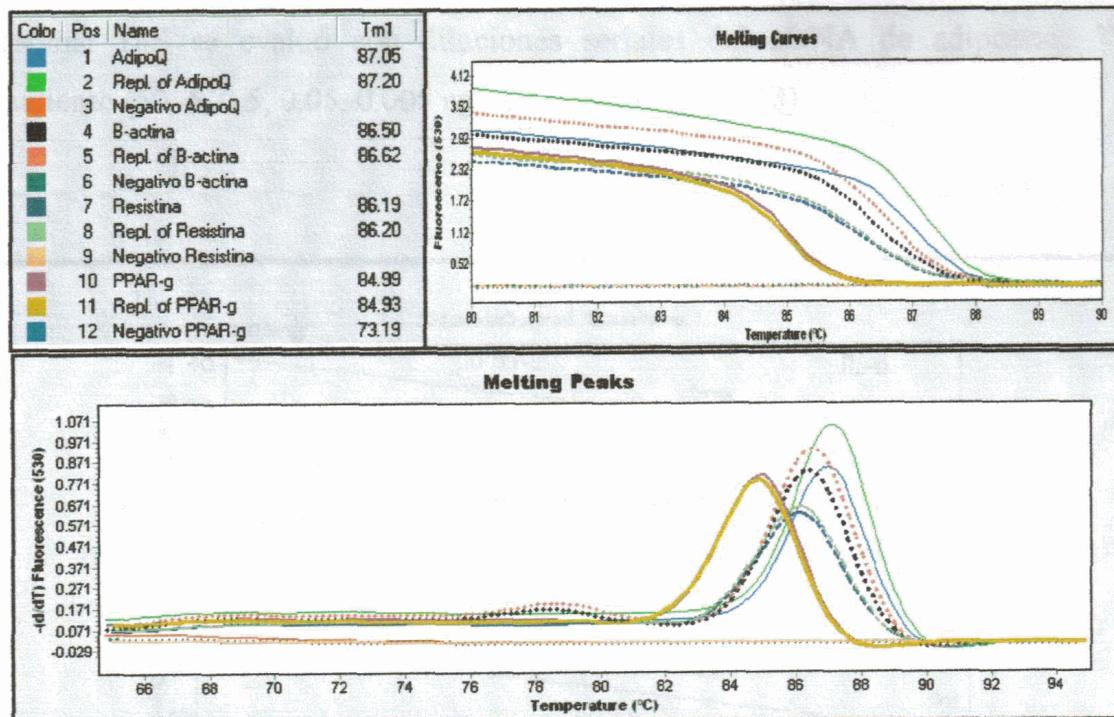


Figura 11 . Análisis de curvas de disociación para las amplificaciones de los genes de adiponectina (Adipo Q), β -actina, resistina y el activador del receptor peroxisomal (PPAR- γ).

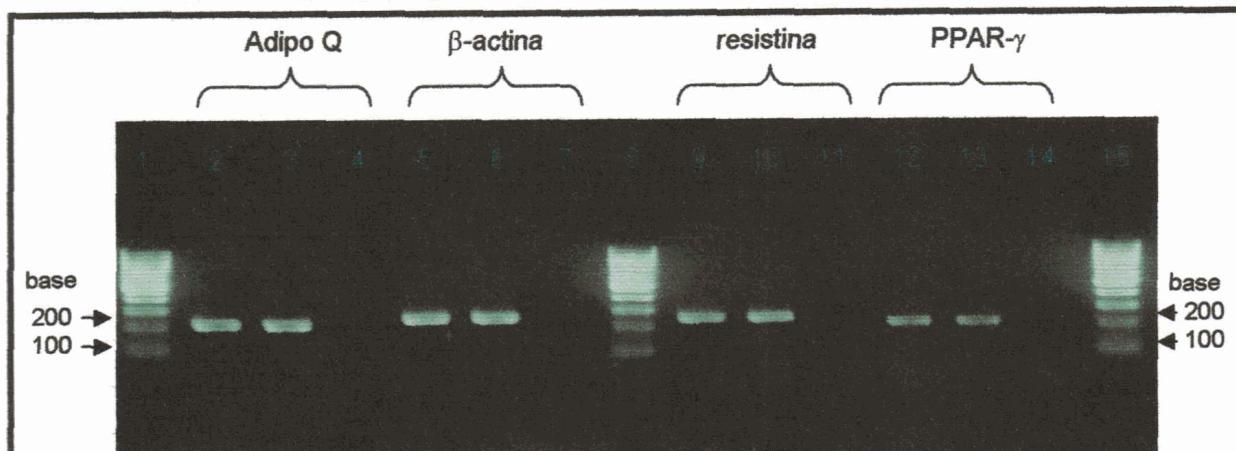


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las amplificaciones de los genes de adiponectina (Adipo Q), β -actina, resistina y el activador del receptor peroxisomal (PPAR- γ). Se presentan los resultados de dos amplificaciones y un control negativo (sin cDNA) de cada uno de los genes.

La linealidad de los ensayos de cuantificación del RNAm de IL-6 y del RNA ribosomal 18S se evaluó con diluciones seriales del cDNA de adipocitos 3T3-L1 sin tratamiento (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 ng de cDNA) (**Figura 13**).

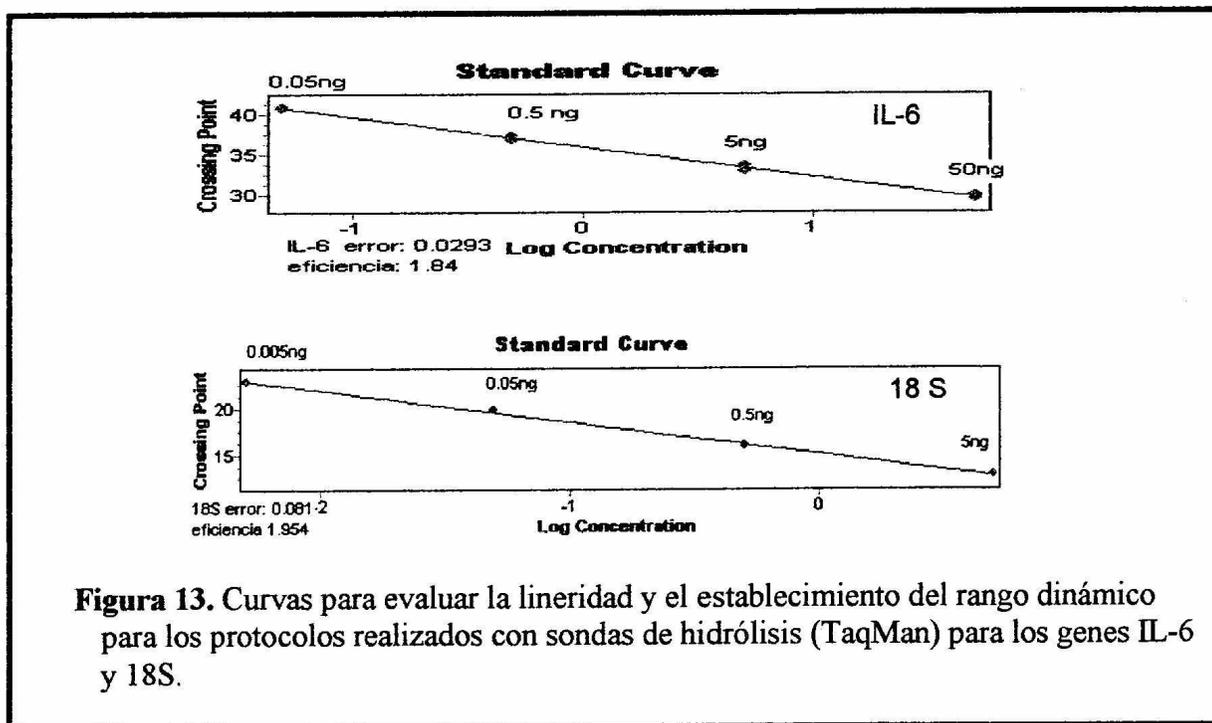


Figura 13. Curvas para evaluar la linealidad y el establecimiento del rango dinámico para los protocolos realizados con sondas de hidrólisis (TaqMan) para los genes IL-6 y 18S.

La expresión del RNAm de adiponectina y resistina se estimula durante la diferenciación de las células 3T3-L1

Se analizó la expresión del RNAm adiponectina y resistina durante la diferenciación en cuatro RNAs provenientes de dos experimentos independientes. Al comparar la expresión de adiponectina de preadipocitos 3T3-L1 confluentes en el día 0 de diferenciación (T0) con el día 2 (T2) la síntesis del RNAm aumentó 60 veces, 500 el día 4 (T4) y hasta 1000 veces el día 8 (T8) $p > 0.01$; T0 y también T2 vs T4 y T8 (**Figura 14**). Al comparar la expresión de resistina de preadipocitos 3T3-L1 confluentes en el día 0 de diferenciación (T0), la síntesis del RNAm de resistina aumentó 30 veces el día 2 (T2), 100 el día 4 (T4) y hasta 250 veces en el día 8 (T8) $p > 0.01$ (**Figura 14**).

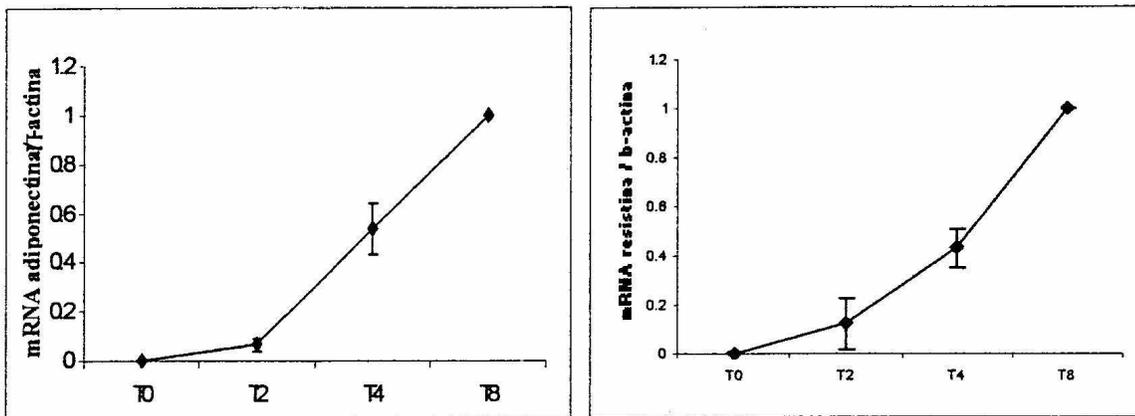


Figura 14. La expresión de adiponectina y resistina dependen del grado de la diferenciación. Preadipocitos 3T3-L1 a confluencia fueron diferenciados y el RNA total de los días 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4) y 8 (T8) se empleó para cuantificar la expresión de los genes de adiponectina y resistina por RT-PCR en tiempo real, normalizando con β -actina. Los resultados son las medias de cuatro experimentos más los errores estándar. $P > 0.01$ al comparar T0 y T2 con T4 y T8.

La expresión de PPAR- γ como marcador de diferenciación se estimula durante la diferenciación

Se analizó la expresión del RNAm PPAR- γ durante la diferenciación en cuatro RNAs provenientes de dos experimentos independientes. Al comparar la expresión de PPAR- γ de preadipocitos 3T3-L1 confluentes en el día 0 de diferenciación T0, la síntesis del RNAm de PPAR- γ aumentó considerablemente hasta 13 veces el día 2 (T2), 17 el día 4 (T4) y 33 veces en el día 8 (T8) con $p < 0.01$ T0 vs T4 y T8 y T2 y T4 vs T8 (**Figura 15**).

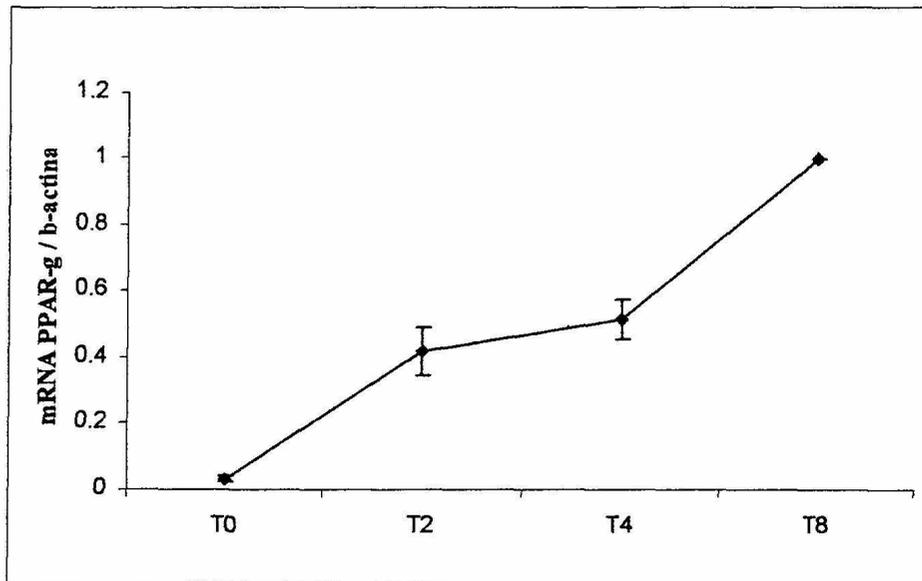


Figura 15. La expresión de PPAR- γ depende del grado de la diferenciación. Preadipocitos 3T3-L1 a confluencia fueron diferenciados y el RNA total de los días 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4) y 8 (T8) se empleó para cuantificar la expresión del gene de PPAR- γ por RT-PCR en tiempo real, normalizando con β -actina. Los resultados son las medias de cuatro experimentos más los errores estándar $P > 0.01$ al comparar T0 con T4 y T8 y T2 con T8.

La expresión de IL-6 se inhibe durante la diferenciación

Se analizó la expresión del RNAm IL-6 durante la diferenciación. Al comparar la expresión de preadipocitos 3T3-L1 confluentes en el día 0 de diferenciación T0, la síntesis de IL-6 disminuyó 0.5 el día 2 (T2), 4 el día 4 (T4) y hasta 10 veces en el día 8 (T8) $p < 0.01$ T0 vs T4 y T8 y T2 y T4 vs T8 (**Figura 16**).

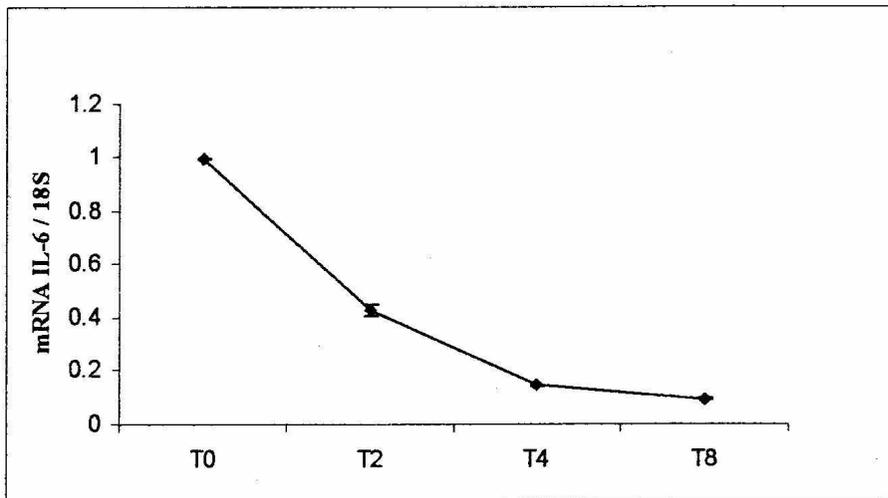


Figura 16. La expresión de IL-6 disminuye al aumentar el grado de la diferenciación. Preadipocitos 3T3-L1 a confluencia fueron diferenciados y el RNA total de los días 0 (T0), 2 (T2), 4 (T4) y 8 (T8) se empleó para cuantificar la expresión del gene de IL-6 por RT-PCR en tiempo real, normalizando con 18S. Los resultados son las medias de cuatro experimentos más los errores estándar. $P > a 0.01$ al comparar T0 con T4 y T8 y T2 con T8.

La insulina 10 nM inhibe la expresión de adiponectina y resistina

Se ha reportado previamente que la insulina en una dosis de 100 nM durante 16 horas disminuye la expresión de los RNAm tanto de adiponectina como de resistina en adipocitos 3T3-L1. En el presente trabajo, para evaluar la expresión de estas dos adipocinas se usó una dosis de insulina más cercana a la fisiológica que es de 10 nM durante 8 horas. Al comparar la expresión del RNA de cuatro experimentos independientes del tratamiento contra el control (C) se observó que la insulina 10 nM (R) disminuyó la expresión de adiponectina 50% y resistina 30% $p < 0.05$, también al compararlo con insulina más glicina (R + Gly) adiponectina disminuyó 52%, pero no resistina ($p < 0.01$). El tratamiento con glicina no produjo ningún efecto significativo para ninguno de los RNAm de las dos adipocinas (Figura 17).

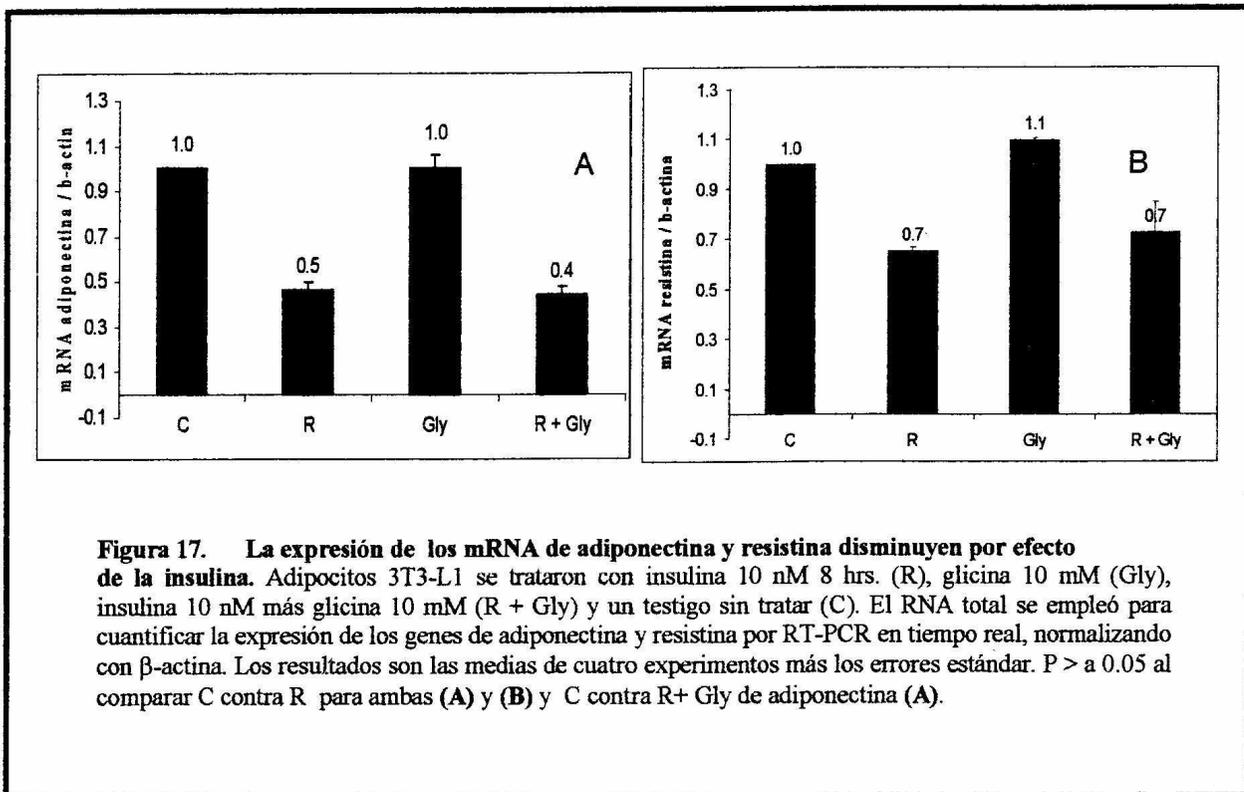


Figura 17. La expresión de los mRNA de adiponectina y resistina disminuyen por efecto de la insulina. Adipocitos 3T3-L1 se trataron con insulina 10 nM 8 hrs. (R), glicina 10 mM (Gly), insulina 10 nM más glicina 10 mM (R + Gly) y un testigo sin tratar (C). El RNA total se empleó para cuantificar la expresión de los genes de adiponectina y resistina por RT-PCR en tiempo real, normalizando con β -actina. Los resultados son las medias de cuatro experimentos más los errores estándar. $P > 0.05$ al comparar C contra R para ambas (A) y (B) y C contra R+ Gly de adiponectina (A).

La expresión de IL-6 disminuye por efecto de la glicina

Al comparar el RNA de tres experimentos independientes contra el control normal (C) se observó que glicina 10 mM (Gly) disminuyó la expresión de IL-6 31% ($p < 0.05$), se observó también una disminución en el tratamiento de resistencia a la insulina (R) ($p < 0.05$). (**Figura 18**).

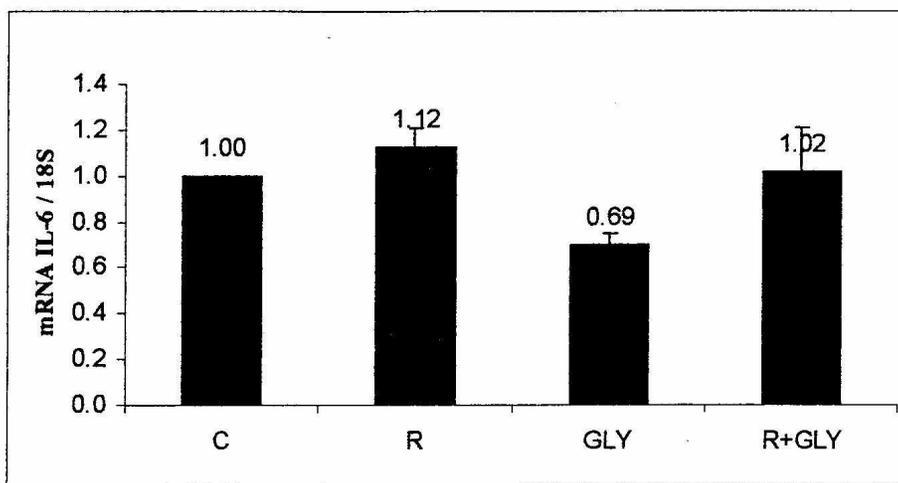
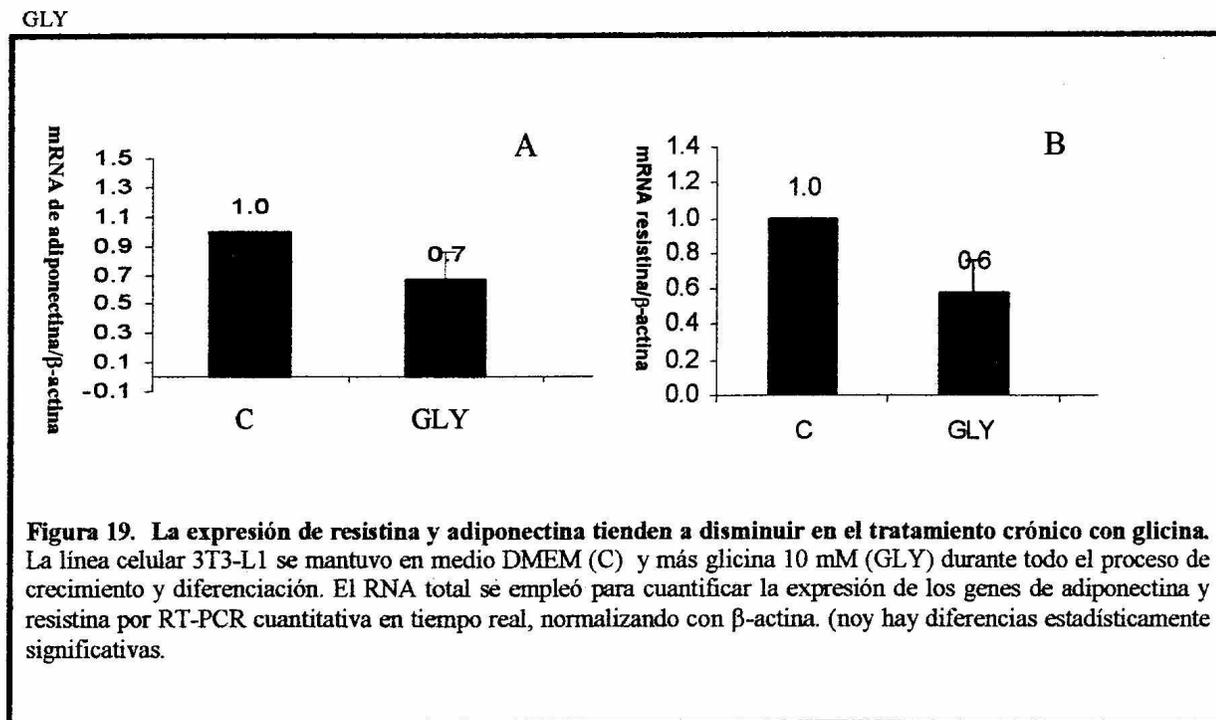


Figura 18. La expresión del mRNA de IL-6 disminuye por efecto de la insulina. Adipocitos 3T3-L1 se trataron con insulina 10 nM 8 hrs. (R), glicina 10 mM (Gly), insulina 10 nM más glicina 10 mM (R + Gly) y un testigo sin tratar (C). El RNA total se empleó para cuantificar la expresión de IL-6 por RT-PCR en tiempo real, normalizando con 18S. Los resultados son las medias de tres experimentos más la desviación estándar. $p > 0.05$ al comparar C y Gly.

La expresión de adiponectina y resistina con tratamiento crónico de glicina

El cultivo de la línea celular 3T3-L1 se mantuvo en condiciones estándares (C) y más glicina 10 mM (GLY) durante todo el proceso de crecimiento y diferenciación. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en términos de la síntesis del RNAm, se observaron ligeros cambios en al comparar la expresión del RNAm de resistina y adiponectina en las células diferenciadas en condiciones estándar (C) contra las muestras tratadas con glicina 10 mM (GLY) (**Figura 19**).



La glicina no modificó el consumo de agua y de alimento en los animales tratados con STZ

En el grupo control sano, el CA (6.4 g/animal) y CW (9.1 ml/animal) permanecieron sin cambios durante toda la prueba; en el grupo control diabético el CA y el CW incrementaron de manera significativa con respecto al control sano ($p < 0.05$); en el caso del grupo tratado con pioglitazona (Pio) se observó un comportamiento similar al control diabético en cuanto al PC, a la glucemia y al CW. Sin embargo, el CA permaneció similar al control sano. Por último, el grupo tratado con glicina no mostró cambios importantes en el CW ni en el CA (Tabla 2)

Tiempo (días)	Control sano		Diabético más Glicina		Diabético más Pioglitazona		Diabético	
	Alimento	Agua	Alimento	Agua	Alimento	Agua	Alimento	Agua
	CA	CW	CA	CW	(CA)	(CW)	(CA)	(CW)
0	6.4 ± 1.0 (n=10)	9.1 ± 1.6 (n=10)	5.7 ± 0.5 (n=10)	7.9 ± 1.0 (n=10)	6.8 ± 1.1 (n=10)	9.9 ± 2.9 (n=10)	6.3 ± 0.6 (n=10)	8.2 ± 1.0 (n=10)
14	5.8 ± 0.5 (n=8)	7.7 ± 0.9 (n=8)	4.8 ± 0.3 (n=10)	4.7 ± 0.5 (n=10)	5.7 ± 0.5 (n=10)	6.7 ± 1.0 (n=10)	5.5 ± 0.6 (n=9)	6.0 ± 1.2 (n=9)
23	6.8 ± 1.4 (n=7)	9.8 ± 0.8 (n=7)	3.9 ± 1.0 (n=6)	6.5 ± 1.2 (n=6)	6.7 ± 1.4 (n=8)	8.9 ± 1.3 (n=8)	5.8 ± 1.6 (n=8)	7.7 ± 1.3 (n=8)
32	6.4 ± 0.7 (n=6)	9.1 ± 1.1 (n=6)	7.1 ± 1.2 (n=5)	8.9 ± 4.2 (n=5)	5.6 ± 1.3 (n=8)	7.9 ± 2.7 (n=8)	3.8 ± 1.5 (n=7)	5.3 ± 0.9 (n=7)
35	6.1 ± 0.3 (n=6)	8.9 ± 0.8 (n=6)	7.8 ± 1.4 (n=5)	12.7 ± 6.7 (n=5)	5.3 ± 0.9 (n=8)	10.1 ± 4.8 (n=8)	6.6 ± 2.6 (n=4)	11.7 ± 5.7 (n=4)
37	6.2 ± 1.1 (n=6)	8.5 ± 1.1 (n=6)	9.0 ± 0.9 (n=5)	19.7 ± 0.7 (n=5)	6.2 ± 1.0 (n=7)	19.0 ± 4.9 (n=7)	8.8 ± 2.0 (n=4)	19.7 ± 1.4 (n=4)
45	6.1 ± 1.1 (n=6)	10.7 ± 1.7 (n=6)	8.5 ± 2.7 (n=5)	27.6 ± 7.4 (n=5)	6.6 ± 2.0 (n=4)	22.0 ± 6.0 (n=4)	8.4 ± 3.2 (n=2)	27.0 ± 5.2 (n=2)

Tabla 2. Consumo de agua (ml) y alimento (g) durante el tratamiento con glicina.

La administración diaria de glicina no modifica los niveles de glucosa, HbA1c, colesterol, triglicéridos, TGO y TGP.

En el grupo sano, La HbA1c se mantuvo en alrededor de 4%, que corresponde a valores normales, en los animales del grupo control sano; en el control diabético la HbA1c y los niveles de TGO se incrementaron a $7.05 \pm 0.55\%$ y 121 U/l, respectivamente; mientras que los demás parámetros permanecieron sin cambios. En el caso del grupo tratado con pioglitazona (Pio) La HbA1c y los triglicéridos experimentaron un incremento a 7.8 ± 0.55 y 105.4 mg/dl, respectivamente. Por último, en el grupo tratado con glicina, la HbA1c se mantuvo 1.4 % por debajo de los valores del control diabético, aunque por arriba de los valores del grupo control sano, no mostrando diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Así mismo, no hubo cambios importantes en los demás parámetros con respecto al control diabético (**Tabla 3**).

	% Hemoglobina glucosilada			Trigliceridos (mg/dl)			TGP (U/l)			TGO (U/l)			Colesterol (mg/dl)		
	Día 0	Día 23	Día 36	Día 0	Día 23	Día 36	Día 0	Día 23	Día 36	Día 0	Día 23	Día 36	Día 0	Día 23	Día 36
Control sano	4.4 ± 0.2 n=3	4.3 ± 0.3 n=2	4.0 ± 0.3 n=3	84.6 ± 20.7 n=2	79.0 ± 14.5 n=3	96.0 ± 36.7 n=2	24.1 ± 3.5 n=2	18.4 ± 2.7 n=3	74.7 ± 17 n=2	44.6 ± 1.4 n=2	27.7 ± 25.3 n=3	100 ± 67.0 n=2	138.0 ± 13 n=2	109.6 ± 6.6 n=3	115.0 ± 7.0 n=2
Control Diabético (stz)	4.4 ± 0.2 n=3	4.3 ± 0.3 n=2	7.1 ± 0.7 n=2	84.6 ± 20.7 n=2	79.0 ± 5 n=3	76.9 ± 9.8 n=2	24.1 ± 3.5 n=2	18.4 ± 2.7 n=3	27.5 ± 3.5 n=2	44.6 ± 1.4 n=2	27.7 ± 25.3 n=3	121.2 ± 49.7 n=2	138 ± 13.0 n=2	109.3 ± 6.6 n=3	119
(stz) más Pioglitazona	4.4 ± 0.2 n=3	4.0 ± 0.7 n=3	7.1 ± 0.7 n=2	95.0 ± 35.3 n=2	87.5 ± 16.7 n=3	105.4 ± 22.2 n=3	35.1 ± 6.8 n=2	31.7 ± 3.3 n=3	32.0 ± 4.5 n=3	83.5 ± 37.4 n=2	85.9 ± 47.8 n=3	103.6 ± 13.7 n=3	129.5 ± 2.5 n=2	109.5 ± 8.9 n=3	117.5 ± 2.8 n=3
Diabético (stz) más Glicina	4.4 ± 0.2 n=3	4.8 ± 0.1 n=3	5.7 ± 2.7 n=4	95.0 ± 35.3 n=2	79.6 ± 18.3 n=4	88.7 ± 15.8 n=4	35.1 ± 6.8 n=2	17.1 ± 8.9 n=4	31.6 ± 5.9 n=4	83.5 ± 37.4 n=2	36.9 ± 20.8 n=4	88.6 ± 37.3 n=4	129.5 ± 2.5 n=2	117.7 ± 13.8 n=4	124.0 ± 4.3 n=4

Tabla 3. Parámetros bioquímicos del experimento *in vivo*

La glicina causó un aumento en la sobrevida de ratones tratados con STZ

En el grupo control sano, la glucosa en sangre (95.5 mg/dl) y el PC permanecieron sin cambios durante toda la prueba y la sobrevida se mantuvo estable en 90 % de los animales. En los animales del grupo diabéticos se observó un decremento en el PC al final de la prueba y un aumento progresivo de la glucemia después de la administración de la STZ, alcanzando valores de 466.5±37.5 mg/dl. durante el transcurso del experimento y después de la administración de STZ los animales empezaron a morir, quedando, al final del estudio (día 45), únicamente 40% de los animales vivos. Se dió seguimiento hasta el día 58 en el que ningún animal del grupo con STZ y con Pio quedaron con vida. En el caso del grupo tratado con pioglitazona (Pio) se observó un comportamiento similar al control diabético en cuanto a la glucemia. Se observó la muerte de todos los animales después del día 35. Por último, el grupo tratado con glicina no mostró cambios importantes ni la glucemia, a diferencia de los otros grupos tratados con agua y la tiazolidinediona, sólo un animal tratado con glicina murió durante todo el experimento y hasta después de los 58 días de tratamiento.

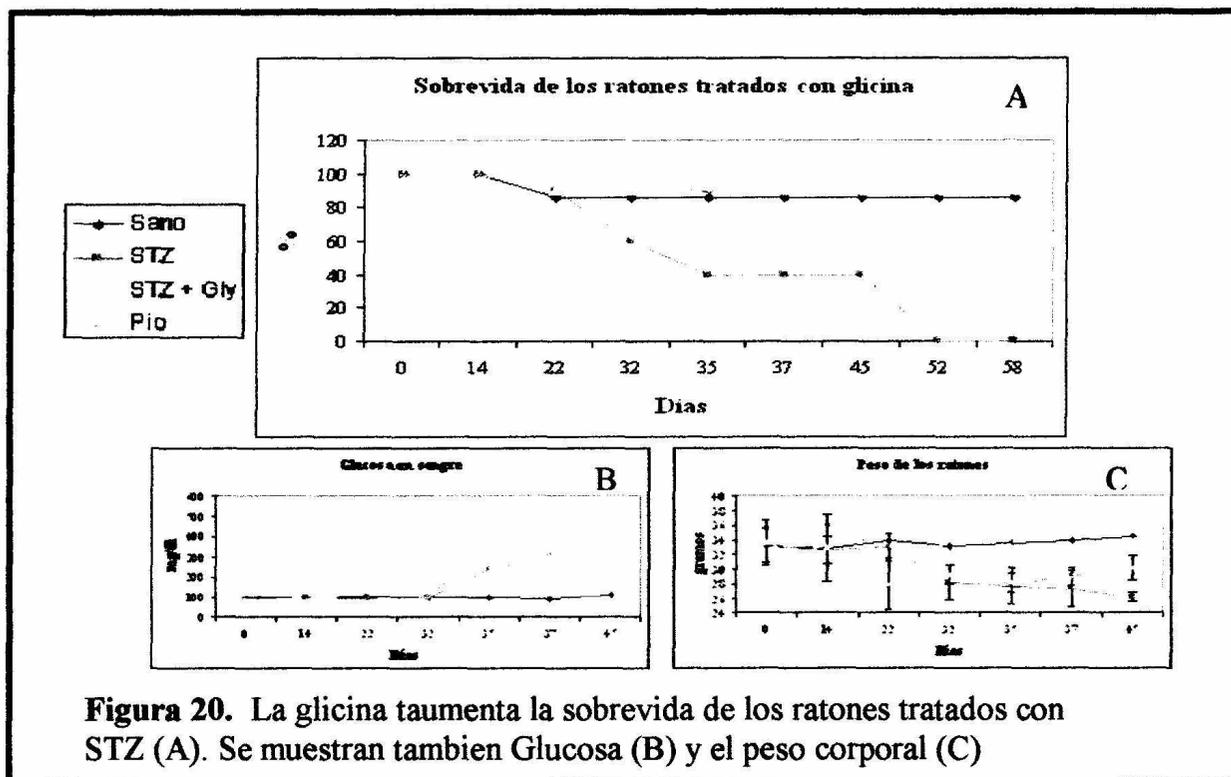


Figura 20. La glicina taumenta la sobrevida de los ratones tratados con STZ (A). Se muestran tambien Glucosa (B) y el peso corporal (C)

DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la glicina como agente antiinflamatorio y protector en la sobrepeso, empleando un modelo *in vitro* (células en cultivo de adipocitos 3T3-L1) y uno *in vivo* (animales tratados con STZ). Ambos modelos se estudiaron en condiciones que tratan de simular la diabetes tipo 2 que se presenta en el humano, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la enfermedad y su relación con otros padecimientos, tal como la obesidad, así como continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para su control. Hoy sabemos que existe gran similitud entre los linajes celulares de tipo inmune con los que forman parte del tejido adiposo; que condiciones como la obesidad, la DT2 y la resistencia a la insulina son enfermedades que presentan un perfil inflamatorio común y que estas condiciones son las principales causas de morbimortalidad en México.

Las células 3T3-L1 son un modelo de tejido adiposo blanco, de fenotipo de fibroblasto, estas células se diferenciaron a un fenotipo de adipocito, observándose los cambios característicos del mismo, entre los que se observó la acumulación de gotas de grasa, congruente con la información que existe sobre esta línea celular (Gregoire et al., 1998). En la presente investigación se determinó aumento en los niveles de expresión de PPAR- γ , cambios fenotípicos en las células y un aumento en la expresión de adiponectina y resistina, confirmando lo reportado anteriormente sobre la regulación de la expresión de adiponectina por PPAR- γ (Gustafson et al., 2003). En este sentido, existe amplia evidencia de que PPAR- γ , junto con otros factores de transcripción como CEBP y SRBP-1, juegan un papel fundamental sobre la regulación de la diferenciación de los adipocitos, teniendo como principal función el arresto de la división celular (Gregoire et al., 1998).

Además de lo anterior, este es el primer trabajo en el que se caracteriza por PCR en tiempo real el perfil de expresión de IL-6 durante la diferenciación, de ahí que se pueda concluir que a pesar de que resulta importante la caracterización de dicha expresión en los

adipocitos totalmente diferenciados, no se debe descartar la relevancia de la expresión de esta adipocitocina en otros linajes que se encuentran presentes en el tejido adiposo.

En el presente trabajo se empleó en un modelo de resistencia a la insulina con y sin glicina para evaluar la expresión de los genes de las adipocitocinas. Las células se incubaron con una dosis de insulina cercana a la fisiológica 10 nM durante 8 horas y se obtuvo una disminución del transporte de la glucosa, conforme a lo reportado (Thomson et al., 1997). Por otro lado, en este modelo se disminuyó la expresión del RNAm de adiponectina y resistina, demostrándose por primera vez que una dosis más cercana a la fisiológica tiene el mismo efecto que la reportada en la literatura con 100 nM de insulina por 16 horas, confirmando el efecto que la hiperinsulinemia induce la disminución de la expresión de la adiponectina (Fasshauer et al., 2002; Haugen et al., 2001). En cuanto a la glicina, no se encontró que aumentara la expresión de adiponectina, a pesar de ser una citocina con efectos antiinflamatorios como es el caso de IL-10; esto podría deberse a que la vía de señalización por la que la insulina induce la disminución en la expresión de adiponectina, no tenga el paso donde la glicina inhibe la movilización de calcio por el interior de la célula (Spittler et al., 1999) y también debido a que no existiera suficiente tiempo de incubación para inducir un efecto indirecto. Se sabe que la resistina se comporta como una adipocitocina proinflamatoria, el hecho de que el tratamiento con glicina no modificara la expresión de su RNAm en el modelo de resistencia a la insulina empleado, no descarta del todo un posible efecto de la glicina, debido a que el tiempo de incubación con este aminoácido pudo ser insuficiente (Fasshauer y Paschke, 2003).

El hecho de que la insulina no mostró un aumento significativo de la expresión de IL-6 a las 8 horas en los experimentos de resistencia a la insulina, también podría deberse al tiempo de incubación ya que Fasshauer había reportado un aumento de la expresión en un tiempo de 16 horas; sin embargo, la glicina disminuyó la expresión de IL-6 en los adipocitos control mas glicina (sin insulina), que podría estar mediado por la disminución de la activación de NF-kB (Fasshauer et al., 2003a; Fasshauer et al., 2003b). Si en el futuro se encuentran mayores evidencias de que la glicina disminuye las concentraciones séricas de IL-6, como lo observado

en paciente con DT2 tratados con glicina en dosis orales (manuscrito en preparación), entonces, el incluir este aminoácido en la dieta de personas con patologías asociadas con inflamación, como la obesidad y la DT2, sería de gran beneficio.

Se realizó también un esquema de tratamiento crónico con glicina 10 mM, aunque no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de adiponectina y resistina, sin embargo, se observó cierta tendencia a la disminuir la expresión de ambas. Hecho quizá debido a una modificación en el programa de diferenciación al alterar la composición de aminoácidos en el medio, ya que estos activan la fosforilación de la proteína ribosomal S6 vía mTOR, dándose así un desbalance en las vías de señalización tanto dependiente de Akt como de S6 (Gregoire, 2001). Por otro lado, en el caso de la resistina, el tiempo de incubación de 8 horas al parecer no fue suficiente para que se modificara su expresión en presencia de glicina, mientras que en el tratamiento crónico si se observó cierta tendencia a disminuirla, pudiendo darse este efecto de manera similar al demostrado para las citocinas proinflamatorias en los linajes celulares de tipo inmune, dependiente de la dismunición de la activación de NF- κ B (Fasshauer et al., 2001b).

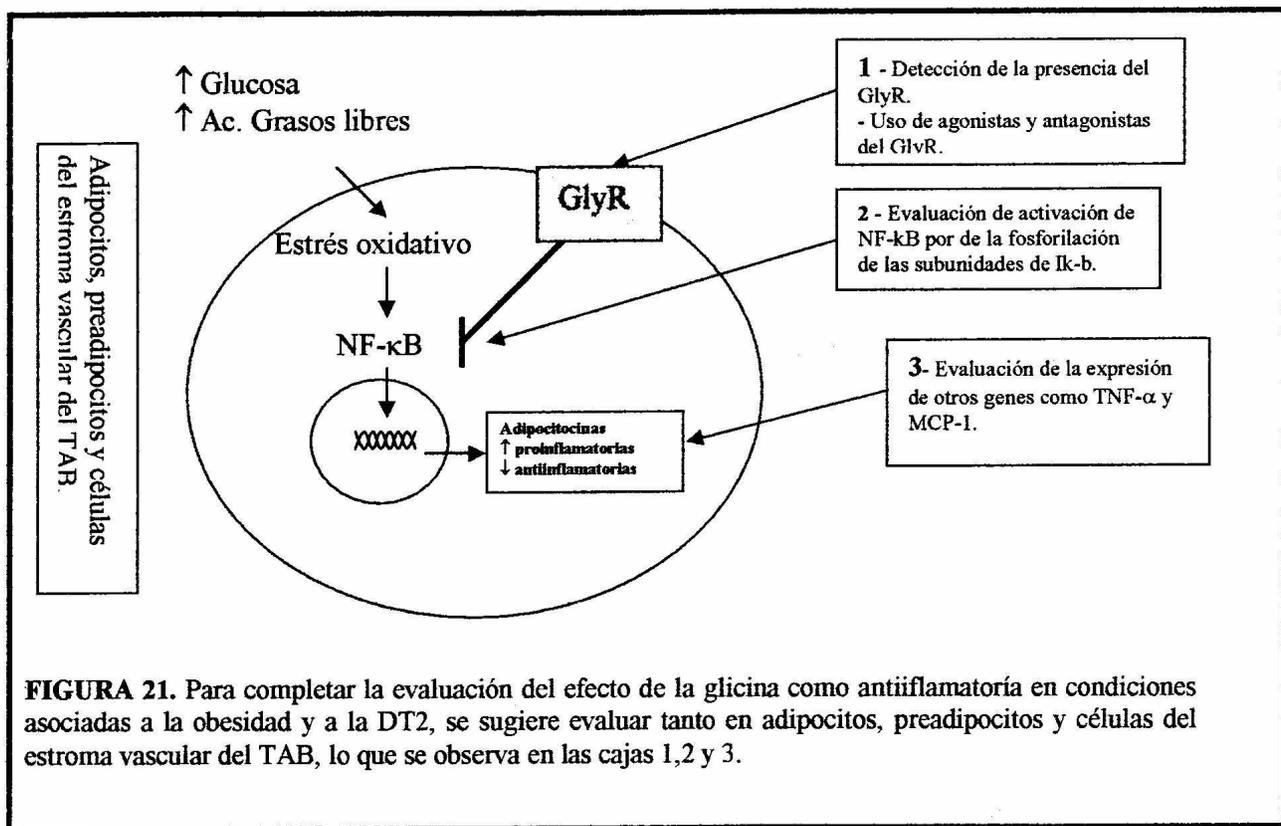
En los animales tratados con STZ se presentó hiperglucemia conforme a lo reportado previamente por (Singh et al., 2001). La administración diaria de glicina no modificó los niveles de glucosa, a, colesterol, triglicéridos, TGO y TGP aunque para HbA1c se mostró cierta tendencia a disminuir pero no fue significativ en este modelo. Un dato interesante fue que la glicina aumentó la sobrevida de los animales, siendo la primera vez en la que se encuentra este efecto bajo estas condiciones, cabe señalar que un efecto protector similar se ha reportado previamente en animales tratados con LPS (Ikejima et al., 1996). Aunque en el caso de la glicina este resultado es interesante, pudiendo ser un reflejo de sus propiedades antioxidantes las cuales deben ser estudiadas más detenidamente y se considera necesario confirmar dicha protección en un mayor número de animales.

Debido a que los modelos *in vitro* no necesariamente reflejan lo que podría ocurrir en un organismo completo y ya que en los modelos *in vivo* no siempre se pueden reproducir exactamente las características de las enfermedades, es necesario que, en estudios posteriores,

se considere analizar ambos modelos: si la glicina disminuye la expresión de IL-6 y de resistina, la cuantificación de la expresión de sus RNAm deben correlacionar con las concentraciones respectivas de la proteína circulante. Además, si la glicina tiene efecto sobre la expresión de IL-6 deberá realizarse un esquema experimental en el que se considere trabajar con agentes proinflamatorios y antiinflamatorios, tanto con preadipocitos y como en adipocitos, en modelos *in vitro* e *in vivo* y diseñar experimentos con intervalos de incubación que completen el presente trabajo.

A nivel práctico, las perspectivas con el modelo de células 3T3-L1 se muestran en la

Figura 21.



CONCLUSIONES

1. El tratamiento con glicina durante 8 horas disminuye la expresión del RNAm de IL-6 en adipocitos 3T3-L1.
2. La glicina tiende a disminuir la expresión del RNAm de resistina y adiponectina en adipocitos 3T3-L1 tratadas crónicamente.
3. La glicina no modifica la expresión del RNAm de adiponectina y resistina e IL-6 bajo el esquema de resistencia a la insulina.
4. La administración diaria de glicina no modifica los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos, TGO y TGP aunque se observó cierta tendencia a disminuir HbA1c sin significancia estadística.
5. La administración diaria de glicina aumenta la supervivencia de los ratones diabéticos.

REFERENCIAS

- (1998). UKPDS 28: a randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes Care* 21, 87-92.
- (2002). [Mortality statistics in Mexico: deaths registered in the year 2000]. *Salud Publica Mex* 44, 266-282.
- Ailhaud, G., Fukamizu, A., Massiera, F., Negrel, R., Saint-Marc, P., and Teboul, M. (2000). Angiotensinogen, angiotensin II and adipose tissue development. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4, S33-35.
- Alessi, M. C., Peiretti, F., Morange, P., Henry, M., Nalbone, G., and Juhan-Vague, I. (1997). Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 46, 860-867.
- Aronson, D., and Rayfield, E. J. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 1, 1.
- Barquera, S., Tovar-Guzman, V., Campos-Nonato, I., Gonzalez-Villalpando, C., and Rivera-Dommarco, J. (2003). Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: an epidemiologic transition analysis. *Arch Med Res* 34, 407-414.
- Bastelica, D., Morange, P., Berthet, B., Borghi, H., Lacroix, O., Grino, M., Juhan-Vague, I., and Alessi, M. C. (2002). Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 173-178.
- Bays, H., Mandarino, L., and DeFronzo, R. A. (2004). Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 463-478.
- Berg, A. H., Combs, T. P., and Scherer, P. E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13, 84-89.

- Birgel, M., Gottschling-Zeller, H., Rohrig, K., and Hauner, H. (2000). Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1682-1687.
- Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D., and Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Verdich, C., Pedersen, S. B., Toubro, S., Astrup, A., and Richelsen, B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E527-533.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
- Chandra, R. K. (1980). Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice. *Am J Clin Nutr* 33, 13-16.
- Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2003). Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278, 9850-9855.
- Cheung, A. T., Ree, D., Kolls, J. K., Fuselier, J., Coy, D. H., and Bryer-Ash, M. (1998). An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology* 139, 4928-4935.
- Cianflone, K., Maslowska, M., and Sniderman, A. D. (1999). Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 10, 31-41.
- Cianflone, K., Xia, Z., and Chen, L. Y. (2003). Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 1609, 127-143.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108, 1875-1881.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., Patti, M. E., Klein, S. L., Weinstein, R. S., and Scherer, P. E. (2003). Sexual

- Birgel, M., Gottschling-Zeller, H., Rohrig, K., and Hauner, H. (2000). Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1682-1687.
- Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D., and Flier, J. S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Verdich, C., Pedersen, S. B., Toubro, S., Astrup, A., and Richelsen, B. (2003). Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E527-533.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
- Chandra, R. K. (1980). Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice. *Am J Clin Nutr* 33, 13-16.
- Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2003). Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278, 9850-9855.
- Cheung, A. T., Ree, D., Kolls, J. K., Fuselier, J., Coy, D. H., and Bryer-Ash, M. (1998). An in vivo model for elucidation of the mechanism of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced insulin resistance: evidence for differential regulation of insulin signaling by TNF-alpha. *Endocrinology* 139, 4928-4935.
- Cianflone, K., Maslowska, M., and Sniderman, A. D. (1999). Acylation stimulating protein (ASP), an adipocyte autocrine: new directions. *Semin Cell Dev Biol* 10, 31-41.
- Cianflone, K., Xia, Z., and Chen, L. Y. (2003). Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 1609, 127-143.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108, 1875-1881.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., Patti, M. E., Klein, S. L., Weinstein, R. S., and Scherer, P. E. (2003). Sexual

- differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52, 268-276.
- Combs, T. P., Wagner, J. A., Berger, J., Doebber, T., Wang, W. J., Zhang, B. B., Tanen, M., Berg, A. H., O'Rahilly, S., Savage, D. B., et al. (2002). Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143, 998-1007.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., and et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334, 292-295.
- Cook, K. S., Min, H. Y., Johnson, D., Chaplinsky, R. J., Flier, J. S., Hunt, C. R., and Spiegelman, B. M. (1987). Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237, 402-405.
- Crandall, D. L., Busler, D. E., McHendry-Rinde, B., Groeling, T. M., and Kral, J. G. (2000). Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2609-2614.
- Cruz, M., Garcia-Macedo, R., Garcia-Valerio, Y., Gutierrez, M., Medina-Navarro, R., Duran, G., Wachter, N., and Kumate, J. (2004). Low adiponectin levels predict type 2 diabetes in Mexican children. *Diabetes Care* 27, 1451-1453.
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumie, A. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53, 1285-1292.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25, 4-7.
- Deters, M., Strubelt, O., and Younes, M. (1997). Protection by glycine against hypoxia-reoxygenation induced hepatic injury. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97, 199-213.
- Diaz-Flores, M., Ibañez-Hernandez, M., Galvan, R., Gutierrez, M., Duran-Reyez, G., Medina-Navarro, R., D, P.-L., Ortega-Camarillo, C., Villar-Rojas, C., Cruz, M., and Baiza-Gutman, L. (2005). Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sci*.

- Dusserre, E., Moulin, P., and Vidal, H. (2000). Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1500, 88-96.
- Ebihara, K., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Shintani, M., Miyanaga, F., Aizawa-Abe, M., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., et al. (2001). Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes* 50, 1440-1448.
- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., and Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.
- Fasshauer, M., Klein, J., Lossner, U., and Paschke, R. (2003a). Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 35, 147-152.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001a). Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507, 142-146.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2001b). Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 1027-1031.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1084-1089.
- Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003b). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 1045-1050.
- Fasshauer, M., and Paschke, R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46, 1594-1603.

- Fernandes, G., Handwerger, B. S., Yunis, E. J., and Brown, D. M. (1978). Immune response in the mutant diabetic C57BL/Ks-dt⁺ mouse. Discrepancies between in vitro and in vivo immunological assays. *J Clin Invest* 61, 243-250.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 847-850.
- Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N. A., Alexander, W. S., and Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14564-14568.
- Goldman, R., Ferber, E., and Zor, U. (1997). Involvement of reactive oxygen species in phospholipase A2 activation: inhibition of protein tyrosine phosphatases and activation of protein kinases. *Adv Exp Med Biol* 400A, 25-30.
- Gregoire, F. M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 997-1002.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809.
- Grotz, M. R., Pape, H. C., van Griensven, M., Stalp, M., Rohde, F., Bock, D., and Krettek, C. (2001). Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats. *Shock* 16, 116-121.
- Gustafson, B., Jack, M. M., Cushman, S. W., and Smith, U. (2003). Adiponectin gene activation by thiazolidinediones requires PPAR gamma 2, but not C/EBP alpha-evidence for differential regulation of the aP2 and adiponectin genes. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 933-939.
- Haffner, S. M. (1998). Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 21, 160-178.
- Han, Y. J., Kwon, Y. G., Chung, H. T., Lee, S. K., Simmons, R. L., Billiar, T. R., and Kim, Y. M. (2001). Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide* 5, 504-513.

- Haugen, F., Jorgensen, A., Drevon, C. A., and Trayhurn, P. (2001). Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507, 105-108.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., and Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28, 1456-1462.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Ikejima, K., Imuro, Y., Forman, D. T., and Thurman, R. G. (1996). A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol* 271, G97-103.
- Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Makishima, M., and Shimomura, I. (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52, 1655-1663.
- Kamtchouing, P., Sokeng, S. D., Moundipa, P. F., Watcho, P., Jatsa, H. B., and Lontsi, D. (1998). Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* 62, 95-99.
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E745-751.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., et al. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277, 25863-25866.
- Li, X., Bradford, B. U., Wheeler, M. D., Stimpson, S. A., Pink, H. M., Brodie, T. A., Schwab, J. H., and Thurman, R. G. (2001). Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect Immun* 69, 5883-5891.
- Lijnen, H. R., Maquoi, E., Morange, P., Voros, G., Van Hoef, B., Kopp, F., Collen, D., Juhán-Vág, I., and Alessi, M. C. (2003). Nutritionally induced obesity is attenuated in transgenic mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 78-84.

- Lindsay, R. S., Funahashi, T., Hanson, R. L., Matsuzawa, Y., Tanaka, S., Tataranni, P. A., Knowler, W. C., and Krakoff, J. (2002). Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360, 57-58.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., et al. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50, 2094-2099.
- Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R., Uysal, K. T., Morgan, M. A., Parker, R. A., Suttles, J., Fazio, S., Hotamisligil, G. S., and Linton, M. F. (2001). Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 7, 699-705.
- Massiera, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J. M., Quignard-Boulangé, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., et al. (2001a). Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *Faseb J* 15, 2727-2729.
- Massiera, F., Seydoux, J., Geloën, A., Quignard-Boulangé, A., Turban, S., Saint-Marc, P., Fukamizu, A., Negrel, R., Ailhaud, G., and Teboul, M. (2001b). Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 142, 5220-5225.
- Mauriz, J. L., Matilla, B., Culebras, J. M., Gonzalez, P., and Gonzalez-Gallego, J. (2001). Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radic Biol Med* 31, 1236-1244.
- Mavri, A., Alessi, M. C., Bastelica, D., Geel-Georgelin, O., Fina, F., Sentocnik, J. T., Stegnar, M., and Juhan-Vague, I. (2001). Subcutaneous abdominal, but not femoral fat expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is related to plasma PAI-1 levels and insulin resistance and decreases after weight loss. *Diabetologia* 44, 2025-2031.
- Mavri, A., Stegnar, M., Krebs, M., Sentocnik, J. T., Geiger, M., and Binder, B. R. (1999). Impact of adipose tissue on plasma plasminogen activator inhibitor-1 in dieting obese women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1582-1587.

- McTernan, C. L., McTernan, P. G., Harte, A. L., Levick, P. L., Barnett, A. H., and Kumar, S. (2002). Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 359, 46-47.
- Milan, G., Granzotto, M., Scarda, A., Calcagno, A., Pagano, C., Federspil, G., and Vettor, R. (2002). Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res* 10, 1095-1103.
- Miller, G. W., and Schnellmann, R. G. (1994). A putative cytoprotective receptor in the kidney: relation to the neuronal strychnine-sensitive glycine receptor. *Life Sci* 55, 27-34.
- Minokoshi, Y., Kim, Y. B., Peroni, O. D., Fryer, L. G., Muller, C., Carling, D., and Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339-343.
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H., and Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22, 1145-1158.
- Moller, D. E. (2000). Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 11, 212-217.
- Mora, S., and Pessin, J. E. (2002). An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 345-356.
- Morange, P. E., Lijnen, H. R., Alessi, M. C., Kopp, F., Collen, D., and Juhan-Vague, I. (2000). Influence of PAI-1 on adipose tissue growth and metabolic parameters in a murine model of diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1150-1154.
- Muoio, D. M., Dohm, G. L., Fiedorek, F. T., Jr., Tapscott, E. B., Coleman, R. A., and Dohn, G. L. (1997). Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46, 1360-1363.
- Murray, I., Havel, P. J., Sniderman, A. D., and Cianflone, K. (2000). Reduced body weight, adipose tissue, and leptin levels despite increased energy intake in female mice lacking acylation-stimulating protein. *Endocrinology* 141, 1041-1049.
- Nagaev, I., and Smith, U. (2001). Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 561-564.
- Nathan, D. M. (1998). Some answers, more controversy, from UKPDS. United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Lancet* 352, 832-833.

- Nonogaki, K., Fuller, G. M., Fuentes, N. L., Moser, A. H., Staprans, I., Grunfeld, C., and Feingold, K. R. (1995). Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136, 2143-2149.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., et al. (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., et al. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103, 1057-1063.
- Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M., and Scherer, P. E. (2003). Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278, 9073-9085.
- Pfeiffer, F., and Betz, H. (1981). Solubilization of the glycine receptor from rat spinal cord. *Brain Res* 226, 273-279.
- Pickup, J. C., and Crook, M. A. (1998). Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41, 1241-1248.
- Pittas, A. G., Joseph, N. A., and Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 447-452.
- Qu, W., Ikejima, K., Zhong, Z., Waalkes, M. P., and Thurman, R. G. (2002). Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1249-1256.
- Reusch, J. E. (2003). Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J Clin Invest* 112, 986-988.
- Rivera, J. A., Barquera, S., Campirano, F., Campos, I., Safdie, M., and Tovar, V. (2002). Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr* 5, 113-122.

- Ron, D., Brasier, A. R., McGehee, R. E., Jr., and Habener, J. F. (1992). Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest* 89, 223-233.
- Rose, M. L., Rusyn, I., Bojes, H. K., Germolec, D. R., Luster, M., and Thurman, R. G. (1999). Role of Kupffer cells in peroxisome proliferator-induced hepatocyte proliferation. *Drug Metab Rev* 31, 87-116.
- Rosen, B. S., Cook, K. S., Yaglom, J., Groves, D. L., Volanakis, J. E., Damm, D., White, T., and Spiegelman, B. M. (1989). Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science* 244, 1483-1487.
- Ruan, H., Miles, P. D., Ladd, C. M., Ross, K., Golub, T. R., Olefsky, J. M., and Lodish, H. F. (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176-3188.
- Rusyn, I., Bradham, C. A., Cohn, L., Schoonhoven, R., Swenberg, J. A., Brenner, D. A., and Thurman, R. G. (1999). Corn oil rapidly activates nuclear factor- κ B in hepatic Kupffer cells by oxidant-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* 20, 2095-2100.
- Rusyn, I., Rose, M. L., Bojes, H. K., and Thurman, R. G. (2000). Novel role of oxidants in the molecular mechanism of action of peroxisome proliferators. *Antioxid Redox Signal* 2, 607-621.
- Ryan, T. P., and Aust, S. D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* 22, 119-141.
- Saint-Marc, P., Kozak, L. P., Ailhaud, G., Darimont, C., and Negrel, R. (2001). Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology* 142, 487-492.
- Sandler, S., Bendtzen, K., Eizirik, D. L., and Welsh, M. (1990). Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 126, 1288-1294.
- Savage, D. B., Sewter, C. P., Klenk, E. S., Segal, D. G., Vidal-Puig, A., Considine, R. V., and O'Rahilly, S. (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes* 50, 2199-2202.

- Schafer, K., Fujisawa, K., Konstantinides, S., and Loskutoff, D. J. (2001). Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. *Faseb J* 15, 1840-1842.
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., and Mooney, R. A. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51, 3391-3399.
- Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M. Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C. B., and Unger, R. H. (1997). Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4637-4641.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M., and Unger, R. H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498-2502.
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Ikemoto, S., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73-76.
- Singh, S. N., Vats, P., Suri, S., Shyam, R., Kumria, M. M., Ranganathan, S., and Sridharan, K. (2001). Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 76, 269-277.
- Singleton, J. R., Smith, A. G., Russell, J. W., and Feldman, E. L. (2003). Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52, 2867-2873.
- Spittler, A., Reissner, C. M., Oehler, R., Gornikiewicz, A., Gruenberger, T., Manhart, N., Brodowicz, T., Mittlboeck, M., Boltz-Nitulescu, G., and Roth, E. (1999). Immunomodulatory effects of glycine on LPS-treated monocytes: reduced TNF-alpha production and accelerated IL-10 expression. *Faseb J* 13, 563-571.
- Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A. F. (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361, 226-228.
- Stachlewitz, R. F., Li, X., Smith, S., Bunzendahl, H., Graves, L. M., and Thurman, R. G. (2000). Glycine inhibits growth of T lymphocytes by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol* 164, 176-182.

- Stachlewitz, R. F., Seabra, V., Bradford, B., Bradham, C. A., Rusyn, I., Germolec, D., and Thurman, R. G. (1999). Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* 29, 737-745.
- Stephens, J. M., Lee, J., and Pilch, P. F. (1997). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 272, 971-976.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.
- Steppan, C. M., and Lazar, M. A. (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 13, 18-23.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 537-546.
- Thomson, M. J., Williams, M. G., and Frost, S. C. (1997). Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 272, 7759-7764.
- Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., Lodish, H. F., and Ruderman, N. B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16309-16313.
- Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C. N., Leiden, J. M., and Hotamisligil, G. S. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 290, 134-138.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241-252.
- Tsao, T. S., Lodish, H. F., and Fruebis, J. (2002). ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol* 440, 213-221.
- Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Cianflone, K., Degerman, E., Hoffstedt, J., Nilsell, K., Sniderman, A., and Arner, P. (1999). Mechanisms involved in the regulation of free fatty

- acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin. *J Biol Chem* 274, 18243-18251.
- Viengchareun, S., Zennaro, M. C., Pascual-Le Tallec, L., and Lombes, M. (2002). Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett* 532, 345-350.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Wellen, K. E., and Hotamisligil, G. S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1785-1788.
- Werman, R., Davidoff, R. A., and Aprison, M. H. (1967). Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature* 214, 681-683.
- Wheeler, M., Stachlewitz, R. F., Yamashina, S., Ikejima, K., Morrow, A. L., and Thurman, R. G. (2000a). Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *Faseb J* 14, 476-484.
- Wheeler, M. D., Rose, M. L., Yamashina, S., Enomoto, N., Seabra, V., Madren, J., and Thurman, R. G. (2000b). Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L390-398.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.
- Xu, H., Hirosumi, J., Uysal, K. T., Guler, A. D., and Hotamisligil, G. S. (2002). Exclusive action of transmembrane TNF alpha in adipose tissue leads to reduced adipose mass and local but not systemic insulin resistance. *Endocrinology* 143, 1502-1511.
- Yamashina, S., Konno, A., Wheeler, M. D., Rusyn, I., Rusyn, E. V., Cox, A. D., and Thurman, R. G. (2001). Endothelial cells contain a glycine-gated chloride channel. *Nutr Cancer* 40, 197-204.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.

- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295.
- Yin, M., Zhong, Z., Connor, H. D., Bunzendahl, H., Finn, W. F., Rusyn, I., Li, X., Raleigh, J. A., Mason, R. P., and Thurman, R. G. (2002). Protective effect of glycine on renal injury induced by ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F417-423.
- Zhang, Y., Ikejima, K., Honda, H., Kitamura, T., Takei, Y., and Sato, N. (2000). Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology* 32, 542-546.
- Zhong, Z., Connor, H. D., Yin, M., Moss, N., Mason, R. P., Bunzendahl, H., Forman, D. T., and Thurman, R. G. (1999a). Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporin A-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Mol Pharmacol* 56, 455-463.
- Zhong, Z., Enomoto, N., Connor, H. D., Moss, N., Mason, R. P., and Thurman, R. G. (1999b). Glycine improves survival after hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 12, 54-62.
- Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendahl, H., Bradford, B., and Lemasters, J. J. (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6, 229-240.