



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTRÉS OXIDATIVO Y RESISTENCIA A LA INSULINA EN UN MODELO
DE SÍNDROME METABÓLICO: EFECTO DE LA GLICINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

MARIA MONSERRATH CHÁVEZ SALGADO



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: HECTOR GENARO NICOLAS BOURGES RODRIGUEZ

VOCAL: Profesor: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

SECRETARIO: Profesor: MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

1er. SUPLENTE: Profesor: KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

2° SUPLENTE: Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

DEPTO: BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR

Tel 55 73 29 11 EXT 1237

ASESOR DEL TEMA

SUSTENTANTE

MOHAMMED EL-HAFIDI BENTLAKDER

MARIA MONSERRATH CHÁVEZ SALGADO



AGRADECIMIENTOS

A mi jurado Héctor Bourges, Rebecca Franco, Karla Carvajal y Laura Carmona por su tiempo y contribución a este trabajo.

A mi asesor el Doc. Mohammed El-Hafidi por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y brindarme la oportunidad de trabajar con usted. Es una persona admirable.

Gracias a la UNAM , especialmente a la Facultad de Química por abrirme las puertas al conocimiento y darme la oportunidad de realizar mis estudios en sus instalaciones, es un orgullo pertenecer a esta universidad.

Al Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito federal por la beca otorgada a través del proyecto CLAVE: PICDS08-67, CLABE: 072118000908242.

Al apoyo otorgado por el CONACYT a través del proyecto 106845.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por hacer todo en mi vida posible.

A mi mamá, Irene Salgado Gómez por tu confianza y amor, no podría explicar cuan agradecida estoy contigo, te amo.

A René Arriaga Vázquez por el amor que me demuestras, por ser un ángel y ejemplo en mi vida, por creer en mí, y compartir conmigo muchas historias y ocurrencias, por tu presencia e impacto en muchas etapas de mi vida y por desafearme a nuevos retos.

A Manuel Chávez por tu apoyo y por ser ejemplo de constancia.

A Sandra (sandunga) por tu gran amor y enseñanzas, gracias por tantas vivencias a tu lado, es genial tenerte como hermana.

A Lucero por tu compañía en mi vida y fortalecer mi paciencia.

A mis abuelitos Guadalupe Salgado e Isabel Gómez por sus consejos y buenos momentos a su lado, y a todos mis tios y primos por ser una gran familia.

A Carlos Ramírez y Esther Valencia por su cariño y ser ejemplo en mi vida.

A todos mis amigos que han estado conmigo a lo largo de mi vida.

Rodrigo por tu paciencia.

Ángeles Arroyo por ser una gran amiga, y construir tantas historias juntas.

Cristopher por hacerme sentir tan alegre con tus palabras.

Alex y Erick por sus consejos y por mostrarse amigos siempre.

Belem por tu confianza y tantos momentos juntas

Jacqueline y Araceli por ser el mejor apoyo y la alegría de mis días.



Katy por el cariño que me demuestras y la paz que me transmites siempre.

Adriana Cruz por tu aceptación y sabios consejos, por tener siempre una palabra de amor para mí.

Luis por tu amistad y tu constante interés en mi.

Ricardo por tus sonrisas, abrazos, por tus gratas conversaciones, ánimos y críticas tu presencia alegra mi vida.

Antonio Pineda por que aprendí mucho con tu amistad y por tu valiosa ayuda en este trabajo.

Miriam Badillo por tu valiosa amistad y amor, por escucharme y siempre darme energía para seguir.

Vianey, por tus consejos y compañía.

Elizabeth Merari, Tania, Rosaura, Carlos, Erick Montes, Edgar, Israel, La princess, David Alavés, Alicia Villaseñor, Eduardo, Luis Cruz, Yazmin, Julio, Dante, Hiram, Gerardo, Fernando, y a todos mis compañeros a lo largo de mi carrera por los bellos momentos que hemos compartido.



ÍNDICE

| | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| Abreviaturas y Símbolos | 9 |
| 1. Resumen | 11 |
| 2. Introducción | 14 |
| 3. Antecedentes | 17 |
| 3.1 Síndrome metabólico | 17 |
| 3.1.1 Definición según la OMS | 17 |
| 3.1.2 Definición según el Programa Nacional de Colesterol | 18 |
| 3.1.3 Definición según Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos | 19 |
| 3.1.4 Análisis de los tres criterios para el diagnóstico del SM | 19 |
| 3.1.5 Factores genéticos y ambientales en la patogénesis del SM | 20 |
| 3.2. Resistencia a la insulina (RI) | 21 |
| 3.2.1 Mecanismos bioquímicos | 22 |
| 3.2.2 Acción fisiológica de la insulina | 23 |
| 3.2.3 Receptor de la insulina | 23 |
| 3.2.4 Obesidad y la RI..... | 27 |
| 3.2.4.1 Adipocitos como células endócrinas | 30 |
| 3.2.5 Ácidos grasos no esterificados y RI | 31 |
| 3.3 Estrés oxidativo y RI. | 33 |
| 3.3.1 Fuentes de radicales libres | 34 |



| | |
|--|-----------|
| 3.3.2 Algunas fuentes endógenas | 34 |
| 3.3.2.1 Cadena de transporte electrónico mitocondrial..... | 35 |
| 3.3.2.2 Transporte electrónico microsomal | 36 |
| 3.3.2.3 Daño oxidativo a biomoléculas..... | 37 |
| 3.3.3 SM, ácidos graso libres y estrés oxidativo..... | 38 |
| 3.3.4 Estrés oxidativo y sistema de defensa..... | 39 |
| 3.3.7.1 Sistema antioxidante enzimático | 40 |
| 3.3.7.2 Sistema antioxidante no enzimático | 42 |
| 3.4. Glicina | 42 |
| 3.4.1 Algunas propiedades biológicas de la glicina | 43 |
| 3.4.2 Receptor de glicina | 43 |
| 3.4.3 La glicina como agente protector contra la RI..... | 44 |
| 4. Antecedentes del modelo de síndrome metabólico | 46 |
| 5. Hipótesis | 47 |
| 6. Objetivos generales | 47 |
| 7. Objetivos particulares | 47 |
| 8. Justificación | 48 |
| 9. Diseño experimental | 49 |
| 9.1 Tratamiento de los animales | 49 |
| 9.2 Evaluación de la RI..... | 50 |
| 9.3 Obtención del plasma | 51 |



| | |
|--|-----------|
| 9.4 Análisis de los AGNE, de los triglicéridos, de la glucosa y de la insulina..... | 51 |
| 9.5 Obtención de homogenizado de hígado para la evaluación del grado de fosforilación de receptor del IR β e IRS-1/2 | 52 |
| 9.6 Cuantificación de proteína | 53 |
| 9.7 Electroforesis y Western Blot..... | 53 |
| 9.8 Efecto agudo de la glicina sobre IR β e IRS-1/2 y AKT en animales controles | 54 |
| 9.9 Actividad de la catalasa | 56 |
| 9.10 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) | 56 |
| 9.11 Carbonilación de proteínas..... | 57 |
| 10. Resultados | 59 |
| 10.1 Características generales del modelo | 59 |
| 10.2 Análisis de ácidos grasos no esterificados (AGNE) | 60 |
| 10.3 Efecto de la glicina sobre la resistencia a la insulina | 61 |
| 10.4 Expresión basal de receptor de insulina (IR- β) y sustrato receptor de insulina-1 (IRS-1) en homogeneizado de hígado | 63 |
| 10.5 Fosforilación en la tirosina del IR- β | 64 |
| 10.6 Fosforilación en la serina del IRS1/2 | 65 |
| 10.7 Efecto de la glicina sobre la fosforilación de AKT | 65 |
| 10.8 Efecto agudo de la glicina sobre la fosforilación de receptor IR- β ... | 66 |



| | |
|---|-----------|
| 10.9 Efecto del ácido oleico y de la n-acetil cisteína sobre la fosforilación del IR- β en homogenizado de hígado | 68 |
| 10.10 Participación del receptor de la glicina en la fosforilación del receptor..... | 69 |
| 10.11 Efecto de la glicina sobre la carbonilación de proteínas en el síndrome metabólico..... | 70 |
| 10.12 Efecto de la glicina sobre la actividad de la catalasa y SOD. | 71 |
| 10.12.1 Catalasa..... | 71 |
| 10.12.2 Superoxido dismutasa..... | 72 |
| 11. Discusión | 74 |
| 12. Conclusiones | 78 |
| 13. Perspectivas. | 78 |
| 14. Referencias | 79 |



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|---|
| AAEC | Asociación Americana de Endocrinología Clínicos |
| Acetil-CoA | Acetil- coenzima A |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AGL | Ácidos grasos libres |
| AGNE | Ácidos grasos no esterificados |
| AO | Ácido Oleico |
| ASB | Albúmina de suero bovino |
| ATP III | Adult treatment panel III |
| BHT | Butilato de hidroxitolueno |
| DM ₂ | Diabetes mellitus tipo 2 |
| ERNs | Especies reactivas de nitrógeno |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| g | Gramo |
| Gli | Glicina |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HI | Hiperinsulinemia |
| HTA | Hipertensión arterial |
| IRS-1/2 | Sustrato receptor de insulina 1,2 |
| IR β | Receptor de insulina subunidad β |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |



| | |
|---------------|---------------------------------------|
| mL | Mililitro |
| NADH | Nicotin Adenin Dinucleotido – Niacina |
| NCEP | National Colesterol Education Program |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pc | Peso corporal |
| RI | Resistencia a la insulina |
| RIA | Radio inmuno ensayo |
| SDS | Sulfato dodecil de sodio |
| SM | Síndrome metabólico |
| T | Testigo |
| TG | Trigliceridos |
| TNF $-\alpha$ | Factor de necrosis tumoral α |
| Tyr | Tirosina |
| μ L | Microlitro |



1. RESUMEN

El Síndrome metabólico (SM) es una suma heterogénea de factores de riesgo cuyas manifestaciones clínicas incluyen la resistencia a la insulina, la dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia), la obesidad intra-abdominal y la hipertensión arterial; estos factores aumentan el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo II (DM₂).

La resistencia a la insulina (RI) es un denominador común y el nexo del resto de las manifestaciones. Se define como la disminución de la capacidad de los tejidos de responder a la insulina para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

La RI es un fenotipo complejo en el que contribuyen factores genéticos y las costumbres de vida. La causa más probable para la disminución de la acción de la insulina es la presencia de alteraciones con su receptor y en la cascada de señales implicadas para el transporte de glucosa.

El estrés oxidativo definido como un desequilibrio persistente entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (ERN) y la defensa antioxidante tiene un papel fundamental en el SM.

Por otro lado la glicina es un aminoácido dispensable, es requerido por un número de vías metabólicas entre ellas la síntesis de proteínas estructurales como la colágena y la elastina. En un modelo experimental de SM desarrollado en nuestro laboratorio, la glicina reduce la RI y el estrés oxidativo inducido por ácidos grasos no esterificados



(AGNE), además de que ha mostrado un efecto benéfico sobre la presión arterial y sobre la acumulación de grasa intraabdominal inducida por alto consumo de sacarosa. En este trabajo se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) de AGNE muestra que el ácido oleico (AO) aumentó entre el grupo con SM en comparación con el grupo testigo (T), tanto en el plasma (0.15 ± 0.02 vs SM 0.32 ± 0.06 mM). como en el homogeneizado de hígado (11.1 ± 6.5 vs SM 32.1 ± 8.5 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína). El tratamiento de los animales con SM con glicina normalizó la composición de los AGNE en el plasma (0.17 ± 0.04 mM) y en el homogeneizado de hígado (16.7 ± 8.7 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína).

En la pinza hiperinsulinémica euglicémica entre los 20 y 40 minutos la velocidad de infusión de glucosa aumentó más en los animales T que en los animales SM. El tratamiento de los animales SM con glicina aumenta la velocidad de infusión de la glucosa de manera significativa.

El análisis por western de la glicina en el modelo de SM aumenta la fosforilación del IR β , AKT y una disminución en la fosforilación en los residuos de serina del IRS 1/2 en el hígado de los animales con SM. En presencia de AO la fosforilación del IR β disminuye significativamente tanto en animales T como con SM. El tratamiento con $1\mu\text{M}$ de N-acetilcisteína (NAC) antes de administrar AO ($60\mu\text{M}$) normalizó el grado de fosforilación del IR β . La glicina aumenta la fosforilación del IR β inhibida por AO. En presencia de estrocnina la glicina pierde su efecto sobre la fosforilación del receptor



inducida por insulina. La glicina también reduce de una manera significativa los carbonilos en el homogeneizado de hígado de los animales T.

Finalmente el tratamiento de los animales con glicina aumenta significativamente la actividad tanto de la catalasa como de la superóxido dismutasa (SOD).



2. INTRODUCCIÓN

Es sorprendente como los "malos hábitos" se fueron incorporando, pasando a formar parte de la vida cotidiana. Así, hoy nos encontramos ante situaciones de: mala alimentación, abuso de comidas rápidas con alto contenido de ácidos grasos saturados, de sodio, de azúcares; altos grados de estrés; reemplazo de actividades físicas por actividades ociosas. Por el SM está cobrando cada vez mayor importancia y se vuelve un tema urgente a conocer, prevenir y tratar, siempre sujeto a nuevas investigaciones.

El SM fue descrito inicialmente como Síndrome X por Gerald Reaven en 1988 (1) de una suma heterogénea de factores de riesgo cuyas manifestaciones clínicas incluyen la resistencia a la insulina, la dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia), la obesidad intra-abdominal y la hipertensión arterial; estos factores aumentan el riesgo de padecer DM₂ y diversas enfermedades cardiovasculares.

El incremento exponencial de la prevalencia del SM en los últimos años puede deberse a los cambios dietarios en el estilo de vida (especialmente los relacionados con la obesidad) y que influyen sobre los diversos genes reguladores de los mecanismos metabólicos sobre la salud. En la medida en que se logre una comprensión exhaustiva de los diversos modos de interacción entre la carga genética, la alimentación y el medio ambiente se podrán diseñar diferentes estrategias para prevenir el SM, tales como la alimentación equilibrada y el ejercicio.



Muchos pacientes, por razones sociales y estilo de vida actual no logran cambiar su régimen alimenticio ni su manera de moverse de un lugar a otro, por lo tanto es necesario desarrollar fármacos o suplementos nutricionales sin efectos secundarios que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes con SM (2).

La glicina, aminoácido dispensable, es requerido por un número de vías metabólicas, entre ellas la síntesis de proteínas estructurales como la colágena y la elastina. El consumo de una dieta rica en glicina ha mostrado efecto inhibitorio en la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en animales con diabetes experimental inducida por estreptozotocina, así como en pacientes con diabetes tipo II. En un modelo experimental de SM desarrollado en nuestro laboratorio, la glicina ha mostrado efecto benéfico sobre la presión arterial y sobre la acumulación de grasa intraabdominal inducida por alto consumo de sacarosa (3).

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es elucidar el mecanismo por el cual la glicina reduce la resistencia a la insulina. Puede ser a través de diferentes vías metabólicas tales como las vías de señalización inducida por la insulina. Estas vías implican interacciones entre diferentes proteínas que resultan en la translocación del transportador de la glucosa (Glut4) hacia la membrana plasmática de tejidos cuyo transporte depende de la insulina como el músculo esquelético (4).

La glicina participa en la biosíntesis del glutatión reducido (GSH) catalizada por dos enzimas, la sintasa de γ -glutamilcisteína y la sintasa de GSH. El GSH participa de



manera muy relevante en la defensa antioxidante. Una mala nutrición disminuye los niveles de glicina circulante con la subsecuente deficiencia de GSH e incremento de estrés oxidativo (5).



3. ANTECEDENTES

3.1 Síndrome metabólico.

El SM es una entidad clínica caracterizada por la asociación de varias enfermedades vinculadas fisiopatológicamente a través de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (6). Este síndrome, mencionado por primera vez en 1988 por Reaven (7) describe el enlace entre la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial, dislipidemias, DM₂ y otras anomalías metabólicas, asociadas con el aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos.

3.1.1 Definición según la OMS.

En 1999 la OMS publicó los criterios necesarios para poder hacer el diagnóstico del SM que se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. *Parámetros propuestos por la OMS para el diagnóstico del SM.*

| Variables principales | Definición |
|---|--|
| Alteración de la regulación de la glucosa | Glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dL y/o 2hr post-carga ≥ 140 mg/dL |
| Resistencia a la insulina | Captación de glucosa por debajo del percentil 25 de la pinza euglicémica-hiperinsulinémica |
| Otras variables | |
| Hipertensión arterial | TA $\geq 140/90$ mmHg |
| Dislipidemia | Triglicéridos ≥ 150 mg/dL y/o colesterol HDL < 40 |
| Obesidad | Índice cintura/cadera $> 0.9/0.85$ en H/M y/o IMC > 30 |
| Microalbuminuria | Excreción en la primera orina ≥ 20 mg/g |

Se considera el diagnóstico si existe al menos uno de los principales variables y al menos dos de otras variables.



3.1.2 Definición según el Programa de Educación Nacional de Colesterol de EUA.

Según el Programa de Educación Nacional de Colesterol de EUA (NCEP, por su siglas en inglés), Panel de Tratamiento de Adultos (ATP III por su siglas en inglés) proveyó una definición del SM y lo incluyó como una entidad independiente en su tercera versión en el año 2001. Los criterios del NCEP son prácticos para el uso clínico, ya que las variables que definen el SM son comúnmente evidenciables en la práctica clínica (8).

El panel NCEP ATP III definió el SM como la presencia de 3 ó más de los siguientes determinantes de riesgo:

Tabla 2. Diagnóstico del SM según el NCEP ATP III

| Factor | Definición | Puntaje |
|----------------------------------|--|---------|
| Obesidad de predominio abdominal | Relación cintura/cadera > 0.9 en hombres y > 0.85 en mujeres ó IMC > 30 | 1 |
| Hipertrigliceridemia | Triglicéridos > 150 mg/dL | 1 |
| Colesterol HDL bajo | HDL < 40 mg/dL | 1 |
| Hipertensión arterial | Tensión arterial > 130/85 mmHg | 1 |
| Alteración de la glicemia | Glicemia ayunas \geq 110 mg/dL ó 2 horas post-carga de glucosa \geq 140 mg/dL) | 2 |

Se requiere la suma de tres o más puntos de los factores anteriores.



Es bien sabido que la presencia de múltiples factores de riesgo confiere incremento en el riesgo total; sin embargo, es incierto si el SM confiere elevación del riesgo más allá de la suma de sus partes. El análisis multivariable de Alexander y col (9) podría sugerir que el riesgo del SM es derivado de sus componentes individuales, especialmente del HDL y presión sanguínea.

3.1.3 Definición según la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos.

En el año 2002 esta asociación amplió aún más el concepto, sumándole algunas situaciones clínicas como el síndrome de ovario poliquístico, *Acantosis nigricans* e hígado graso no alcohólico, entre otros (10).

3.1.4 Análisis de los tres criterios para el diagnóstico del SM

Los criterios de la OMS incluyen obesidad, definida por el índice de masa corporal (IMC>30) y por el índice cintura/cadera (ICC>0.9-0.85 en varón y mujer, respectivamente). En cambio, entre los criterios según la NCEP se destaca que la obesidad abdominal (medida por la circunferencia de la cintura) se relaciona mejor con el SM.

Como la definición de obesidad según la OMS no se correlaciona equitativamente entre los diferentes grupos poblacionales, es necesario realizar ajustes. Es, por ejemplo, el caso de Asia, donde se comprobó que un IMC de 23-24 tiene un riesgo equivalente de



hipertensión arterial, dislipidemia y DM₂ que un índice de masa corporal de 25-29,9 en personas caucásicas.

De esta forma se llegó a la conclusión que los valores indicativos de obesidad deben ser descendidos un 15-20% en personas asiáticas (11).

3.1.5 Factores genéticos y ambientales en la patogénesis del SM.

Cabe mencionar que en la patogénesis del síndrome metabólico intervienen tanto factores genéticos como ambientales; la inactividad física promueve el desarrollo de obesidad y modifica la sensibilidad a la insulina. Las dietas con alto contenido en grasa e hidratos de carbono favorecen, el síndrome metabólico.

Por otra parte en 1994 se describió un gen en el tejido adiposo de una rata genéticamente obesa, que codifica una proteína llamada leptina y que regula el hambre. En esta línea genética existe un déficit en la secreción de la leptina. La administración de leptina reduce la ingestión alimenticia, incrementa el gasto energético y se asocia a una importante reducción del peso (12, 13). En estudios posteriores se han encontrado ratas obesas con leptina elevada, lo que ha planteado la posibilidad de alteraciones en los receptores de leptina, los cuales se están actualmente estudiando (14).

Por otro lado, hay defectos en la expresión y la actividad de algunos factores de expresión como el receptor activador de la proliferación peroxisomal (PPAR γ por su siglas en inglés) que juega un papel importante en la génesis del SM y un papel muy



importante en la regulación de la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa (15).

3.2 RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)

Se define como la disminución de la capacidad de los tejidos de responder a la insulina para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Aparece en la mayoría de los sujetos con SM y para muchos autores la resistencia a la insulina es un denominador común y el nexo del resto de las manifestaciones (16).

La asociación entre RI y la hipertensión arterial (HTA) no se observa en todas las razas y apenas se puede identificar en menos del 50% de los hipertensos esenciales. Esto se explica principalmente porque la hiperinsulinemia tiene un efecto retenedor de sodio y sensibilizador de la acción de las catecolaminas (17).

La RI también se asocia con hiperuricemia (elevación del ácido úrico) por interferir con la eliminación renal del ácido úrico y con alteración de los mecanismos fibrinolíticos, los cuales son los encargados de disolver los coágulos, de los cuales la elevación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) es la manifestación más frecuente (18).

Para que una persona con RI desarrolle un trastorno de la glicemia, no basta con estar sometida a cambios del estilo de vida y al aumento de peso. Se requiere además que tenga un defecto en la producción de insulina por la célula beta pancreática, que probablemente tiene también un origen genético.



Cuando la demanda de insulina aumenta por el empeoramiento de la RI y las células beta fallan en incrementar su producción, sobreviene la diabetes (19).

3.2.1 Mecanismos bioquímicos.

La RI es un fenotipo complejo en el que contribuyen factores genéticos y las costumbres de vida. La causa más probable para la disminución de la acción de la insulina es la presencia de alteraciones en su receptor y en la cascada de señales implicadas en la translocación del Glut4 (20).

La RI puede resultar de alteraciones en cualquier etapa de las vías de señalización mediadas por insulina. La unión de la insulina a la subunidad α extracelular en el receptor induce un cambio conformacional del receptor para unirse al ATP en el dominio intracelular de las subunidades- β (21).

Se han hallado sitios con residuos de tirosina que juegan un papel funcional importante. Después de la autofosforilación del receptor, se inicia la activación de las tirosina cinasas de los sustratos del receptor de insulina (IRS). Se han identificado cuatro proteínas de IRS (del 1 al 4). El IRS fosforilado fija la PI-3 cinasa, induciendo incremento de fosfoinosítidos que se observa en las células estimuladas por insulina. El aumento de fosfoinosítidos induce el reclutamiento de proteína cinasa B (PKB) hacia la membrana. Existen suficientes pruebas de que la PI3-cinasa activada por insulina es capaz de habilitar el proceso de translocación del Glut4 (22).



3.2.2 Acción fisiológica de la insulina.

La insulina es una hormona capaz de iniciar múltiples vías de señalización que induce las respuestas celulares inmediatas y a largo plazo. Los efectos inmediatos de esta hormona incluyen el incremento de la velocidad de captación de la glucosa desde la sangre hacia las células musculares y los adipocitos, y la modulación de la actividad de diversas enzimas que intervienen en el metabolismo de la glucosa. La exposición continua a insulina produce efectos más prolongados, entre ellos un aumento de la expresión de las enzimas hepáticas que sintetizan glucógeno y de las enzimas de los adipocitos que sintetizan triglicéridos (23). Estos efectos se producen a través de la interacción de la insulina con su receptor $IR\beta$ y a través de la fosforilación del substrato del receptor IRS, así como la activación de la fosfoinositol 3-cinasa (Pi3k) y la proteína cinasa B (PKB, AKT).

3.2.3 Receptor de insulina

Es una glicoproteína transmembranal compleja consistente en 4 subunidades:

- Dos subunidades α del lado extracelular
- Dos subunidades β poseen un dominio extracelular, y un dominio transmembranal.

Las 4 subunidades derivan de un pro-receptor único codificado por un gen localizado en el cromosoma 19.



Las dos subunidades α están unidas entre sí por un puente disulfuro. Además, cada una de las subunidades α está unida a una subunidad β por un puente disulfuro formando un heterotetrámero.

Cuando se activa por la insulina, la parte intracelular de una de las subunidades β actúa como tirosina-protein cinasa específica.

La insulina se une a la porción N-terminal de la subunidad α y al hacerlo ocasiona un cambio conformacional de la subunidad β , cambio que estimula la actividad cinasa del receptor (24).

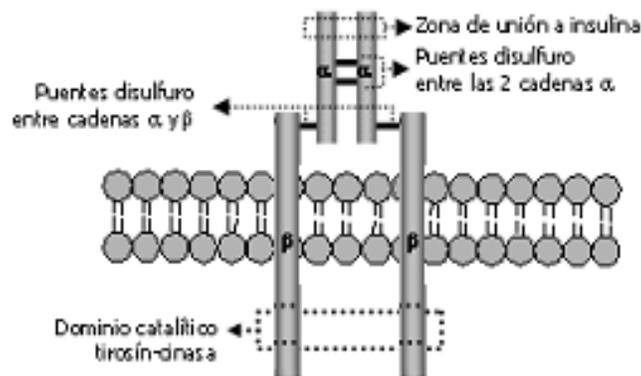


Figura 1. Esquema general del receptor de insulina. El receptor tiene dos subunidades α y dos β los cuales están unidos por puentes disulfuro; las subunidades α poseen una zona de unión a la insulina, mientras que las β un dominio catalítico tirosin-cinasa. (Shoelson SE. 1987)

La mayoría de los efectos de la insulina están mediados por la fosforilación de sus sustratos del receptor de insulina endógenos (IRS por su sigla en ingles, (Insulin



Receptor Substrates). Se han identificado cuatro IRS, pero los más estudiados han sido el IRS-1 y el IRS-2, que son ubicuos, mientras que IRS-3 está restringido al tejido adiposo, e IRS-4 al riñón y al encéfalo.

El IRS-1 es una proteína que posee una región PTB (phosphotyrosine binding), que le permite unirse al receptor y ser fosforilado por él en sus residuos de tirosina. Una vez que el IRS-1 es fosforilado, liga a dos moléculas de gran importancia en la respuesta biológica a la insulina: la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la Grb-2 (del inglés Growth factor receptor bound protein 2) (25-26).

Si bien no se ha podido esclarecer del todo la importancia relativa y las funciones de IRS-1 e IRS-2, en estudios realizados con knock-out genéticos de ambos genes se ha mostrado que en términos generales los animales sin IRS-1 tienen baja talla, peso y desarrollo, mientras que los animales sin IRS-2 son diabéticos e insulino-resistentes. Estas observaciones sugieren que el IRS-1 media primordialmente los efectos "tróficos", de la insulina; mientras que IRS-2 está más involucrado con los efectos "metabólicos" de la hormona (27).

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) es probablemente la enzima de la cascada de señalización de insulina más ampliamente estudiada. Es una proteína dimérica con una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). La subunidad p85 se une a los IRS fosforilados y eso hace que cese su actividad inhibitoria sobre la subunidad p110 (28-29).



La subunidad p110 desinhibida fosforila varios fosfolípidos de la membrana, principalmente el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P) para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). El PIP3 es el encargado de fijar a la membrana y activar a la PDK1 y la AKT, dos enzimas cinasas que median la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina (30).

PDK1/AKT. Después de que PDK1 y AKT se han fijado a la membrana y AKT se encuentra activo, AKT fosforila varias proteínas ocasionando efectos metabólicos importantes:

- AKT fosforila a VAMP (Proteína de membrana asociada a vesículas) y otras proteínas de fusión presentes en las vesículas de almacenamiento de los GLUT-4, ocasionando la translocación de los GLUT-4 a la membrana y por tanto la captación de glucosa (31).

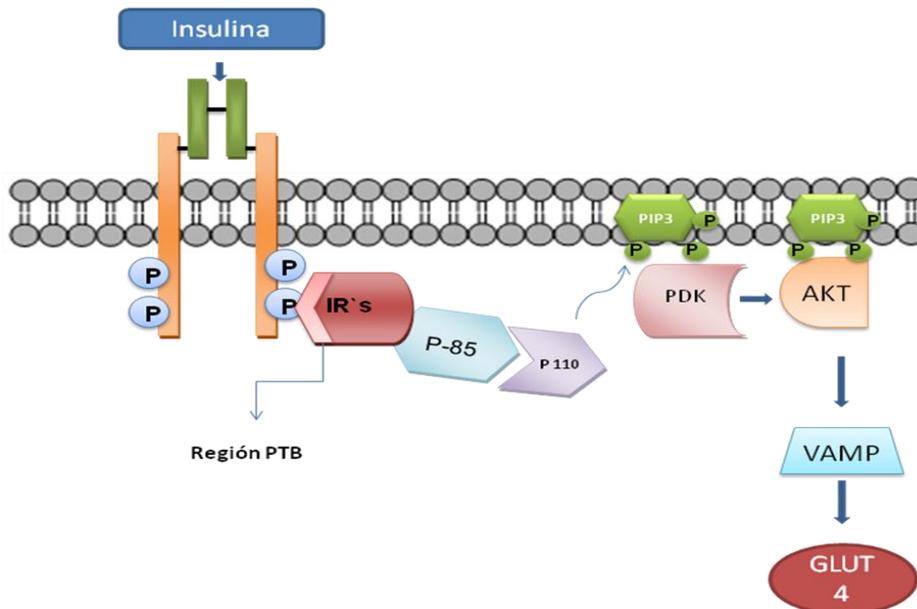




Figura 2. Mecanismo de acción del receptor de la insulina en las proteínas IRS y AKT. El IRS posee una región PTB (phospho tyrosine binding), que le permiten unirse al receptor y ser fosforilado por él en sus residuos de tirosina, una vez que el IRS es fosforilado, liga a la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La subunidad p85 se une al IRS fosforilado y eso hace que cese su actividad inhibitoria sobre la subunidad p110. El PIP3 es el encargado de fijar a la membrana y activar a la PDK y AKT la cual fosforila proteínas de membrana asociada a vesícula (VAMP) ocasionando la translocación del Glut4 en el musculo esquelético.

3.2.4 Obesidad y RI.

Estudios epidemiológicos revelaron que el riesgo de padecer diabetes y, probablemente RI aumenta a medida que se incrementa el contenido corporal de grasa, estimado por el índice de masa corporal (32). Esto implicaría que la cantidad de grasa del cuerpo tiene efecto sobre la sensibilidad a la insulina.

Los cambios que ocurren en el SM a nivel de los lípidos comprometen al adipocito (célula grasa), donde la RI da lugar a lipólisis descontrolada, que ocasiona un aumento del flujo de ácidos grasos al hígado, lo cual incrementa la formación de triglicéridos (TG) y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) pequeñas y ricas en TG (33).

El papel de la obesidad en la RI todavía está en discusión. Aun se ha incorporado como parte del SM y ciertamente se asocia tanto con la RI como con cada unos de sus componentes. La obesidad central o intraabdominal se considera como detonador del SM (34).

La forma de presentación clínica del SM tiene una variación fenotípica; por ejemplo puede manifestarse inicialmente con hipertensión u obesidad en algunos y en otros



como alteración de la regulación de la glucosa o de los lípidos u otros trastornos, como la hipertrigliceridemia o el incremento de apolipoproteína B e incremento de las LDL pequeñas y densas que están asociadas con un marcado incremento en el riesgo de enfermedad coronaria (35).

Por otra parte, la asociación entre la obesidad y la RI implica un mediador que pudiera ser un factor derivado del tejido adiposo. Con respecto a esto, las moléculas candidatas posibles han sido: el factor de necrosis tumoral TNF- α la leptina, los AGNE y la resistina. Sin embargo, se ha postulado que los AGNE son el enlace más probable entre la obesidad y la RI (36). Estos AGNE pueden participar en la inducción y la amplificación de las anomalías metabólicas que son características del síndrome de resistencia a la insulina.

Desde hace décadas se acepta la asociación entre obesidad y DM₂. La base más importante de esta conexión es que la obesidad puede generar un estado de RI.

Está bien descrito en la literatura que la insulina es un regulador esencial de la biología de la célula adiposa. El adipocito es una de las células que más responde a la influencia de la hormona. La insulina estimula la lipogénesis e inhibe la lipólisis generando el almacenamiento de triglicéridos. La insulina también interviene en la captación de ácidos grasos derivados de las lipoproteínas circulantes a través de la activación de la lipoproteín lipasa en el tejido adiposo (37).

En el caso de RI hay alteraciones en el transporte de glucosa en el tejido adiposo por



reducción en la transmisión de las señales involucradas en la regulación del Glut4 en respuesta a la insulina. En adipositos, la unión de la insulina a su receptor, su fosforilación y la actividad de la tirosín-quinasa así como la fosforilación de los IRS se encuentran reducidas.

También es posible que uno de los mecanismos en los defectos de señalización tenga que ver con el aumento en la expresión de varias fosfatasas que desfosforilan y terminan con el evento de activación que se propaga a partir de la fosforilación (38).

Los depósitos centrales de grasa (intraabdominal) están mucho más ligados con la RI, DM₂ y enfermedad cardiovascular que los depósitos periféricos (subcutáneos y de glúteos). Aunque aún no se comprende por completo, es posible que algún mecanismo todavía desconocido, genético, ambiental o ambos, sea la causa de la RI y del patrón central de adiposidad (39).

Una hipótesis alternativa se basa en el hecho de que los adipocitos intra abdominales son lipolíticamente más activos debido, en parte, a sus receptores adrenérgicos. La hiperinsulinemia *per se* puede generar RI por disminución de la regulación de los receptores de insulina y desensibilización de las vías de transmisión postreceptor, tal como lo sugirieran las observaciones en animales transgénicos (40). Otra posibilidad supone la participación de múltiples factores secretados por los adipocitos intraabdominales, particularmente dañinos para la sensibilidad sistémica a insulina.



3.2.4.1 Adipocitos como células endócrinas. Los adipocitos tienen un rol esencial como depósito energético de triglicéridos. Sin embargo, en los últimos años se hizo cada vez más evidente que los adipocitos ejercen, además, un papel en la homeostasis energética. De hecho, estas células expresan y secretan numerosos péptidos, citoquinas y hormonas, $TNF\alpha$, inhibidor del activador de plasminógeno, angiotensinógeno y leptina, que intervienen en forma central en la regulación del balance energético. Además, los adipocitos producen hormonas esteroideas, como estrógeno y cortisol que pueden influir en la biología local del adipocito e intervenir en localizaciones diversas, como cerebro, hígado, células musculares, células gonadales, órganos y linfoides (41). Estas observaciones generan nuevas conexiones entre la función del tejido adiposo y la RI, independientemente del simple papel en el almacenamiento y liberación de energía (42).

La leptina, el producto del gen *ob* ejerce profundos efectos sobre la sensación de saciedad, consumo energético y función neuroendócrina. El hallazgo más llamativo es que la proteína puede actuar en forma bidireccional activando procesos metabólicos fisiológicos y neuroendócrinos entre el estar alimentado y el estar famélico. Sin embargo, la capacidad de desviar su influencia en uno u otro sentido no elimina el hecho de que la ausencia de leptina genera obesidad grave tanto en roedores como en humanos (43).



3.2.5 Ácidos grasos no esterificados y RI

Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) se definen como ácidos grasos que se hallan en el plasma que no forman complejos con la albúmina del suero para su transportación. Estos ácidos grasos no están presentes en forma de ésteres de glicerol ni ester de colesterol.

Las propiedades físico químicas de los ácidos grasos están determinadas por la longitud de la cadena y su grado de insaturación.

Los efectos de los AGNE pueden constituir uno de los diversos componentes de la resistencia a la insulina y del riesgo del padecimiento de la DM₂. Los AGNE a concentraciones elevadas en el plasma, debido a una lipólisis exacerbada en la mayoría de los obesos, (44) inhiben la incorporación de glucosa en las células dependiente de insulina.

La insulina también regula las concentraciones de AGNE, los cuales son los precursores fundamentales para la síntesis hepática de TG (45).

Los estudios de la RI, en animales alimentados con dietas grasas y en células tratadas con lípidos, han permitido la identificación de defectos en la autofosforilación del IRbeta en los residuos de tirosina (tyr) por parte de la tirosina cinasa intrínseca que está ubicada en las subunidades β . Este defecto consiste en la fosforilación de los residuos de serina y treonina del receptor de insulina en vez de la fosforilación de los residuos de tirosina (46).



También se ha postulado que a mayor oferta de AGNE, se incrementa la concentración de AcilCoA derivada de su activación por medio de acilCoA sintetasa y estimulando una isoforma de la proteína cinasa la PKC θ , que fosforila al IRS-1 en el residuo serina/treonina, disminuyendo su efectividad como sustrato para la actividad de la tirosina cinasa del receptor insulínico, mecanismo por el cual los AGL generarían resistencia a la insulina (47).

Fisiológicamente la fosforilación de IRS-1 en el residuo tirosina se requiere para la respuesta estimulada por insulina, mientras que la fosforilación de IRS-1 en sus residuos de serina tienen un doble papel, ya sea que aumenten o inhiban los efectos de la insulina. La activación de PKB en respuesta a la insulina induce la señalización de insulina y promueve la fosforilación de IRS-1 en el residuo serina presentando la generación de un vínculo de retroalimentación negativa por acción de la insulina. Agentes tales como los AGNE, citocinas, angiotensina II, endotelina-1, regulan negativamente las funciones de IRS-1 por fosforilación (48).

Los AGNE pueden afectar el transporte de la glucosa dependiente de la insulina reduciendo la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina ($IR\beta$) y disminuyendo la glucosa libre intracelular.

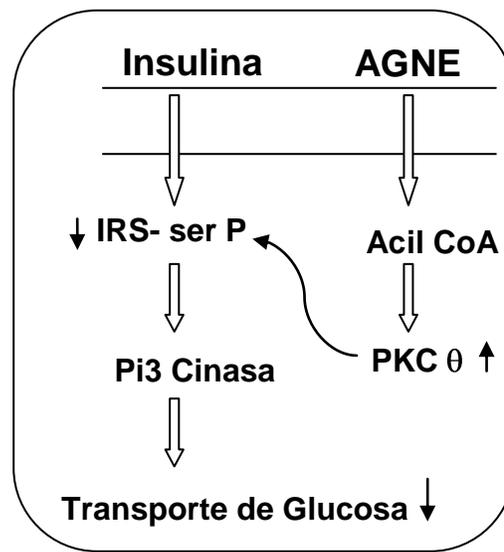


Figura 3. Posible mecanismo de acción de los AGNE reduciendo la sensibilidad del sustrato receptor de insulina. Los AGNE incrementa la concentración de AcilCoA y estimulando la proteína cinasa PKC θ , que fosforila al IRS-1 en el residuo serina/treonina, disminuyendo su actividad como sustrato para la actividad de la tirosina cinasa del receptor insulínico.

3.3 ESTRÉS OXIDATIVO y RI

Existen indicios de que el estrés oxidativo, definido como un desequilibrio persistente entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS, en inglés) o de nitrógeno (ERN o RNS en inglés) y la defensa antioxidante, tiene un papel fundamental en la patogénesis y las complicaciones del síndrome metabólico (49).

Según Halliwell en 1996 (50) tanto ERO como RNS son términos globales que en inglés incluyen tanto radicales como algunos no radicales que son agentes oxidantes del oxígeno y del nitrógeno, son fácilmente convertidos en radicales, es decir, son especies reactivas sean o no radicales libres. Por otro lado, el término reactivo no es un término apropiado globalmente ya que hay radicales y no radicales como H_2O_2



(peróxido de hidrógeno), $\text{NO}\bullet$ (óxido nítrico), $\text{O}_2\bullet-$ (anión superóxido) que son muy pocos reactivos, mientras que el $\text{OH}\bullet$ (el radical hidroxilo) reacciona rápidamente con casi todas las moléculas.

3.3.1 Fuentes de radicales libres

Se sabe que los radicales libres se producen de forma natural como intermediarios o productos de numerosas reacciones oxidativas de las células, así como a través de diversos procesos físico-químicos o de biotransformación (51). También existen fuentes externas. Es decir, se ha de considerar el origen tanto endógeno como exógeno de ERO y ERN. Las ERO pueden producirse a través de la exposición a oxidantes ambientales, tóxicos y metales pesados, que pueden perturbar el equilibrio entre las reacciones de reducción celular y las de oxidación, alterando la normalidad de las funciones biológicas.

3.3.2 Algunas fuentes endógenas.

Las principales fuentes endógenas de radicales libres en la célula son:

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial.
- El transporte electrónico microsomal. (Reacciones de hidroxilación).
- Las células fagocitarias.
- La autooxidación de compuestos de carbono reducido.



– La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasas, monoamina oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa (52).

3.3.2.1 Cadena de transporte electrónico mitocondrial

En la cadena respiratoria mitocondrial, la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estas ERO. Sin embargo, el 95% del oxígeno que respiramos es reducido a H₂O por la acción de la citocromo c oxidasa, último eslabón de la cadena de transporte electrónico, mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros redox proporcionando, además, la principal fuente de energía (ATP) al organismo. También en el complejo I y del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol (ciclo Q) actuando como aceptores de electrones se puede formar el O₂^{-•}.

Cuando el consumo de energía es superior al gasto de energía, el aumento de la actividad del ciclo del ácido cítrico inducido por el sustrato genera un exceso de NADH mitocondrial (mNADH) y de ERO. Para protegerse frente a los efectos nocivos de las ROS, las células pueden reducir la formación de ERO y potenciar su eliminación. La inhibición de la formación de ERO se logra impidiendo la acumulación de mNADH mediante el bloqueo de la captación de nutrientes estimulada por la insulina y reduciendo la entrada de sustratos energéticos (piruvato, ácidos grasos) en las mitocondrias (53).



La acetilCoA, derivada de la glucosa a través del piruvato, o procedente de la beta oxidación de los ácidos grasos, se combina con el oxaloacetato para formar citrato, el cual se incorpora al ciclo del ácido cítrico y es convertido en isocitrato. La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ genera NADH. Cuando no puede eliminarse el exceso de NADH mediante fosforilación oxidativa (u otro mecanismo), el gradiente protónico mitocondrial aumenta y se transfieren electrones individuales al oxígeno, lo cual da lugar a la formación de radicales libres, y en particular de aniones superóxido (54). Se ha sugerido que la interrupción de la sobreproducción de superóxido por parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial podría normalizar la vía que interviene en el desarrollo del estrés oxidativo (55).

3.3.2.2 Transporte electrónico microsomal (reacciones de hidroxilación).

Los peroxisomas, orgánulos responsables de la degradación de ácidos grasos, también pueden originar la formación de radicales libres, produciendo como subproducto H_2O_2 que es degradado por la catalasa.

El retículo endoplásmico, es decir, la fracción microsomal de la célula, contiene el sistema de transporte electrónico no fosforilante (diferente del transporte electrónico mitocondrial que es fosforilante). Dichos sistemas participan en diversas reacciones de hidroxilación y desaturación que producen radicales libres y ERO. Un sistema de hidroxilación, lo constituyen los enzimas microsomales del citocromo P-450, que se encargan de la metabolismo de xenobióticos.



3.3.2.3 Daño oxidativo a biomoléculas.

Aunque tradicionalmente los ERO se han observado desde un punto de vista negativo para la función y viabilidad celular, estas pueden jugar un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica con efectos beneficiosos en los organismos.

En los últimos años se han reconocido y reevaluado la función de las ERO y su papel en funciones de la señalización y de la modulación de la expresión génica. De hecho no es fácil catalogar a las ERO o radicales libres como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores 2002, todo depende del proceso celular que se analice, para ello estos autores toman dos ejemplos:

En la muerte celular por necrosis a consecuencia de los mecanismos de isquemia-reperusión, las ERO no son beneficiosas, mientras que en la muerte celular por apoptosis pueden ser vistas como dañinas o beneficiosas.

El papel de las ERO en los procesos de inflamación también puede ser ambivalente. Se ha visto claramente como beneficiosos en el papel proinflamatorio ya que proporciona un perfeccionamiento en la respuesta inmune que sigue a la infección, pero en trastornos como la artritis reumatoide, la respuesta inflamatoria inapropiada generada por ellos debe ser suprimida. Dañinas o beneficiosas, los investigadores han llegado a la conclusión de que las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante en los cambios de la modulación en la expresión génica y función celular y que estos cambios pueden ser utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo. Las



ERO causan oxidación a biomoléculas tales como lípidos poliinsaturados, colesterol, glúcidos, proteínas y ácidos nucleicos las cuales son susceptibles de ser atacadas in vivo por radicales libres.

3.3.3 SM, ácidos grasos libres y estrés oxidativo.

El aporte energético excesivo y el sedentarismo en el SM causan aumento intracelular de la glucosa y de los ácidos grasos libres. Esto aumenta la acetilcoenzima A que se transforma en citrato que entra al ciclo del ácido cítrico y conduce a una sobreproducción de NADH. El exceso de NADH mitocondrial aumenta la producción de radicales libres y produce estrés oxidativo. A su vez el estrés oxidativo induce la disfunción endotelial, aumenta la resistencia a la insulina y afecta la secreción de insulina por lesión de las células beta. La alteración de la secreción de insulina produce disminución de la tolerancia a la glucosa y diabetes. Estos dos fenómenos constituyen un mecanismo de retroalimentación que aumenta la formación de radicales libres. La enfermedad cardiovascular es el resultado de la disfunción endotelial y de las alteraciones combinadas del SM (56).

En sujetos sanos, la administración de AGNE (como Intralipid) aumenta el estrés oxidativo, evaluado por un aumento en el malondialdehído y una disminución en el plasma de la proporción del glutatión reducido/oxidado. oxidado (57). Varios estudios *in vitro* han descrito la activación del factor nuclear NF- κ B por los AGNE, una consecuencia probable de que los AGNE pueden incrementar la formación de ERO y reducir la concentración del glutatión (58). Este efecto podría también estar vinculado



con la activación de la PKC θ mediada por los AGNE, que tiene la habilidad única entre las diferentes isoformas de la PKC de activar el factor de NF-kB (59).

Los ERO, además de inducir daño macromolecular (ADN, proteínas y lípidos) directamente, pueden funcionar como moléculas de señalización para activar diversas vías sensibles al estrés oxidativo que causan daño celular responsable de las complicaciones de la diabetes. Estas mismas vías están vinculadas con la resistencia a la insulina (60).

3.3.4 Estrés oxidativo y sistema de defensa

Frente a la acción tóxica de los radicales libres, los organismos han desarrollado numerosos mecanismos de defensa antioxidantes que permiten su eliminación o la transformación en moléculas estables (61).

Los sistemas biológicos están en un estado de equilibrio aproximado entre fuerzas pro-oxidantes y su capacidad antioxidante.

El desequilibrio a favor de la acción pro-oxidante es lo que se conoce como estrés oxidativo. De hecho, el daño oxidativo solamente se produce cuando los mecanismos oxidantes superan la capacidad de los sistemas de defensa.

Según Halliwell y Gutteridge, antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, en relación con el sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de dicho sustrato. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta



efectividad, su variabilidad operativa y su versatilidad para poder combinarse con una importante variedad de ERO.

Entre los sistemas antioxidantes cabe destacar:

1. A nivel fisiológico: El sistema microvascular, cuya función es mantener las concentraciones tisulares de O₂, siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas.
2. A nivel bioquímico: La defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como sistemas reparadores de moléculas.

3.3.4.1 Sistema antioxidante enzimático.

El principal sistema de defensa contra los radicales libres lo constituyen proteínas antioxidantes enzimáticas que incluyen la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutación peroxidasa (GPx) (62). La eficacia de esta tríada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de ERO e impedir la interacción de éstas entre sí, para dar lugar a especies más estables de menor reactividad y evitar la peroxidación de las macromoléculas. Hay otros enzimas importantes que también participan en el sistema de defensa, incluidos en las reacciones de la regeneración del Glutación (GSH), como la GSH reductasa, o la NADPH-quinona oxidoreductasa (DT diaforasa).



Diversos trabajos relacionan el EO al SM (66, 67) y lo responsabilizan de importantes daños que ocurren en éste, tales como daño en las membranas celulares, daño del ADN, trastorno en la expresión de genes y disfunción endotelial y renales (68).

3.3.4.2 Sistema antioxidante no enzimático.

Además de proteínas con actividad enzimática antioxidante existen numerosas moléculas antioxidantes hidrofílicas o lipofílicas. Las lipofílicas como el beta-caroteno, el ubiquinol, la vitamina E, protegen la membranas lipídicas y la proteínas membranales de la oxidación.

Las moléculas hidrofílicas como la vitamina C, el GSH, los flavonoides y las melanoidinas, entre otras protegen la proteína y los ácidos nucleicos de la oxidación por radicales libres tales con el radical hidroxilo (69).

3.4 GLICINA

La glicina es un aminoácido dispensable utilizado por el organismo para sintetizar proteínas y para otras funciones. Su cadena lateral es tan sólo un átomo de hidrógeno y no presenta actividad óptica (70).

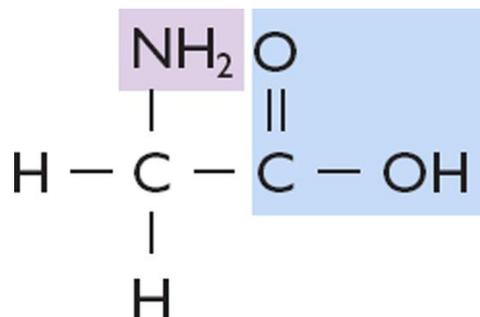


Figura 5. Glicina



3.4.1 Algunas propiedades biológicas de la glicina.

Con base en la literatura disponible, la glicina tiene propiedades biológicas importantes como neurotransmisor. En el sistema nervioso central la glicina actúa a través del receptor de glicina activador del canal de cloro. En los últimos años se ha caracterizado la presencia de un receptor de glicina (glyR) en células endoteliales (71) y en las células de Kupffer similar al receptor descrito en el sistema nervioso central.

3.4.2 Receptor de glicina

El receptor de la glicina está compuesto por 5 subunidades, formadas de subunidades α o la combinación de subunidades α y β que constituyen un complejo pentamérico intracelular.

El receptor de la glicina glyR es un miembro de una familia de canales de cloro activados por el ligando.

Las propiedades funcionales del receptor de la glicina están relacionadas con la composición de las subunidades del pentámero completo.

También se ha demostrado que la glicina tiene un efecto antiinflamatorio, citoprotector e inmunomodulador en diferentes sistemas celulares y órganos (72).

La glicina, al activar los canales de cloro sensibles a este aminoácido de la membrana plasmática de las células de Kupffer y otras células de la serie blanca, origina un influjo de iones cloro conduciendo a la hiperpolarización de la membrana. Con la producción



de estímulos externos tales como endotoxinas, se produce un influjo dependiente de voltaje de calcio libre extracelular a través de canales dependientes de voltaje.

Este incremento en el calcio intracelular es impedido debido al estado de hiperpolarización de la membrana plasmática creado por la interacción de la glicina con su receptor (73). De esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citoquinas que son dependientes del incremento del calcio intracelular.(74)

La glicina previene el aumento del Ca^{2+} libre inducido por un lipopolisacárido (LPS) en las células de Kupffer minimizando la producción de citosinas inflamatorias. Este efecto es mediado por la activación del canal de cloro sensible a la inhibición por estricnina o con ausencia de cloro. Sin embargo en neutrófilos humanos la glicina, a una concentración de 0.1 a 10 mM disminuye la liberación de ROS estimulada por el péptido fLMP o por el éster de forbol (PMA) (75) Este efecto de la glicina es independiente de la actividad del canal de cloro activado por glicina. Estos antecedentes sugieren que el mecanismo por el cual la glicina puede aumentar la sensibilidad a la insulina es disminuyendo el Ca^{2+} intracelular (76).

3.4.3 La glicina como agente protector contra la RI.

El tratamiento con glicina en un modelo de rata con SM inducido por alto consumo de sacarosa, disminuyó la acumulación de grasa intra abdominal, los AGNE plasmáticos y la presión arterial. Además el consumo de la glicina incrementó los nitratos y nitritos



(metabolitos del óxido nítrico) lo que sugiere que la glicina puede estimular la expresión o la actividad de la sintasa de óxido nítrico, un vaso relajante (77). La glicina reduce el estrés oxidante incrementando la expresión de las enzimas antioxidantes tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa.

La glicina es un componente del glutatión reducido (GSH) formado de glutamato, cisteína y glicina, cuya síntesis es catalizada por dos enzimas, la sintasa de γ -glutamilcisteína y la sintasa de GSH. Una deficiencia en el consumo de proteínas disminuye los niveles de glicina circulante con una subsiguiente deficiencia de GSH y un incremento de estrés oxidante.



4. ANTECEDENTES DEL MODELO DE SM

Nuestro modelo de rata con síndrome metabólico es una variante del modelo descrito por Reaven (78), en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en ratas. Se ha realizado una caracterización parcial de este modelo y los principales hallazgos son los siguientes:

4- Aumenta la peroxidación lipídica en el plasma de los animales con diferencias asociadas con el sexo de los animales (79).

6. El consumo de sacarosa induce alteraciones en la actividad de diversas enzimas antioxidantes (80).

1- Produce un aumento significativo en la concentración de los AGNE circulantes, la insulina y una importante acumulación de la grasa intra-abdominal (45) en comparación con los animales sin tratamiento.

2- Altera en la actividad de las enzimas de desaturación de los ácidos grasos sobre todo la $\Delta 9$ y $\Delta 5$ -desaturasas, enzimas clave en la biosíntesis de los ácidos monoinsaturados y poliinsaturados implicados en la regulación del estado físico de la membrana (81).

3- Altera el estado físico de la membrana microsomal (mayor fluidez) (82).

5- Altera la composición de los ácidos grasos de diferentes tejidos tales como la aorta, las plaquetas, así como en el plasma. (83).



5. HIPÓTESIS

La glicina reduce la RI en un modelo de SM, induciendo cambios en la fosforilación de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de la insulina tales como el IR β y el IRS1/2, y disminuyendo el estrés oxidativo inducido por acumulación de AGNE en la circulación y en el hígado de los animales con SM.

OBJETIVOS GENERALES

Investigar el mecanismo por el cual la glicina reduce la RI en los animales con SM en comparación con los animales testigo.

Investigar el mecanismo por el cual la glicina protege contra el estrés oxidativo inducido por los AGNE en los animales con SM

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la glicina sobre el grado de la fosforilación del receptor de la insulina IR β (tirosina), del sustrato IRS-1/2 (serina) y de la AKT (tirosina) en el tejido hepático de los animales con SM.
- Evaluar el efecto de la glicina sobre la carbonización de la proteínas como índice de estrés Oxidativo.
- Evaluar el efecto de la glicina sobre la actividad de la catalasa, de la SOD.
- Analizar la composición y el contenido de los AGNE en el hígado u en el plasma.
- Evaluar la participación del receptor de la glicina en el mecanismo por el cual reduce la RI, utilizando estriknina como inhibidor del receptor.



7. JUSTIFICACIÓN

El modelo del SM ha sido desarrollado en nuestro laboratorio con la idea de que represente la patología resultante de un estilo de vida con dietas inadecuadas por un consumo excesivo de hidratos de carbono y grasa, que da lugar a enfermedades asociadas con un alto índice de morbimortalidad como son la obesidad central, la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial, entre otras.

El estudio del mecanismo por el cual los AGNE afectan la sensibilidad del receptor de la insulina no ha sido abordado en detalle, por lo que el proyecto pretende complementar el conocimiento actual; además, la información que se obtenga podrá ser útil para aplicar medidas preventivas o terapéuticas para este cuadro patológico, aunque todavía queda por explicar la participación de otras vías y sus componentes, así como de otros factores. El uso de antioxidantes o la suplementación de la dieta con el amino ácido glicina para la posible prevención de enfermedades cardiovasculares, ejemplifican tales aplicaciones.



8. DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1 Tratamiento de los animales.

Se utilizará ratas Wistar macho recién destetadas; se dividirán en dos grupos de doce ratas cada uno:

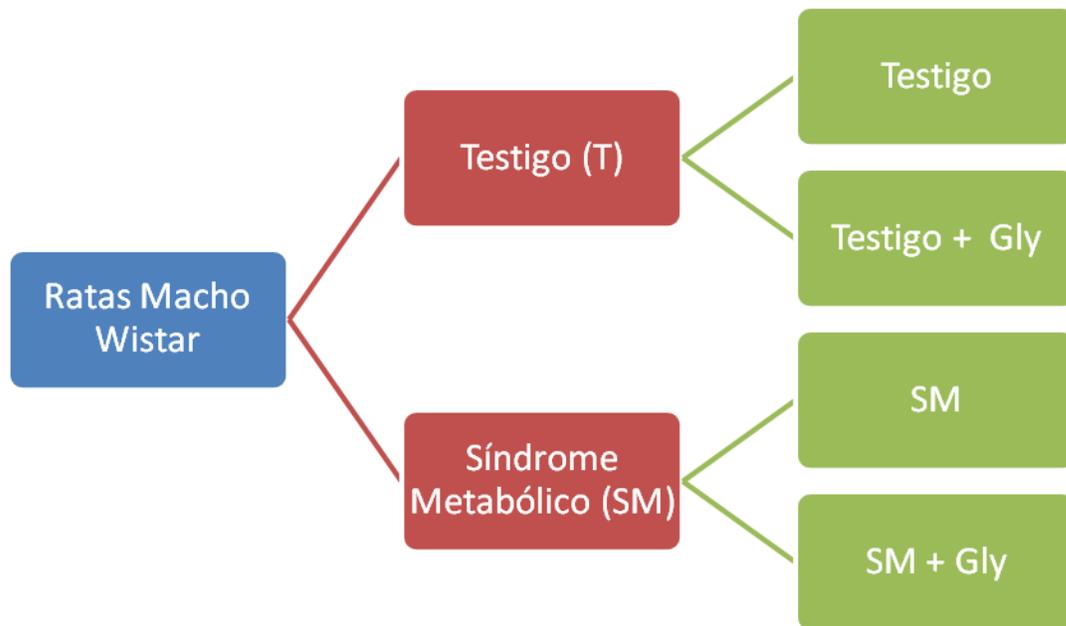
Grupo SM: ratas que consumirán sacarosa al 30% en el agua de beber, para inducir SM.

Grupo T: ratas testigo que solo recibieron agua para beber.

Todos los animales recibirán alimento comercial (Lab diet fórmula 5008, Ralston Purina Corp., St Louis, MO) para roedores. Al final de 24 semanas de tratamiento, tanto al grupo de las ratas SM como T se subdividieron en dos nuevos grupos:

Dos grupos T y SM continuarán con el mismo tratamiento, y a dos grupos TG y SMG se les adicionará glicina al 1% en el agua de beber durante cuatro semanas más.

Al final del tratamiento se pondrán las ratas en ayuno durante una noche. Se anestesiarán con pentobarbital sódico (60mg/kg) y se sacrificarán, para la realización de los experimentos, según el esquema siguiente.



9.2 Evaluación de la RI

La RI se determinará por el método directo de la pinza euglicémica-hiperinsulinémica. Los animales T y con SM se someterán a un operación con anestesia para la inserción de los catéteres, un día anterior a la realización del experimento. Los catéteres de calibre PE50 se insertarán en las dos venas yugulares para infusión de glucosa y de insulina y otro catéter en la carótida para coleccionar sangre y medir glucosa por medio de un glucómetro (Roche). Por medio de una bomba peristáltica de alta precisión se realizará la infusión de la insulina por la yugular derecha a un flujo constante de 18 mU insulina/kg de peso corporal/min. La solución de glucosa al 34% se administrará a los animales por medio de otra bomba peristáltica de alta precisión por la yugular izquierda. En esta técnica, la infusión de insulina a alta concentración (hiperinsulinemia) incrementa la internalización de la glucosa circulante a tejidos sensibles a la insulina



(músculo esquelético y tejido adiposo) e inhibe la producción de glucosa endógena por el hígado. La disminución de glucosa en el plasma se previene por un flujo variable de una solución de glucosa. La cantidad de glucosa exógena requerida para mantener la glucosa plasmática en una concentración se cuantifica por la velocidad de infusión de glucosa (VIG). VIG es una medición de la capacidad de la insulina para incrementar la internalización de la glucosa y suprimir la producción de glucosa, es decir es una medida de la sensibilidad del tejido a la insulina en cada animal. La euglicemia se mantiene en una relación variable de infusión de glucosa que se ajusta de acuerdo con la glucosa plasmática en intervalos de 10 minutos durante dos horas de la pinza hiperinsulinémica euglicémica.

9.3 Obtención del plasma

La sangre se recolectará de la aorta abdominal en presencia de anticoagulante (EDTA al 0.1%) y para evitar la hemólisis. La muestra se centrifugará a 800 x g durante 20 min a 4°C se separará el plasma y se le adicionará butilato de hidroxitolueno (BHT) al 0.002% como antioxidante, se almacenará a -70°C hasta la cuantificación de los lípidos e insulina.

9.4 Análisis en plasma de AGNE, triglicéridos, glucosa e insulina.

Los AGNE se determinarán por cromatografía, los AGNE se extraerán según el método de Folch (84), utilizando cloroformo metanol (1:1 v/v) que contiene 0.002% de BHT y en presencia del ácido heptadecánico como estándar interno. El extracto lipídico se



tratará con el 2,2 mitoxipropano para la formación de esteres metílicos de los AGNE. Estos últimos se analizarán en un cromatografo Carlo Erba Fractovap 2300 equipado con una columna capilar de SP2330 de 25 m de largo y 0.25 mm de diámetro interior a 190 °C utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 1ml/min.

Los diferentes AGNE fueron identificados según sus tiempos de retención determinados con anterioridad con estándares comerciales (Supilco).

La concentración de los triglicéridos y de la glucosa se medirá utilizando un estuche comercial. La insulina se evaluó con el método de radio-inmuno-ensayo (RIA) utilizando un estuche específico para rata.

9.5 Obtención de homogeneizado de hígado para la evaluación del grado de fosforilación de receptor del IR β e IRS-1/2

Al final del tratamiento los animales en ayuno se anestésarán. La cavidad abdominal se abrirá, y se inyectará en la vena porta inferior, insulina (2UI/kg), después de transcurrido un minuto se tomará una muestra de hígado (600 mg) y se homogeneizará utilizando un homogeneizador manual de 3 mL a 4° C en 1 mL de amortiguador de lisis (50 mM NaF, 1% TritónX100 y 100 mM Tris, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM EDTA, pH 7.2) con 1 mM ortovanadato de sodio, 1mM de fluoro-fenilmetilsulfonilo (PMSF), 2 μ g/mL aprotinina y 2 μ g/mL de leupeptina como anti-proteinaza) a 4°C. Después de centrifugar el homogenizado a 558xg para eliminar todo el tejido conjuntivo y los residuos celulares se obtendrá el sobrenadante en el que se determinará la proteína por el método de Lowry.



9.6 Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificará según el método de Lowry modificado (85).

Se preparará tres soluciones: sol A (NaOH_3 al 1%), sol B (tartrato de sodio y potasio al 1%) y sol C (CuSO_4 al 5%).

El sobrenadante obtenido del proceso de homogeneización se diluirá 1:100 en solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se medirá la proteína con 100 μL de esta solución por duplicado.

Paralelamente se preparará una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la siguiente manera. Se colocará: 0, 10, 20, 40, 60 μL de la solución de ASB en tubos de ensayo y se llevará a 100 μL de solución salina y se adicionará 1mL de la mezcla hecha con las soluciones A(10ml), B(100 μL) y C(100 μL). Después de 10 minutos de incubación se adicionarán 100 μL de Folin 1N y se incubará durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

La absorbencia se determinará en un espectrofotómetro Beckman a 750 nm. La curva de calibración que corresponde a la absorbencia en función de las concentraciones utilizadas de ABS es lineal y obedece a la ley de Beer Lambert, lo que permite determinar la concentración de proteína presente en las muestras.

9.7 Electroforesis y Western Blot

Se tomará el volumen necesario para tener 100 μg en proteína de cada muestra, se suspenderá en 20 μL de amortiguador de carga (250 μL de glicerol; 750 μL de una



solución de SDS al 10 %; 300 μ L de una solución de Tris- base 60 mM, pH 6.8; 210 μ L de una solución al 1% de bromofenol) y se ajustará el volumen con leamli (Tris 40 mM, SDS 1%, β -mercapto etanol al 1%).

Se depositará 100 μ g de muestra en un gel de poliacrilamida al 7.5% el resolovedor y al 4% el concentrador, se colocará en una cámara de minigeles Bio-Rad (10x10cm x 0.75mm). Las muestras se correrán durante 150 minutos a 120 V. La transferencia de las proteínas se realizará en membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0.45 μ m, Millipore Corporation) a 350 mA durante 40 minutos en una cámara de transferencia en semi seco (Bio- Rad, Trans Blot SD).

La detección de proteínas no específicas se reduce incubando las membranas en una solución TBS (Tris base 25 mM , NaCl 150 mM) que contiene leche descremada al 5 %, y 0.1% Tween 20 , posteriormente las membranas se incubarán con anticuerpos policlonales contra IR β , IRS $\frac{1}{2}$ y AKT (Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución de 1:1000 en solución bloqueadora al 3% de leche sin grasa en polvo, TBS durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al final de incubación las membranas se lavarán 5 veces con TBS- Tween y dos veces solo con TBS.

Como anticuerpo secundario se utilizará anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:1500 en TBS Tween a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente se lavará 5 veces, dos veces con TBS- Tween y tres con solo TBS; las proteínas se revelarán por medio de quimioluminiscencia con un estuche de luminol y H₂O₂ (Millipore). Las membranas incubadas con el reactivo quimioluminescente estarán expuestas a placas radiograficas (BioMax Kodar) durante 5 minutos. La revelación de



las placas radiográficas se hará por medio de una solución reveladora (Kodak) y se fijara con una solución fijadora. Las bandas obtenidas se analizarán por densitometría en un analizador de imagen UVP (Inc, Upland, CA, USA).

Para el control de carga, las mismas membranas se incubarán en una solución de 40mM de SDS y 250 mM de glicina, pH 2, durante 30 minutos para eliminar los reactivos y los anticuerpos utilizados anteriormente. Posteriormente se incubarán en una solución TBS-Tween que contiene leche descremada al 5% durante 1 hora, después se tratarán las membranas de la misma manera como se explico anteriormente pero en este caso se utilizará anticuerpo anti β - actina como control de carga.

9.8 Efecto agudo de la glicina sobre la fosforilación de IR β e IRS-1/2 y AKT en animales testigo

A las ratas testigo (350g pc) anestesiadas con pentobarbital (60 mg/kg pc); se les administrará por la vena femoral glicina a diferentes concentraciones (100 mM, 10 mM y 1 mM). El ácido oleico como AGNE que formará un complejo con albúmina de suero de bovino en la proporción 4:1 se inyectará por la misma vía que la glicina 5 min después. Treinta min después se hará una incisión en el abdomen para tener acceso a la vena porta inferior para administrar insulina a fin de activar el IR β , 60 segundos después se realizará la disección de una muestra del hígado y se preparará el homogeneizado utilizando un amortiguador de lisis conteniendo anti proteinasas.

Por medio de electroforesis de SDS-PAGE al 8% y Western blot utilizando anticuerpos



policlonales contra el receptor de la insulina subunidad beta (IR β -P) fosforilada en la tirosina y contra el sustrato del receptor de la insulina (IRS1/2- P) fosforilada en la serina se analizará el grado de fosforilación del receptor IR β - P y de IRS-1/2-P.

9.9 Actividad de la catalasa

La actividad de la enzima se medirá por medio de electroforesis en gel nativo (sin SDS) al 8 %. Se depositará 1 μ g de cada muestra de homogeneizado de hígado suspendido en un amortiguador de carga que contiene azul de bromofenol y glicerol.

El gel de poliacrilamida se hará en una cámara de minigeles Bio-Rad (10x10cm x 0.75mm). La electroforesis se realizará durante 300 minutos a 80 V.

Al final de la electroforesis el gel se lavará por 2 minutos con agua bidestilada para quitar el amortiguador de corrida y se incubará por 10 minutos con 4.4 mM de H₂O₂ y finalmente a un gel se agregará una solución de ferrocianuro/cloruro férrico al 1% en el agua para la tinción de la actividad de la catalasa que consiste en una banda blanca sobre fondo verdoso oscuro. El otro gel se teñirá con cloruro de plata para visualizar las bandas de todas las proteínas tomadas como control de carga.

9.10 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

En geles de poliacrilamida al 8% en una cámara de minigeles Bio-Rad (10x10cm x 0.75mm), se depositarán 20 μ g de proteína de cada muestra de hígado extraída de los diferentes animales. La electroforesis de la muestras se realizará durante 180 minutos



a 100 V.

Un gel se lavará con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.8 durante 10 minutos y se incubará en la misma solución de fosfatos más 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azul de nitrotetrazolium, 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rivo flavina, 0.25 % TEMED por 15 minutos en la obscuridad, finalmente se expondrá el gel a la luz blanca hasta que fueron visibles las bandas que corresponden a la actividad de la SOD sobre fondo del gel que es azul.

Por otro lado, el otro gel se designará para control de carga y se realizará una tinción con plata. Se agregarán 10 mL de una solución fijadora (40% etanol, 10% ácido acético) por 30 minutos, después se añadirá solución sensibilizadora (30% etanol, 0.2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$, 6.8% acetato sódico) durante 30 minutos, se lavará 3 veces por 5 minutos con agua Milli-Q, Posteriormente se agregará AgNO_3 2.5g/L por 20 minutos , se lavará 2 veces/1 minuto con agua Milli-Q , se añadirá la solución de revelado (2.5% Na_2CO_3 , HCOH 37%) se agitará el tiempo necesario para revelar el gel aproximadamente 5 minutos, finalmente se agregará una solución de EDTA-Na al 1.46% para finalizar la reacción.

9.11 Carbonilación de proteínas

En un tubo Eppendorf se colocará 1 mg de proteína de las muestras de hígado de los diferentes tratamientos (T, T+G, SM, SM+G) y se suspenderá en un volumen de 400 μL de solución salina mas 100 μL de sulfato de estreptomycin al 10 %, se centrifugará a 12,852 xg /10 min para la precipitación del ADN. Después de la recuperación del sobrenadante se le agregará 500 μL de una solución de 20 % TCA (ácido tricloro-



acético), se centrifugará a 12,852 xg rpm/10min, se desechará el sobrenadante. La pastilla se suspenderá en 500 μ L del reactivo 2,4 dinitrofenilhidrazina al 10mM en una solución de HCL (1N), se incubará durante una hora a temperatura ambiente con agitando con vortex cada 15 minutos. Posteriormente se agregarán 500 μ L de una solución de TCA al 20 % y se centrifugará a 12.853 xg durante 3 min. El sobrenadante se descartará y el pelet se lavará 3 veces durante 10 min con 1mL de etanol/acetato etílico (1:1, v:v). Para remover el reactivo libre, la suspensión se centrifugará a 12.853 x g durante 3 min para descartar el sobrenadante. La pastilla obtenida se disolverá en 1mL de urea (6M) por 15 minutos a 37°C. El material insoluble se eliminará por centrifugación 12.8

53 x g/3min y finalmente se leerá en el espectrofotómetro (Beckman DU 640) a 360 nm utilizando un coeficiente de absorción molar de 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ para el cálculo de la concentración de los carbonilos por mg de proteína.

Cabe mencionar que para cada muestra se tendrá un blanco, que se tratará de la misma manera sin adicionar el reactivo 2,4 dinitro – fenilhidrazina y, para realizar el cálculo, se sacará la diferencia entre el blanco y el reactivo.



9. RESULTADOS

10.1 Características generales del modelo.

El tratamiento de las ratas Wistar con sacarosa durante 24 semanas indujo una mayor acumulación de grasa intraabdominal y un aumento en la concentración de los triglicéridos en comparación con los animales control.

Los niveles de insulina en plasma fueron significativamente más altos en el grupo con SM que en el testigo. En cuanto al peso corporal y la concentración de glucosa plasmática no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla 1). El tratamiento con glicina de los animales disminuyó de una manera estadísticamente significativa, todos los parámetros que caracterizan el SM como los triglicéridos, la insulina en plasma y la grasa intraabdominal. La glicina no tuvo efecto en los animales testigo.

TABLA 1. Características generales en el modelo

| | T | SM | T + Gli | SM +Gli |
|--------------------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| Peso corporal g | 448 ±12 | 475 ±10 | 467 ± 15 | 466 ± 9 |
| Grasa intra abdominal g | 6.4 ± 1.4‡ | 23.4 ± 1.8 | 6.3 ± 1.9 | 9.8 ± 1.9‡ |
| Triglicéridos mg/dL | 43.1 ± 7.5*** | 96.9 ±7.1 | 32.8 ± 4.3 | 75.0 ± 7.0* |
| Colesterol mg/dL | 38.4 + 12.8 | 42.2 ± 13.2 | 47.9 ± 12.1 | 55.1± 16.9 |
| Glucosa mmol/L | 6.0 + 1.0 | 5.9±1.2 | 5.5±0.7 | 6.4±1.5 |
| Insulina µUI/mL | 8.1 + 1.7§ | 15.2± 3.1 | 3.7±1.8§ | 9.4±1.4§ |

Los triglicéridos, el colesterol, la glucosa y la insulina fueron evaluados en el plasma. Los valores representan la media ± DS, n = 6 a 8 diferentes animales. *** p< 0.001 (T vs SM) * p<0.05 (SM +Gli vs SM), § p=0.01 (T vs MS) y SM vs MS+Gli , ‡ p<0.05 (T vs MS).



10.2 Análisis de ácidos grasos no esterificados (AGNE).

La tabla 2 muestra que la concentración total de AGNE plasmáticos fue significativamente más alta ($p < 0.001$) en el grupo con SM en comparación con el grupo testigo. Este aumento en la concentración de los AGNE total resulta del aumento significativo en la concentración del ácido palmítico ($p < 0.01$), palmitoléico y oleico ($p < 0.001$).

El ácido esteárico no sufrió ningún cambio significativo en ambos grupos. El tratamiento de los animales con SM con glicina normalizó la composición de los AGNE en el plasma.

TABLA 2. Concentración de AGNE en plasma

| AGNE | T | T + Gli | SM | SM + Gli |
|---------------------|-------------|--------------------------|----------------|----------------------------|
| Palmítico | 0.22 ± 0.02 | 0.21 ± 0.06 | 0.39 ± 0.06* | 0.24 ± 0.01 |
| Palmitoléico | 0.02 ± 0.01 | 0.02 ± 0.01 | 0.18 ± 0.06** | 0.064 ± 0.002 [‡] |
| Esteárico | 0.08 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 | 0.06 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 [‡] |
| Oleico | 0.15 ± 0.02 | 0.09 ± 0.03 [§] | 0.32 ± 0.06*** | 0.17 ± 0.04 ^{‡‡} |
| Linoleico | 0.14 ± 0.02 | 0.11 ± 0.01 | 0.10 ± 0.02** | 0.06 ± 0.01 ^{‡‡} |
| Araquidónico | 0.07 ± 0.02 | 0.05 ± 0.002 | 0.05 ± 0.01* | 0.04 ± 0.01 |
| Totales | 0.68 ± 0.07 | 0.57 ± 0.11 | 1.11 ± 0.09*** | 0.64 ± 0.08 ^{‡‡} |

Los datos representan la concentración en mM (media ± DS; n = 6).

*** Significativamente diferente del T ($P < 0.001$); ** ($P < 0.01$); * ($P < 0.05$)

^{‡‡} Significativamente diferente del SM ($P < 0.001$); [‡] ($p < 0.05$).

[§] Significativamente diferente del T ($P < 0.05$).



En el homogeneizado de hígado, igual que en el plasma, las concentraciones de AGNE presentáron un incremento significativo en la concentración total de AGNE ($p < 0.001$) en el grupo SM en comparación con el grupo testigo. En la composición de los AGNE presentes en el hígado se encontró un aumento significativo en el ácido oleico ($p < 0.001$) y palmitoleico ($p < 0.01$) del grupo SM (Tabla 3). El tratamiento con glicina de los animales SM normalizó la composición de los AGNE en el homogeneizado de hígado.

Tabla 3. Concentración de AGNE en homogeneizado de hígado.

| AGNE | T | T + Gli | SM | SM + Gli |
|--------------|-------------|--------------|-----------------|--------------|
| Palmitico | 29.8 ± 15.3 | 18.4 ± 3.7 | 35.8 ± 6.1 | 20.3 ± 9.1‡ |
| Palmitoleico | 0.6 ± 0.7 | 0.5 ± 0.2 | 6.3 ± 2.1** | 7.5 ± 8.7 |
| Estearico | 12.2 ± 3.8 | 9.3 ± 1.7 § | 13.3 ± 2.4 | 7.4 ± 3.2‡ |
| Oleico | 11.1 ± 6.5 | 7.6 ± 2.5 | 32.1 ± 8.5*** | 16.7 ± 8.7‡‡ |
| Linoleico | 14.3 ± 8.4 | 9.4 ± 6.2 | 17.9 ± 6.4 | 7.9 ± 5.5‡‡ |
| Araquidónico | 10.2 ± 5.6 | 6.2 ± 1.6§§ | 11.9 ± 3.7 | 3.5 ± 3.7‡‡‡ |
| Totales | 78.5 ± 11.4 | 51.8 ± 10.9§ | 117.5 ± 27.6*** | 62.5 ± 31.7‡ |

Los datos representan la concentración en nmol/mg proteína (media ± DS; n = 6).

*** Significativamente diferente del T ($P < 0.001$); ** ($P < 0.01$); * ($P < 0.05$)

‡‡ Significativamente diferente del SM ($P < 0.001$); ‡‡ ($P < 0.01$), ‡ ($P < 0.05$)

§§§ Significativamente diferente del T ($P < 0.01$). § ($P < 0.05$).

10.3 Efecto de la glicina sobre la RI

La figura 1 muestra la variación de la velocidad de infusión de la glucosa (VIG) ($\mu\text{mol/kg/min}$) en función de tiempo (min) en presencia de alta concentración de



insulina. Durante los primeros 20 min del experimento la VIG aumentó de una manera similar en los dos grupos. Entre los 20 y los 40 min la velocidad de infusión de glucosa aumentó mucho más en los animales testigo que en los animales con SM.

Después de 40 min la velocidad de infusión llegó a un punto donde la variación fue mínima durante 80 min. Los 80 min presentan la pinza hiperinsulinémica-euglicémica. Se observa que los animales testigo requieren una mayor velocidad de infusión de la glucosa que los animales con SM. El tratamiento de los animales SM con glicina aumenta la velocidad de infusión de la glucosa de una manera muy significativa.

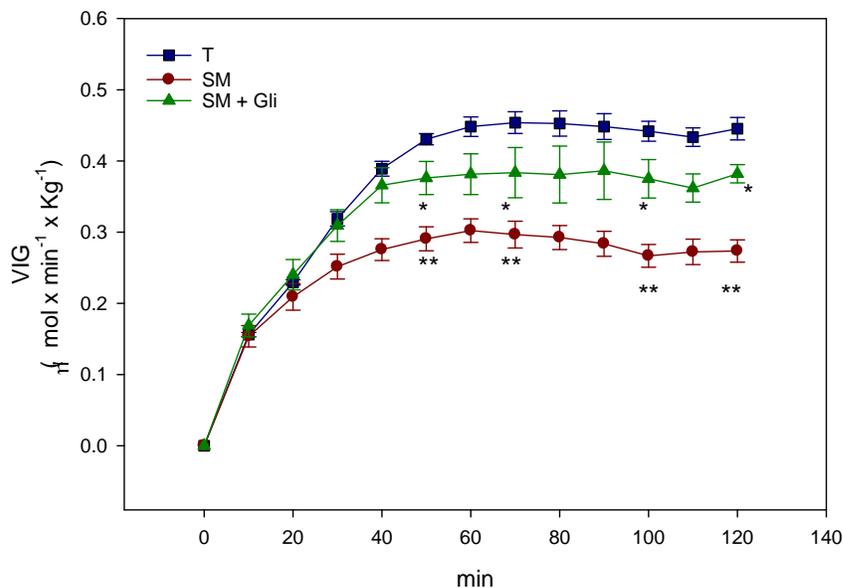


Figura 6. Pinza hiperinsulinemica-euglicemica. En presencia de alta concentración de insulina los animales T requieren una mayor velocidad de infusión de la glucosa que los animales con SM. La glicina aumenta la velocidad de infusión en los animales con SM sin llegar a los niveles de los animales T.

Los valores corresponden a la media \pm DS ($n=6$ a 8 animales diferentes). ** $p<0.01$ (SM vs T); * $p<0.05$ (SM +Gli vs SM). VIG: velocidad de infusión de insulina.



10.4 Expresión basal del IR- β y IRS-1/2 en homogeneizado de hígado.

Por medio de electroforesis de SDS-PAGE y Western blot, utilizando anticuerpos policlonales contra el receptor de la insulina IR β y contra el sustrato del receptor de insulina IRS-1/2, se analizó el contenido basal del receptor de las dos proteínas IR β , y el sustrato IRS-1/2 en los homogeneizados de hígado (Fig. 8). El análisis por densitometría de las bandas no muestra diferencias en la expresión del receptor IR β ni del IRS-1/2 entre los animales tratados con y sin sacarosa. El tratamiento con glicina en ambos grupos de animales tampoco tuvo efecto sobre la expresión de las dos proteínas.

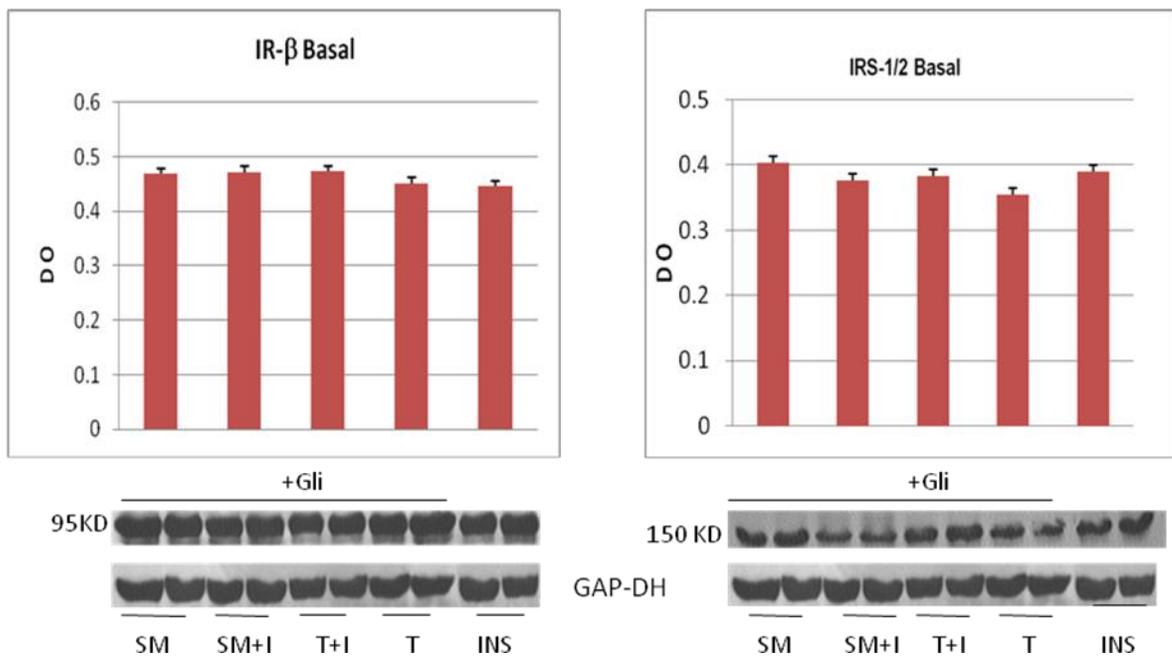


Figura 7. Análisis por WB de la expresión total de las proteínas IR β (95 KD) y IRS-1/2 (150 KD) (proteína fosforilada y sin fosforilación). Las bandas de GAPDH fueron consideradas como control de carga, el análisis por densitometría de las bandas no muestra diferencias en la expresión del receptor IR β ni del IRS-1/2 entre los grupos de animales. El tratamiento con glicina en ambos grupos tampoco tuvo efecto sobre la expresión de las dos proteínas.



10.5 Fosforilación en la tirosina del IR- β .

La fosforilación del IR β y del IRS-1/2 es el primer evento de la cascada de señales inducidas por la interacción entre la insulina y su receptor y que termina en la translocación del transportador de la glucosa 4 (Glut4) hacia la membrana en tejido cuyo transporte de glucosa depende de la insulina. Para comparar el grado de fosforilación del IR β entre los dos grupos de animales con y sin SM, se administró a los animales por medio de la vena porta inferior 2UI/kg pc de insulina.

El análisis por Western Blot (Figura 9) del IR β fosforilado en sus residuos de tirosina, en homogeneizado de hígado, muestra que hay una mayor fosforilación del IR β en los animales T que los del SM y que el tratamiento con glicina aumenta la fosforilación del IR β en ambos grupos de animales.

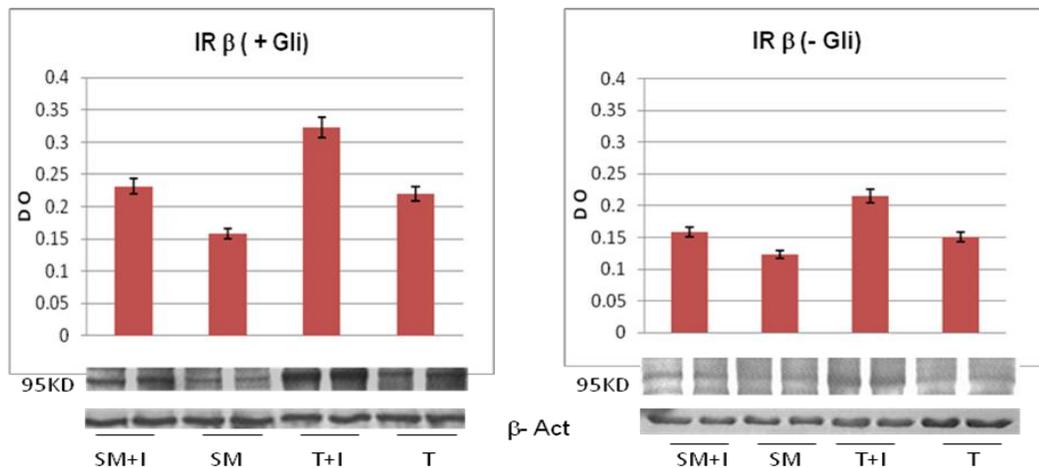


Figura 8. Efecto de la glicina sobre la fosforilación del receptor IR- β en la tirosina inducida por administración de insulina, la glicina aumenta la fosforilación del IR- β y hay una mayor fosforilación del IR β en los animales T que los del SM. Para el control de carga un anticuerpo anti beta actina fue utilizado.



10.6 Fosforilación en la serina del IRS 1/2.

El tratamiento con glicina disminuye la fosforilación del IRS1/2 en la serina en ambos animales; en presencia de insulina la fosforilación de receptor es casi nula probablemente favoreciendo la fosforilación del IRS1/2 en el residuo tirosina (ver Figura 10).

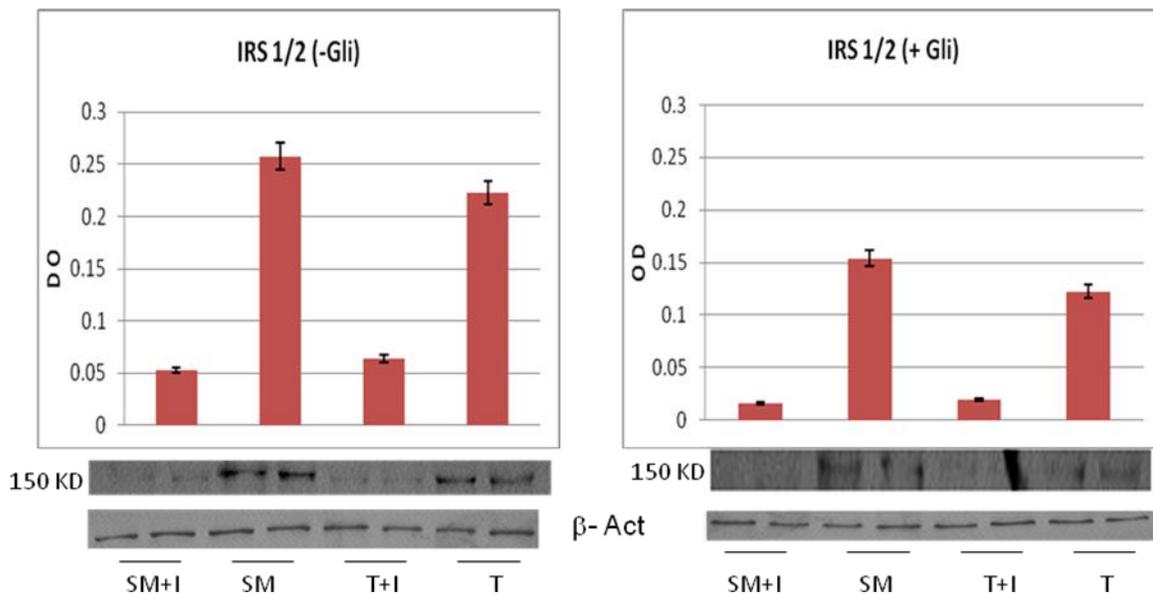


Figura 9. Efecto de la glicina sobre la fosforilación del receptor IRS-1/2 en el residuo serina inducida por la administración de insulina. La glicina disminuye la fosforilación del IRS-1/2 en el residuo serina y hay una menor fosforilación en los animales T que los del SM. Para el control de carga un anticuerpo anti beta actina fue utilizado.

10.7 Efecto de la glicina sobre la fosforilación de AKT.

La glicina induce un aumento en la fosforilación de AKT en el residuo tirosina inducida por la administración de insulina en ambos grupos de animales. En ausencia de glicina



no se observa diferencia significativa en la fosforilación de AKT entre SM y T, tampoco la insulina produjo un aumento significativo en la fosforilación de AKT.

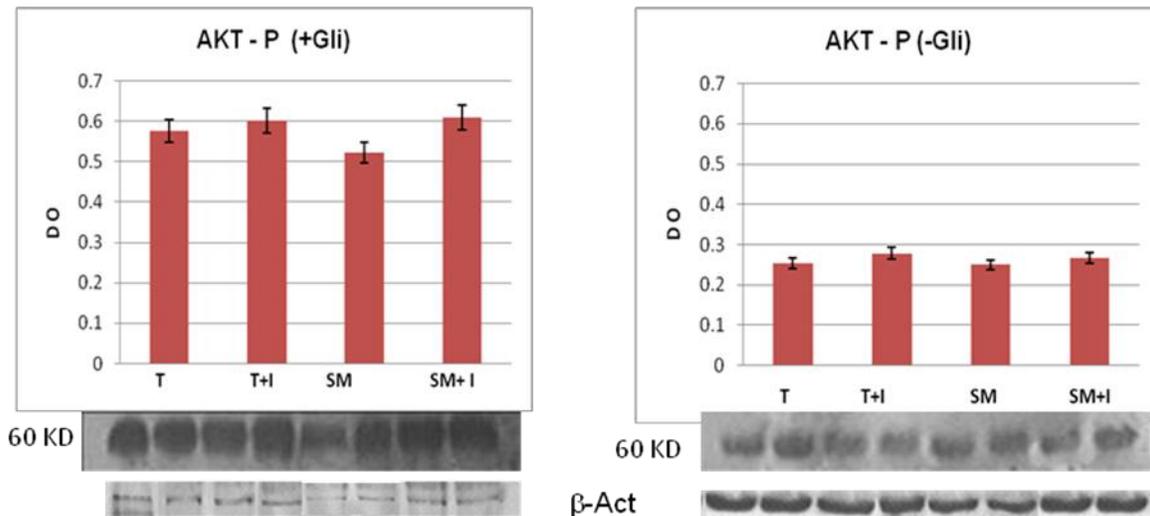


Figura 10. Efecto de la glicina sobre la fosforilación de AKT en el residuo tirosina inducida por administración de insulina. La fosforilación del AKT, la glicina aumenta la fosforilación de la proteína AKT en ambos grupos pero no tiene efecto entre los dos grupos de animales.

10.8 Efecto agudo de la glicina sobre la fosforilación del receptor IR β .

Estos experimentos fueron realizados para investigar el efecto directo de la glicina sobre la cascada de señalización inducida por insulina en animales testigo. La disminución de la fosforilación del receptor IR β y IRS que reflejan la resistencia a la insulina, se indujo administrando a los animales ácido oleico como ácido graso no esterificado que disminuye la fosforilación del receptor IR β en el residuo tirosina, y en al IRS-1/2 aumenta en el residuo de serina.

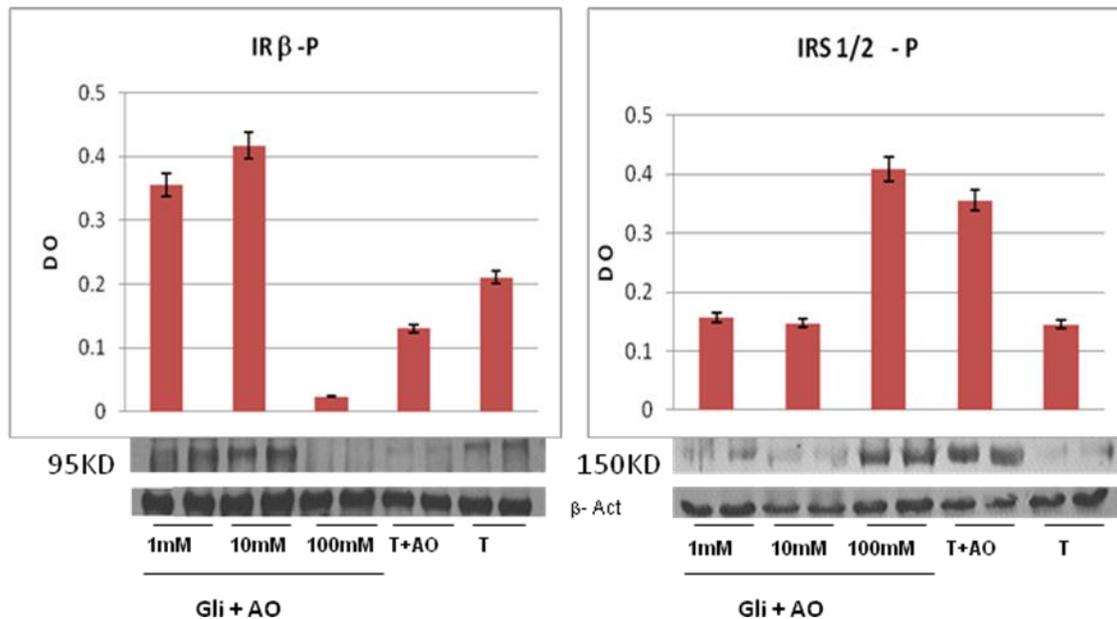


Figura 11. Efecto de la glicina a diferentes concentraciones sobre la fosforilación del receptor $IR\beta$ en la tirosina e IRS1/2 en la serina, en presencia de ácido oleico (AO) ($100 \mu\text{mol/kg pc}$). La fosforilación fue inducida por la administración de la insulina después de la administración de glicina y AO. La beta actina fue considerada como control de carga.

Por la vena femoral de las ratas (250-300g) se administró glicina a diferentes concentraciones y ácido oleico y se evaluó la fosforilación de receptor $IR\beta$ e IRS-1 (Figura 11) inducida por administración de insulina. Se observó aumento en la fosforilación en el receptor de $IR-\beta$ con glicina en comparación con insulina solamente aun mayor que en las ratas con solamente insulina, un efecto contrario en IRS-1/2 fosforilado en la serina.

La administración del ácido oleico disminuye la fosforilación del $IR\beta$ inducida por insulina, el tratamiento de los animales con glicina a 1mM Y 10 mM revierte el efecto del ácido oleico aumentando la fosforilación del receptor. A una concentración de



100mM de glicina no cambia el efecto del ácido oleico sobre la fosforilación del receptor.

10.9 Efecto del ácido oleico y de la N-acetil cisteína sobre la fosforilación del IR β en homogenizado de hígado.

Cada grupo de animales se dividió en cuatro subgrupos: 1) tratados con albúmina (ASB, como vehículo control), los siguientes tres grupos recibieron un bolo de insulina como se indica en la metodología, 2) tratados con albúmina (BSA+INS), 3) tratados con ácido oleico (AO), y finalmente tratados con el antioxidante N-acetil-cisteína más ácido oleico (NAC+AO).

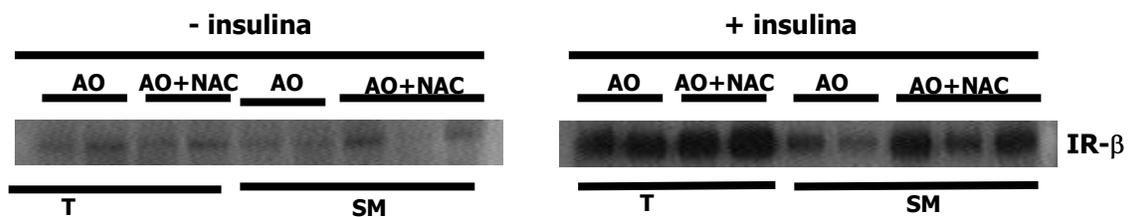


Figura 12. Efecto del ácido oleico y de la N-acetil-cisteína sobre la fosforilación del IR β en el residuo tirosina, la fosforilación del IR- β sin insulina en el SM fue menor que el grupo T. El tratamiento con ácido oleico de los animales T y SM disminuye el grado de fosforilación del receptor de insulina en ambos grupos, el antioxidante NAC aumenta los niveles de fosforilación del receptor de insulina tanto en el grupo T como en SM.

El análisis por densitometría de las bandas de cada proteína muestra que en el primer grupo donde las ratas recibieron albúmina como vehículo, el porcentaje de la densidad óptica (D.O.) que corresponde al nivel de fosforilación basal del IR- β en el grupo SM fue más bajo que en el grupo T. El grado de fosforilación del receptor de insulina



aumento de una manera mucho más importante en las ratas T que en las ratas con SM (Figura 12). El tratamiento con ácido oleico de los animales testigo y SM, disminuyó significativamente el grado de fosforilación del receptor de insulina en ambos grupos . Para investigar si el efecto del ácido oleico sobre la fosforilación del receptor de insulina implica la generación de ERO (estrés oxidativo) se administró el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) durante 20 minutos antes de inyectar el ácido oleico en los animales, lo que mostró la recuperación total de los niveles de fosforilación del receptor de insulina tanto en el grupo testigo como en SM (grupo NAC+AO, figura 12); lo anterior indica que el antioxidante N-acetil-cisteína protege contra el estrés oxidativo inducido en el hígado por los AGNE (ácido oleico) en tiempos cortos afectando los niveles de fosforilación del receptor de insulina.

10.10 Participación del receptor de la glicina en la fosforilación del receptor IR β .

Para investigar la participación del receptor de la glicina en la fosforilación del receptor inducida por insulina en presencia del ácido oleico se utilizaron animales T anestesiados. A estos animales se les administró por inyección intravenosa 100 pmol/kg de estriquina un antagonista o inhibidor del receptor de glicina y diferentes concentraciones de glicina, seguidos por el ácido oleico y la insulina para la fosforilación del IR β .



La figura 13 muestra que la glicina aumenta la fosforilación del IR β inhibida por el ácido oleico. En presencia de estricnina la glicina pierde su efecto sobre la fosforilación del receptor inducida por insulina.

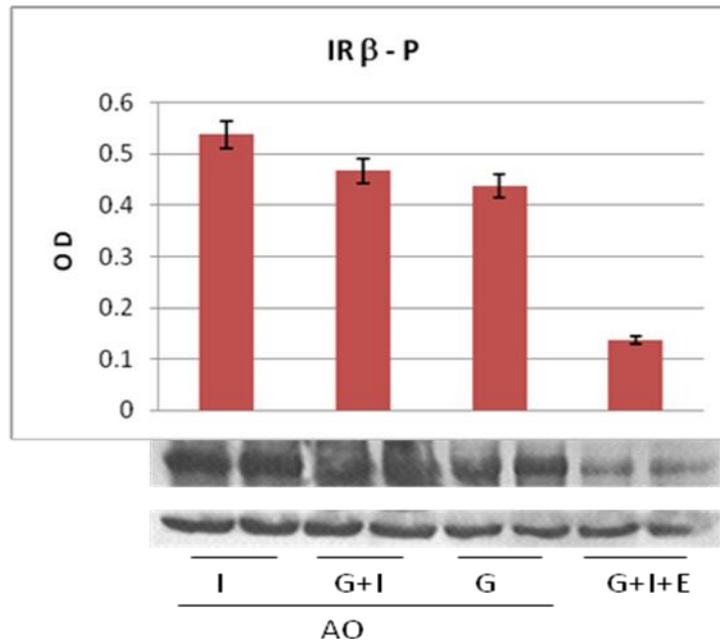


Figura 13. Efecto de la estricnina (E) sobre fosforilación del IR β inducida por insulina (I) en presencia de AO y glicina (G). La estricnina disminuye el efecto de la glicina.

10.11 Efecto de la glicina sobre la carbonilación de proteínas en el SM.

La carbonilación de las proteínas es considerada como un marcador de estrés oxidativo in vivo (86). Según la figura 14, en el hígado de los animales con síndrome metabólico existe un aumento en la concentración de las proteínas carboniladas y la glicina reduce este aumento hasta los niveles normales encontrados en los animales testigo. La glicina también reduce de una manera significativa los carbonilos en el homogenizado de hígado de los animales testigo.

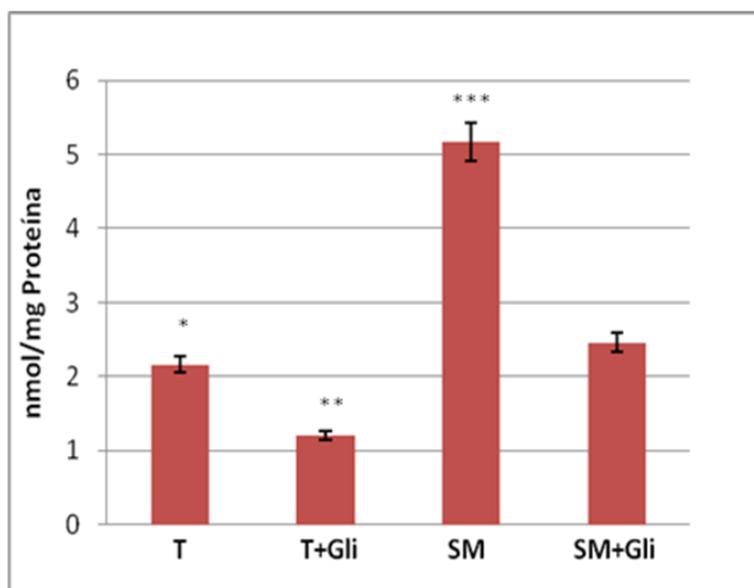


Figura 14. Efecto de la glicina sobre la carbonilación de las proteínas de homogenizado de hígado. Los valores corresponden a la media \pm DS ($n=6$ diferentes animales).

* $p<0.001$ T vs SM; ** $p<0.05$ T vs T+gli; *** $p<0.001$ SM vs SM + Gli.

10.12 Efecto de la glicina sobre la actividad de la catalasa y la SOD.

10.12.1. Catalasa.

La catalasa es una de las enzimas más importante entre las enzimas antioxidantes que cataliza la degradación del H_2O_2 a H_2O . El síndrome metabólico reduce moderadamente la actividad de la catalasa sin que alcance significancia estadística. El tratamiento de los animales con glicina aumenta la actividad de la catalasa de una manera estadísticamente significativa en ambos animales (Figura 17).

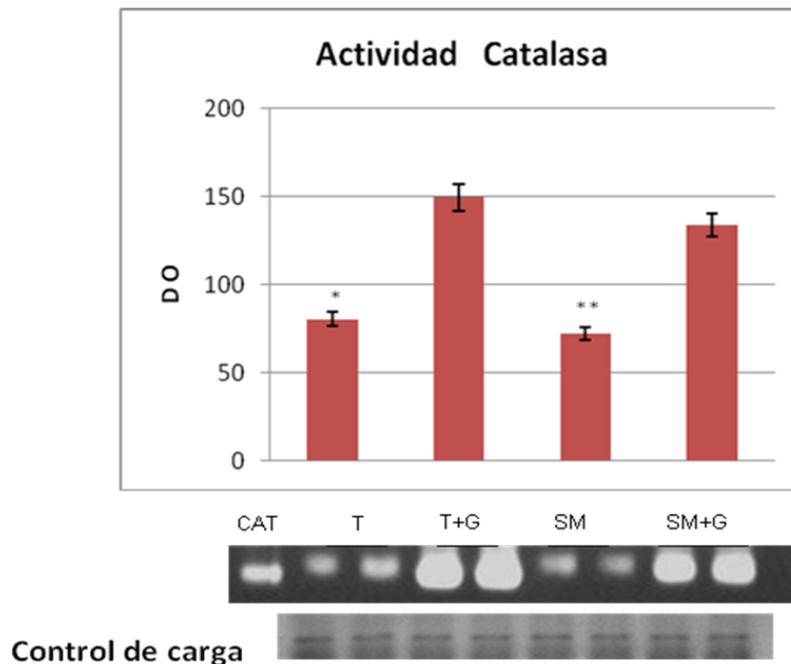


Figura 15. Efecto de la glicina sobre la actividad de la catalasa en hígado. La actividad de a proteína es el resultado de tensión $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ en presencia de H_2O_2 (Ver metodología). El gel se tiñe en verde oscuro excepto donde hay actividad de catalasa. Los resultados están expresados como la media \pm DS de la DO. * $p < 0.05$ T vs T+Gli; ** $p < 0.05$ SM vs SM+Gli-. El control de carga corresponde a un gel nativo revelado con commasie y muestra que no hubo diferencia en la carga de las muestras.

10.12.2 Superoxido dismutasa.

La figura 18 muestra que la actividad de la Mn-SOD está mejor detectada que la de la Cu/Zn que no se reveló de manera óptima en nuestras condiciones experimentales. En los animales con SM la actividad de MnSOD no difiere de la de los animales testigo. Sin embargo el tratamiento de los animales con glicina aumenta la actividad de la Mn-SOD en ambos grupos de animales de una manera similar.

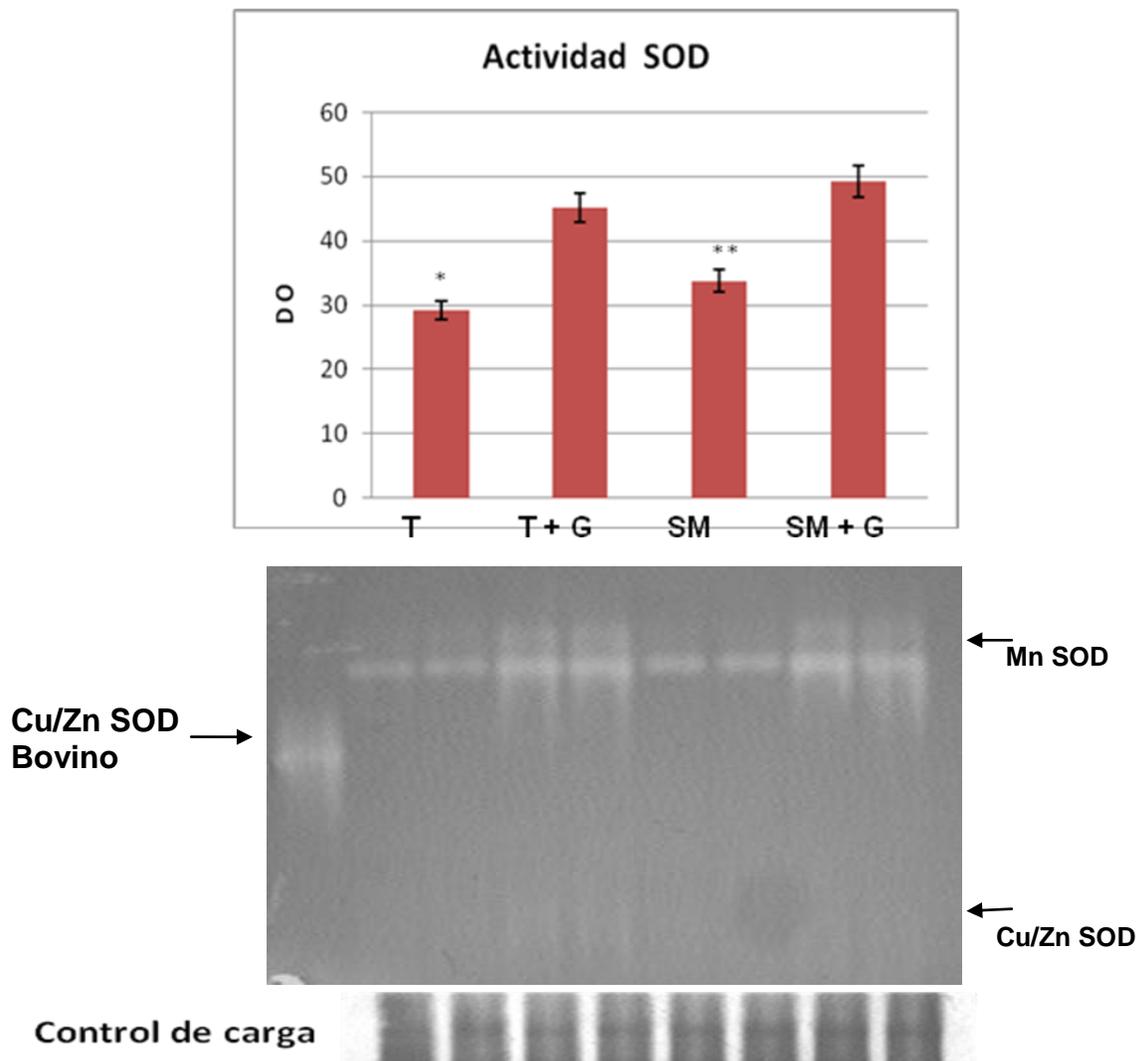


Figura 16. Efecto de la glicina sobre la actividad de la SOD en hígado. La actividad de la proteína es el resultado de tensión con Azul de nitrotetrazolium en presencia de anión superóxido generado con el TEMED (Ver metodología). Todo el gel se tiñe en azul excepto las zonas donde hay actividad de SOD. Los resultados están expresados como la media +/- DS de la DO. * $p < 0.05$ T vs T+Gli; ** $p < 0.05$ SM vs SM+Gli. El control de carga corresponde a un gel nativo revelado con commasie y muestra que no hubo diferencia en la carga de las muestras.



10.DISCUSIÓN

La resistencia a la insulina, definida como una acción disminuida de la insulina en sus órganos blanco, especialmente adiposos, musculares y hepáticos, junto con hiperinsulinemia compensadora, se ha ligado a la aparición de diversas enfermedades metabólicas, que son agrupadas bajo el nombre de SM.

Metabolismo de AGNE y RI: efecto de la glicina.

El modelo animal con dieta alta en hidratos de carbono en el agua de bebida, ha sido desarrollado en el laboratorio a fines de elucidar el mecanismo por el cual las alteraciones en el metabolismo de lípidos observadas contribuyen al desarrollo de la obesidad, la hipertensión y la resistencia a la insulina (6). El aumento en los triglicéridos observado en los animales con SM refleja una alta actividad lipogénica en el hígado debido al consumo de sacarosa. La hipertrigliceridemia resulta en una acumulación del exceso de energía como triglicéridos en el tejido adiposo sobre todo en la cavidad intraabdominal. La acumulación de la grasa predominantemente en la cavidad intraabdominal se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, con la hiperinsulinemia y con hipertensión (13-15) como se ha encontrado en nuestro modelo de SM.

El mecanismo por lo cual se acumula la grasa en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura (16). El mecanismo por el cual la glicina reduce la concentración de los triglicéridos y la acumulación de la grasa intra-abdominal no está establecido pero en un trabajo anterior (6) hemos observado que a nivel mitocondrial, el consumo de ~~oxígeno en presencia de sustratos de la β -oxidación aumenta en mitocondrias de~~



hígado de SM tratado con glicina. Este resultado sugiere un posible mecanismo que implica la degradación de los AGNE en el hígado.

Las concentraciones fisiológicas de los AGNE plasmáticos circulantes deben ser mantenidas dentro de un intervalo muy estrecho y un aumento anormal de ellos se asocia con diversas enfermedades entre ellas: obesidad, DM₂, aterosclerosis y otras. Los mecanismos por los cuales los AGNE conducen a éstas y otras enfermedades no están del todo establecidos, pero su contribución a la generación de la resistencia a la insulina parece ser uno de los más importantes.

La concentración alta de los AGNE en el plasma puede explicarse por una mayor actividad lipolítica del tejido adiposo debido a la resistencia a la insulina. En los procesos de la lipólisis, la lipasa hormonosensible (LHS), es la enzima limitante en la liberación de los AGNE a partir del tejido adiposo. Esta enzima se activa por fosforilación que es sensible a la insulina (17, 18). En el caso de una dieta alta en hidratos de carbono, las altas concentraciones de la insulina secretada en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre disminuyen las cantidades de AMPc. Esta situación conduce a la desfosforilación de la lipasa hormonosensible y por lo tanto, su inactivación, inhibiendo la liberación de los ácidos grasos para la oxidación. En el caso de resistencia a la insulina, la LHS es insensible a la inhibición por la insulina y por consecuencia se observa un aumento en la concentración de los AGNE circulantes. En nuestro modelo con SM y tratado con glicina hay una disminución de la resistencia a la insulina mostrada por el experimento de la pinza hiperinsulinemica-



euglucémica, lo que contribuye también a la disminución también de los AGNE circulantes y en el hígado.

La glicina aumenta la fosforilación del IR β en la tirosina y disminuye la de del IRS-1/2 en la serina.

La resistencia a la insulina resulta de la alteración en la interacción de la insulina con su receptor para llevar a cabo una serie de señalizaciones que implican la fosforilación de varias proteínas. La fosforilación del receptor de insulina en el hígado de ratas con SM inducida por insulina es reducida en comparación con el grupo testigo, indicando que existe cierta alteración en la funcionalidad del receptor de insulina desarrollada durante el periodo de tratamiento de estos animales SM, quizás por la presencia incrementada de AGNE.

En efecto, la administración del ácido oleico (AGNE de mayor contenido en hígado de ratas SM) a los animales, por tiempos cortos indujo la disminución en la fosforilación del residuo de tirosina de IR β y un aumento en la fosforilación de la serina del IRS1/2. Lo anterior es una de las características de la resistencia a la insulina inducida por AGNE o sus metabolitos (ceramidas, diacilglicerol, acil-CoA) los cuales activan la PKC θ cinasas serina/treonina, llevando a aumentar la fosforilación de serina/treonina sobre el receptor de insulina o sus sustratos y disminuyendo la fosforilación de residuos de tirosina, provocando así un desajuste en la acción de la insulina (20). En nuestro modelo de la rata con SM hay disminución en la fosforilación del IR- β en el residuo



tirosina. El tratamiento con glicina mostró aumento la fosforilación de IR- β y una disminución del IRS1/2 en los residuos de serina.

La administración del agente reductor N-acetil-citeina (NAC) a los animales revierte el efecto el ácido oleico en el animal entero, aumentando la fosforilación de IR β . Este experimento sugiere que el ácido oleico reduce la fosforilación de receptor de insulina IR- β generando especies reactivas de oxígeno (ERO) y estrés oxidativo lo que indica que los AGNE pueden desequilibrar la acción de la insulina mediante un incremento en los niveles de ERO. Por otro lado, la glicina aumenta la actividad de la catalasa y de la SOD disminuyendo la carbonilación de las proteínas. Estos resultados sugieren que la glicina aumenta la fosforilación del receptor IR β , del IRS en la tirosina y la fosforilación de la AKT por medio de su efecto sobre el estrés oxidativo.

Los estudios con antioxidantes como la vitamina E o NAC indican un efecto benéfico sobre la sensibilidad a la insulina, ofreciendo la posibilidad para nuevos tratamientos en casos de resistencia a la insulina (21).

La glicina afecta la fosforilación del IR β a través de su receptor

Los experimentos de la administración aguda de la glicina a 1 y 10 mM/kg de peso corporal muestran que esta última elimina el efecto inhibitorio de la fosforilación del receptor IR β por preadministración del ácido oleico. Este efecto de la glicina se inhibe por la administración a los animales de estriquina (100 pmol/kg de peso corporal). La estriquina es un inhibidor del receptor de glicina activador del canal de cloro, lo que



sugiere que la glicina también puede modificar la respuesta de la insulina a través de su receptor despolarizando la membrana y afectando la concentración del Ca^{++} intracelular ya que se sabe que el Ca^{++} regula la fosforilación de numerosas proteínas.

11.CONCLUSIONES

La glicina un amino ácido dispensable que reduce la RI en el modelo de SM normalizando la interacción de la insulina con su receptor que se refleja en un aumento en la fosforilación de IR- β , AKT y la disminución en la fosforilación en los residuos de serina del IRS-1/2 en el hígado de los animales con SM tratados con glicina. Esto puede ser a través de su efecto sobre las enzimas antioxidantes y por medio de su receptor (GlyR) activador del canal de cloro.

12.PERSPECTIVAS

Elucidar el mecanismo del receptor de la glicina sobre la cascada de señalización de la insulina en células aisladas de los animales con SM y con o sin tratamiento con glicina. En un sistema celular será posible ver el efecto de la sobre expresión del receptor de la glicina sobre los movimientos de Ca^{++} y sobre la despolarización de la membrana y como estos afectarían las señales de la insulina.



13.REFERENCIAS

1. Reaven GM. (1988) Syndrome X. *Blood Press. Suppl*; 4:13-16.
2. Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. (2006) The metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc*; 64:371-377.
3. El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. (2004) Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol*; 287:1387-1393.
4. Gannon Mary C; Jennifer A; Frank Q. (2002) The metabolic response to ingested glycine. *Am J Physiol*; 76:1302-1307.
5. Zhong. Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B and Lemasters J. (2007) L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Clin J Am Soc Nephrol*; 2:550-562.
6. Anwan AJ, Authory HB, Kumar S. (2001) The Metabolic Syndrome and Vascular Disease. Diabetes and Cardiovascular Disease. *Human Pres*; 47:3-22.
7. Reaven GM. (1988) *Bantin lecture: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes*; 37:1595-1607.
8. Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Adult Treatment Panel III. (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on. National Cholesterol Program. National Heart, Lung and Blood Institute. National Institute of Health. NIH Publication 2-5215.



-
9. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. (2003) NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes*; 52:1210-1214.
 10. American Association of Clinical Endocrinologist. Code for Dysmetabolic Syndrome X. disponible en www.aace.com.
 11. Daskalopoulous SS, Mikhailidis DP. (2005) Prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Eur Heart J*; 55:590-591.
 12. Janeckova R. (2001) The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res*; 50:443-459.
 13. Diaz MB, Eiden S, Daniel C, Steinbruck A, Schmidt I. (2006) Effects of periodic intake of a high-caloric diet on body mass and leptin resistance. *Physiol Behav*; 88:191-200.
 14. Pérez-Echarri N, Pérez- Matute P, Martinez JA, Marti A, Moreno- Aliaga MJ. (2008) Serum and gene expression levels of leptin and adiponectin in rats susceptible or resistant to diet induced obesity. *Am J Physiol*; 61:333-342.
 15. Pershadsingh HA. (2006) Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha/gamma agonist: in the treatment of type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Treat Endocrinol*; 5:89-99.
 16. Baños G, Pérez-Torres I, El Hafidi M, Guarner V. (2008) Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *New Research* edited by Elwood F. Benhagen. Edit. Nova Science Publisher, New York;102: 179-184.



-
17. Zachari T, Bloomgarden MD. (2002) Obesity, hipertensión and Insulin Resistanse. *Diabetes Care*; 25:2088-2097.
 18. Reilly MP, Rader DJ. (2003) The metabolic síndrome more tan the sumo of its parts? *Circulation*; 108:1546-1551.
 19. Martínez de Morentín BE, Rodríguez MC, Martínez JA. (2003) Síndrome Metabólico, Resistencia a la insulina y metabolismo. *Endocrinología y Nutrición*; 50:324.
 20. Shulman GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*; 106:171-176.
 21. Ferranmini E. (1997) Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*; 307:350- 357.
 22. Hunter SJ, Garvey WT. (2000) Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system. *Am J Med*; 105:331-345.
 23. Costa B, Cabré JJ, Martín F. (2003) Síndrome metabólico, Resistencia a la Insulina. *Aten Primaria*; 31:436-445.
 24. Kahn CR. (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*; 43:1066-1084.
 25. Giovannone B, Scadaferri ML, Federici M. (2000) Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab. Res Rev*; 16:434-441.



-
26. Araki E, Lipes MA, Patti ME. (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*; 372:186-190.
 27. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K. (1995) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*; 372:182-186.
 28. Pons S, Asano T, Glasheen E. (1997) The structure and function of p55PIK reveals a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*; 15:4453-4465.
 29. Kohjiro Ueki, David A. Fruman et al. (2002) Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-Kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol*; 22:965-977.
 30. Currie RA, Walker KS, Gray A. (1999) Role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *Biochem J*; 337:575-583.
 31. Van Dam EM, Govers R, James. (2002) Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Mol Endocrinol*; 254:6-12.
 32. Kopelman PG. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*; 404: 635-643.
 33. Nuñez CH, Gallagher D, Visser M, Pisunyer F. (1997) Consultation on Obesity. Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva: WHO; p.1-276.
 34. Després JP. (2003) Treatment of Obesity: Need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ*; 322: 716-720.



-
35. El Hafidi M, Raúl Valdez R, Baños G. (2000) Possible relationships between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypert*, 22: 99-108.
36. Mohan V. (2000) Insulin resistance, obesity and left ventricular mass in hipertensives. *J Assc Physicians*; 48:466-472.
37. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. (1998) Changes in insulin action, triglycerides and lip composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol*; 271:1319-1326.
38. Després JP. (1991) Obesity and lipid metabolism: Relevance of body fat distribution. *Curr Opin Lipidol* 2:5-15.
39. Assumpao CR, Brunini TM, Pereira NR, Godoy-Matos AF, Siqueira MA, Mann GE, Mendes-Ribeiro AC. (2009) Insulin resistance in obesity and metabolic syndrome: Is there a connection with platelet L-arginine transport? . *Ann Nutr Metab* 57:163-168.
40. Björntorp P. (1988) Abdominal fat and the development of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes and Metab Rev*; 4:615-622.
41. Rajala M, Scherer P. (2003) The Adipocyte - At the Crossroads of Energy Homeostasis. *Endocrinology*; 144:3765-3773.
42. Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphery SM. (1995) Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: Implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv. Enzyme regul*; 35:163-178.



-
43. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. (1998) Modulation of insulin activities by leptin. *Science*; 274:1185-1188.
44. Fukuchi S, Hamaguchi K, Seine M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H. (2004) Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med*; 229: 486-493.
45. Groop CL, Saloranta C. (1993) *The role of free fatty acid metabolism in pathogenesis of insulin resistance in obesity. J Clin Endocrinol Metab*; 72:96-107.
46. Yanik Rodríguez Enriquez. (2002) *Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina. Rev Cubana Aliment Nutr*; 16:54-62.
47. Shulman GI. (2000) Cellular mechanism of insulin resistance. *J Clin Invest*; 106:171-176.
48. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. (1998) Tumor necrosis factor- α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*; 43:1271-1278.
49. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev*; 23:599-622.
50. Halliwell B. (1999) Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu Rev Nutr*; 16:33-50.
51. Pryor, W.A. (1986). *Free radicals in Biology*. En Pryor, Edit. W.A. Academic press, New York; Vol 1 p. 1-277



-
52. Beckman KB, Ames BN. (1998) The free radicals theories of aging matures. *Physiol Rev*; 4:547-581.
53. Van Gaal LF, Mertens IL, Block CE. (2007) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*; 4:844:857.
54. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. (2005) The molecular basis for oxidative stress- induced insulin resistances. *Antioxid Redox Signal*; 7:1040-1052.
55. Bertelsen M, Änggard EE, Carrier MJ. (2001) Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetología*; 44:605-613.
56. Fernandez-Real JM, Ricart W. (2003) Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrinol Rev*; 24:278-301.
57. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*; 114:1752-1761.
58. Lum H, Roebuck KA. (2003) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*; 280:719-722.
59. Andrew W, Agnes F, Stephen J. (1987) Activation of protein kinase C: a physiological reaction?. *Trends in Biochemical Sciences*; 2:53-54.
60. Yang S, Zhu H, Li Y. (2000) Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*; 378: 259-268.
61. Lindsay DG, Astley SB. (2002) European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. *Mol Aspects Med*; 23:1-38.
-



-
62. Amábile C, Fuentes A. (1999) Antioxidantes: fundamentos de uso en la medicina. *Cor Intermédica*, S.A. de C.V. pp 1-66.
63. Sweazea KL, Lekic M, Walker BR. (2010) Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutr Metab*; 4:7-14.
64. Wang Q, Sun Y, Ma A, Li Y, Han X, Liang H Int J Vitam. (2010) Effects of vitamin e on plasma lipid status and oxidative stress and metabolic syndrome *Nutr Res*; 80:178-187.
65. Sánchez R, Mendoza N. (2003) Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. México, Facultad de estudios superiores Zaragoza. P. 59-84.
66. Ford ES, Mokdad AH, Gales WH. (2003) The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*; 52:2346-2352.
67. Hansel B, Giral P, Nobecourt E. (2004) Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*; 89:4963-4971.
68. Govindarajan G, Hayden M. (2006) Metabolic desarrengments in the insulin resistant heart. *J Cardiometab Synd*; 1:102-106.
69. Bunker VW. (2007) Free radicals, antioxidants and ageing. *Med Lab Sci*; 49: 299-312.



-
70. Fleister A. (1998) *Biochemistry of the Amino Acids*: Bastan, MA. TuNs University Press. Vol 4. 34-47.
71. Wheeler MD, Ikejema K, Enomoto N. (1999) Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci*; 56:843-856.
72. Carvajal-Sandoval G, Medina-Santillan R, Juarez E, et al. (1999) Effect of glycine on hemoglobin glycation in diabetic patients. *Proc West Pharmacol Soc*; 42: 31-32.
73. Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L. (1995) Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes: identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem*; 269:2607-2612.
74. Byyny RL, LoVerde M, Lloyd S, Mitchell W, Draznin B. (1992) Calcium and insulin resistance in elderly patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*; 5:459-464.
75. Albiñana E, Sacristán S, Martín Del Río R, Solís JM, Hernández-Guijo JM. (2007) Modulation of Calcium Channels by Taurine Acting Via a Metabotropic-like Glycine Receptor. *Instituto Teófilo Hernando*; 13:1388-1395.
76. Giambelluca MS, Gende OA. (2009) Effect of glycine on the release of reactive oxygen species in human neutrophils. *Int Immunopharmacol*; 9:32-7.
77. Draznin B, Sussman KE, Eckel RH, Kao M, Yost T, Sherman NA. (1998) Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J Clin Invest*; 82:1848-1852.



-
78. Reaven G, H. (2001) Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertension*; 4: 610-614.
79. El Hafidi M., Baños G. (1997) In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*; 30:624-628.
80. Souza CG, Böhmer AE, Müller AP, Oses JP. (2010) Effects of a highly sucrose diet on lipid, nitric oxide, and antioxidant activity. *Appl Physiol Nutr Metab*; 35:591-597.
81. El Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. (2001) Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal $\Delta 9$ and $\Delta 5$ -desaturase activities. *J Nutr Biochem*; 12: 396-403.
82. Pérez I, El Hafidi M, Sanchez C, Baños G. (1999) Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo- γ -linolenic and linoleic acids. *Med Sc Res*; 27:847-849.
83. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. (2000) Possible relationships between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin. Exper Hypertens*; 22:99-108.
84. Folch L, Lee M, Sloane-Stanley CH (1957) A simple method for the isolation and a purification of total lipid from animal tissues. *J Biol.Chem*; 226:497-509.



85. Lowry OH, Roebrough NJ, Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagen. *J Biol Chem*; 193:265-275.

86. Nystrom, T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and oxidative stress. *EMBO J*; 24:1311-1317.