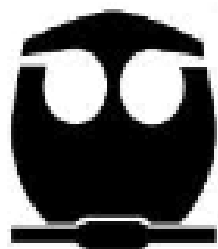




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA GLICINA SOBRE EL METABOLISMO DEL
GLUTATIÓN EN UN MODELO DE OBESIDAD, INDUCIDA
POR ALTO CONSUMO EN SACAROSA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
JOSÉ ANTONIO PINEDA FLORES



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:	JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRF
VOCAL:	Profesor:	LUCIA CORNEJO BARRERA
SECRETARIO:	Profesor:	MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
1er. SUPLENTE:	Profesor:	JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
2º SUPLENTE:	Profesor:	LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"
DEPTO: BIOMEDICINA CARDIOVASCULAR
Teléfono: 55 73 29 11 Ext. 1237

ASESOR DEL TEMA

SUSTENTANTE

MOHAMMED EL-HAFIDI BENTLAKDER

JOSÉ ANTONIO PINEDA FLORES



AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT)) por el apoyo otorgado a través del proyecto CLAVE: PICDS08-67.

Al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto N°: 106845.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la máxima casa de estudios la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO y especialmente a la Facultad de Química por darme la oportunidad de crecer en sus instalaciones, por creer en mí y por abrirme la puerta al éxito. A sus profesores por brindar su apoyo y sus conocimientos.

Al Dr. Mohammed El-Hafidi (“el doc” con cariño) por compartir su experiencia y sus conocimientos, por dedicar parte de su vida en mi trabajo de tesis, por su apoyo en el congreso y exposiciones. Estoy muy agradecido con usted, gracias.

A mi jurado asignado el Dr. Fernando Montiel, a la maestra Lucia Cornejo, el Dr. José Pedraza y Dra. Laura Carmona.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por permitirme llevar a cabo el trabajo de investigación.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a DIOS.

A mi hija Yarezi, quien es el motor para seguir adelante y por alegrar mi vida con su gracia.

A mi esposa Melina que ha sido compañera y amiga en los últimos años; soy afortunado por contar siempre con su amor. Te amo.

A mi madre Lourdes por su gran apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños. Tú has hecho posible que termine una carrera Universitaria. Gracias. Siempre te llevo en mi corazón.

A mis hermanos Jesús ("Jisus xxx") y Estefany ("flais") por su compañía, apoyo incondicional y todos los sueños y juegos que hemos compartido. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo.

A mi padre Antonio que ha sido ejemplo de valor y trabajo.

A mis abuelitas, Emma y Yola y abuelitos Leno y Abraham por todas esas palabras de aliento, consejos y sabiduría que me han compartido.

A todas y todos mi tíos, Elvia, Juana, Fidel, Polo, Bike, Araceli y por los que me faltaron por su compañía y apoyo.

Agradezco también a todos mis primos por aquellos momentos en los que compartimos nuestros sueños e ilusiones, por todas las horas que dedicábamos a jugar.

A todos mi amigos y compañeros que compartimos tantas horas de clase, de risa y de momentos inolvidables. Quiero agradecer especialmente a mis amigas Monse y Miriam por todo su apoyo y amistad dentro y fuera de un laboratorio; a el "Isrra" y Annita por el último esfuerzo en sacar adelante la carrera.

A Vianey Nava por su apoyo, compañía y consejos.

A todas las personas que han estado conmigo y que han hecho en mi vida lo mejor de su esfuerzo.



ÍNDICE

	Página
1. Resumen	9
2. Introducción	13
3. Antecedentes	13
3.1 Síndrome Metabólico	13
3.1.1. Definición según la OMS.....	13
3.1.2. Síndrome Metabólico y Resistencia a la Insulina (RI).....	14
3.2 Obesidad	14
3.2.1. Definición de obesidad y sobrepeso según la OMS.....	15
3.2.2. Factores que causan obesidad.....	15
3.2.3. Consecuencias comunes del sobrepeso y la obesidad para la salud.....	16
3.3. Estrés oxidativo (EO)	16
3.3.1. Obesidad y estrés oxidativo.....	17
3.3.2. Ácidos grasos libres y estrés oxidativo.....	19
3.3.3. Estrés Oxidativo y SM.....	19
3.4 Algunas fuentes de radicales libres	20
3.4.1. Las principales fuentes endógenas.....	21
3.4.1.1. Oxidación de ácidos grasos.....	21
3.4.1.2. Cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	21
3.4.1.3. Múltiples vías.....	21
3.5 Diferentes sistemas antioxidantes	21
3.5.1. Sistema antioxidante enzimático.....	22
3.5.2. Sistema antioxidante no enzimático.....	23
3.6. Glutati6n	23
3.6.1. Síntesis, transporte y degradaci6n de GSH.....	27



3.6.2. Diferentes funciones biológicas de GSH	27
3.6.2.1. Antioxidante y regulador del balance redox	27
3.6.2.2. El glutatión como cofactor de la glutatión peroxidasa (GPX).....	28
3.6.2.3. Otras funciones biológicas de GSH.....	29
3.6.3. Alteración del metabolismo de GSH.....	29
3.6.3.1. Obesidad.....	29
3.6.3.2. Hipertensión	30
3.6.3.3. Diabetes.....	30
3.7. Consecuencias de la oxidación proteínica	30
3.8. Glicina	32
3.8.1. Algunas funciones generales de la glicina	32
3.8.2. Glicina y EO.....	33
3.8.3. Efecto de la Gly sobre su receptor.....	33
4. Hipótesis.....	35
5. Objetivos generales.....	35
6. Objetivos particulares.....	35
7 Justificación	36
8. Diseño experimental	37
8.1. Tratamiento de los animales con sacarosa.....	37
8.2. Cuantificación de proteína.....	38
8.3. Determinación de GPX y catalasa por Western Blot.....	39
8.4. Carbonilación de proteínas.....	40
8.5. Extracción y cuantificación de GSH, Cys, γ -GC y GSSG por HPLC.....	41
8.6. Tratamiento de animales para evaluar la participación del receptor de la Glicina.....	42
9. Resultados	44



9.1. Características generales de los animales	44
9.2. Efecto de la Gly en la biosíntesis de GSH en los diferentes órganos	45
9.2.1. Hígado	45
9.2.2. Riñón	47
9.2.3. Corazón	48
9.2.4. Músculo	49
9.3. Efecto de la glicina sobre la carbonilación de las proteínas como marcadores de estrés oxidativo en el SM	50
9.4. Evaluación por Western Blot de la participación de las enzimas antioxidantes, GPX y catalasa	41
9.4.1. Hígado	52
9.4.2. Riñón	52
9.4.3. Corazón	53
9.4.4. Musculo	53
9.5. Participación del receptor de la Gly en la biosíntesis de GSH en el hígado	54
9.6. Efecto de la estricnina sobre la oxidación de proteínas	57
10. Discusión	66
11. Conclusión	67
12. Referencias	68



1. RESUMEN

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio entre el consumo y el gasto energético. La obesidad central es un componente de gran importancia en el Síndrome Metabólico (SM) que es una patología heterogénea cuyas manifestaciones clínicas incluyen: la resistencia a la insulina (como común denominador), la dislipidemia, la obesidad intra-abdominal y la hipertensión arterial. Estos factores aumentan el riesgo de padecer Diabetes Mellitus tipo II (DM₂).

En un modelo experimental de obesidad central inducida por el alto consumo de sacarosa, hay un aumento de concentración de ácidos grasos libres (AGL) en el torrente sanguíneo. Estos AGL implican el desarrollo de estrés oxidativo en el modelo, éste definido como un desequilibrio persistente entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) o de nitrógeno (ERN's) y la defensa antioxidante tiene un papel fundamental en el SM.

El estrés oxidativo en nuestro modelo esta asociado con un aumento en la carbonilación de proteínas y una disminución en la concentración de glutatión reducido (GSH).

Por otra parte la glicina, un aminoácido dispensable que es requerido por un número de vías metabólicas entre ellas la síntesis de proteínas estructurales tales como la colágena y la elastina; ha mostrado efecto benéfico sobre la presión arterial, sobre la acumulación de grasa intra-abdominal y la resistencia a la insulina inducida por alto consumo de sacarosa.

La glicina participa en la biosíntesis del GSH catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa. El GSH participa de manera muy relevante en la defensa antioxidante. Una mala nutrición disminuye los niveles de glicina circulante, lo cual conlleva a la deficiencia de GSH y a un incremento de estrés oxidativo.

Los resultados muestran que la glicina suplementada a la dieta de los animales con síndrome metabólico reduce la carbonilación de proteínas en



homogenizado de diferentes órganos tales como el hígado, riñón, corazón y en músculo esquelético de los animales con obesidad central.

Análogamente la glicina aumenta la concentración del GSH, en los diferentes órganos ya mencionados.

El análisis por Western Blot de los tejidos tales como: hígado, riñón, corazón y músculo, no muestra diferencia en la expresión de la GPX1 entre animales controles y con SM; tratados con y sin Gly; sin embargo, en el músculo la expresión de la catalasa disminuye en los animales controles y SM tratados con Gly, con respecto a los animales solo con SM y controles.

La administración de estriknina, un antagonista del receptor de glicina, en el agua de bebida, revierte el efecto de la glicina sobre la biosíntesis de GSH y aumenta la carbonilación de proteínas en el hígado. Lo que sugiere que la glicina actúa por medio de su receptor sensible a estriknina.



2. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial y que puede ser definida como un incremento en la acumulación de grasa en el cuerpo. Ésta es considerada como un problema de salud pública mundial y un importante factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes y problemas oncológicos.

La obesidad es uno de los factores mas importantes que se incluye en el Síndrome Metabólico (SM). Esta condición fue descrita por Reaven en 1988, quien lo nombró “Síndrome X”, y que consiste principalmente en una suma heterogénea de factores de riesgo cuyas manifestaciones clínicas incluyen la resistencia a la insulina, dislipidemia, la obesidad intra-abdominal y la hipertensión arterial, estos factores aumentan el riesgo de padecer Diabetes Mellitus Tipo II (DM II), y múltiples enfermedades cardiovasculares.

El incremento exponencial de la prevalencia del SM se debe a los cambios en la dieta y el estilo de vida actual, y que influyen directamente sobre los diversos genes reguladores de los mecanismos metabólicos.

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 alimenticios sin efectos secundarios que puedan mejorar la calidad de vida de la población con SM.

Por otro lado la glicina (Gly) es requerida por un número de vías metabólicas, entre ellas la síntesis de proteínas estructurales, tales como la elastina y la colágena. El consumo de una dieta rica en Gly ha mostrado efecto benéfico en la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en animales con diabetes experimental inducida por estreptozotocina, así como en pacientes con DM II (1).

En un modelo experimental de SM desarrollado en nuestro laboratorio, la Gly ha mostrado efecto benéfico sobre la presión arterial y sobre la acumulación de grasa intra-abdominal inducida por alto consumo en sacarosa (2).



La Gly participa en la biosíntesis de glutatión (GSH), que es catalizado por la acción consecutiva de dos enzimas, la γ -glutamilcisteína y la GSH sintetasa (3). El GSH participa de manera relevante en la defensa antioxidante, lo cual conlleva a la neutralización de la sobre producción de radicales libres generados por un alto consumo de sacarosa; el cual se ve reflejado en la disminución de carbonilación de proteínas que sirve como indicador de estrés oxidativo (34-37).

Una mala nutrición conlleva en una disminución de los niveles de Gly circulante con una subsiguiente deficiencia de GSH y un incremento del estrés oxidativo (1).



3. ANTECEDENTES

3.1 Síndrome metabólico (SM).

Esta condición fue inicialmente descrita por kylin y más tarde, en 1988 por Gerald Reaven, quien lo nombró como “Síndrome X” (4), en el cual la resistencia a la insulina fue considerada como la principal anomalía, por tal motivo el síndrome es también llamado “Síndrome de resistencia a la insulina”, el cual incluye obesidad (5).

Actualmente el SM es definido como una suma heterogénea de factores de riesgo incluyendo la resistencia a la insulina, la dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia), la obesidad intra-abdominal y la hipertensión arterial; en donde estos factores aumentan el riesgo de padecer DM2 y diversas enfermedades cardiovasculares(5).

3.1.1 Definición según la OMS.

En 1999 la OMS publicó los criterios para padecer el SM, de acuerdo a la tabla mostrada se considera diagnóstico si existe al menos uno de los principales variables y al menos dos de otras variables.

TABLA 1. Parámetros utilizados por la OMS para determinar SM.

Variable Principal	Definición
Alteración de la regulación de la glucosa	Glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dL y/o 2 hrs. post-carga ≥ 140 mg/dL
Resistencia a la insulina	Captación de glucosa por debajo del percentil 25 de la pinza euglicémica-hiperinsulnémica
Otras variables	
Hipertensión arterial	TA ≥ 140 -190 mmHg
Dislipidemia	Triglicéridos ≥ 150 mg/dL y/o colesterol HDL < 40
Obesidad	Índice de cintura/cadera $> 0.9/0.85$ en H/M y/o IMC > 30
Microalbúmina	Excreción de la primera orina ≥ 20 mg/g



3.1.2 Síndrome metabólico y resistencia a la insulina (RI).

La RI es definida como la disminución de la capacidad de los tejidos de responder a la insulina con el fin de mantenerla homeostasis de la glucosa. La RI aparece en la mayoría de los sujetos con SM y para muchos autores la resistencia a la insulina es el común denominador y el nexo del resto de las manifestaciones (6).

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 (7).

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 una enfermedad crónica como la diabetes (6 y 8).

3.2 Obesidad.

Obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial que se desarrolla a partir de la interacción social, fisiológica, metabólica, celular y factores moleculares. Estas son las condiciones bajo las cuales el tejido adiposo incrementa y resulta en acumulación excesiva de grasa (9).



3.2.1 Definición de obesidad y sobrepeso según la OMS

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos, éste se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2).

La definición de la OMS es la siguiente:

- Un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso
- Un IMC o superior a 30 determina obesidad

El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población mundial, puesto que es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades (10).

3.2.2 Factores que causan obesidad.

Fundamentalmente, la obesidad es el resultado del consumo excesivo de energía, comparado con la energía gastada.

Cambios en el estilo de vida contribuyen en un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes, acompañado de un descenso en la actividad física han resultado en un incremento en número de sujetos obesos (10).



3.2.3 Consecuencias comunes del sobrepeso y la obesidad para la salud.

La obesidad considerada como problema de salud pública, especialmente en ciudades industrializadas, incrementa la mortalidad y la prevalencia de enfermedades. Cuando el IMC es elevado, es un factor importante de riesgo de enfermedades no transmisibles, tales como:

- Enfermedades cardiovasculares (cardiopatía y accidente cerebro-cardiovascular)
- Diabetes
- Trastornos en el aparato locomotor (osteoartritis)

3.3 Estrés oxidativo (EO).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's), están presentes en todo tipo de ser vivo, son altamente reactivas, de corta vida, derivan del metabolismo de oxígeno, se producen en todos los sistemas biológicos y reaccionan con cualquier tipo de molécula. Estas especies, la cual incluyen el radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); junto con especies reactivas de nitrógeno (ERNs), tales como óxido nítrico (NO) y el radical peroxinitrito ($\text{ONOO}\bullet$), son derivados de oxígeno que juegan un papel importante en la biología vascular. Por otra parte, bajos niveles de ERO's son indispensables en varios procesos bioquímicos, los cuales incluyen, mensaje celular, diferenciación celular, apoptosis, inmunidad y defensa contra microorganismos (21, 22).

En organismos sanos, los oxidantes son balanceados por agentes reductores (antioxidantes), pero cuando ERO's exceden la capacidad fisiológica antioxidante del sistema, hay un aumento que produce daños en diversas biomoléculas, lo que causa el estrés oxidativo, definido como un desequilibrio persistente entre la producción y la neutralización de ERO's o ERN's (22).



3.3.1 Obesidad y estrés oxidativo.

La formación de ERO's, ocurre bajo condiciones fisiológicas y en muchas enfermedades; y disminuyen la defensa antioxidante; causan daño directo o indirecto a lípidos, proteínas y ADN, y a diferentes órganos; así es conocido que el estrés oxidativo (EO) está involucrado en procesos patológicos tales como obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc.

El incremento en EO esta asociado con la obesidad probablemente debido a la presencia de un exceso de tejido adiposo. Los adipocitos y preadipocitos han sido identificados como una fuente de citocinas pro-inflamatorias, tales como, TNF- α , IL-1 y IL-6; así la obesidad esta considerada un estado crónico. Estas citocinas son potentes estimuladores de la producción de ERO's y ERN's, por macrófagos y monocitos, sin embargo, una elevación en la concentración de citocinas puede producir un aumento en EO (9 y 14).

Se ha reportado que el EO en la obesidad está asociado con una producción irregular de adipocinas, las cuales contribuyen a el desarrollo del SM (11).

Los adipocitos son una de la células que se alteran por la sobrealimentación y el sedentarismo y agravadas por todos los factores relacionados desde el punto de vista epidemiológico, con el incremento del riesgo metabólico y cardiovascular (12).

Tal es el caso de la leptina; que es una hormona llamada "hormona de la obesidad", ya que sus niveles se correlacionan estrechamente con la cantidad de grasa del individuo y con la circunferencia abdominal. Su receptor LRb es el único que se asocia con respuestas intracelulares. LRb activa a JAK2 (Janus Kinasa 2), la cual induce la autofosforilación del complejo LRb-JAK2 iniciando una cascada de fosforilación que involucra diferentes sistemas enzimáticos (13) tal como la activación de la NADPH oxidasa enzima clave en la producción de anión superóxido (11). Como todas la tirosinas cinasas, JAK2 fosforila también proteínas que contienen dominios SH2, en este caso las proteínas ERK (extracelular-signal regulated kinase 9), las proteínas STAT3 (signal transducers



and activators of transcription 3) y las proteínas IRS (insulina receptor substrate), grupo de moléculas que también es regulado por insulina (13).

El $TNF\alpha$ (tumor necrosis factor α), es una citocina liberada por macrófagos y linfocitos, ésta se encuentra en aumento en la obesidad y es asociada con resistencia a la insulina, por otra parte, sus niveles disminuyen con la pérdida de peso. Se cree que produce resistencia a la insulina al inducir un defecto en la capacidad de fosforilación de residuos de tirosina en el sustrato del receptor de la insulina (IRS-1), necesaria para la progresión de la señal intracelular de la hormona, y al disminuir la expresión génica de los transportadores de glucosa sensibles a insulina GLUT-4 (14). Por otra parte la expansión del tejido adiposo y la resistencia a la insulina en el tejido adiposo, estimula la lipasa sensible a hormonas y favorece la lipólisis de los triglicéridos almacenados en dicho tejido, lo que aumenta la liberación de AGL a partir del adipocito y por lo tanto una mayor producción en el índice de estrés oxidativo (60).

La adiponectina tiene acciones metabólicas muy notorias en los tejidos, que consisten en incremento de la oxidación de ácidos grasos y reducción de la gluconeogénesis. Sus efectos están mediados por el incremento de la actividad de la PKA (proteína kinasa dependiente de AMP cíclico) (15). Altos niveles de esta adipocinas están relacionados con la pérdida de peso, la adiponectina mejora la sensibilidad de la insulina, disminuye el flujo de AGL e incrementa su oxidación; su isoforma globular inhibe la producción de ERO's (15 y 60).

La activación de la PKA induce la expresión de $PPAR\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), así como de las enzimas de la cascada de la oxidación de ácidos grasos y de otras proteínas involucradas en la captación de glucosa, lo cual explica el incremento de la actividad de la insulina inducido por esta hormona. Por el mismo mecanismo se produce inhibición de las enzimas de la vía de la gluconeogénesis (16).

Sus niveles en plasma son inversamente proporcionales a la masa de tejido adiposo y están reducidos en los pacientes con SM que presentan RI y DMII (16).



Investigaciones han mostrado que una dieta rica en grasa e hidratos de carbono induce un incremento significativo en EO e inflamación en personas con obesidad central (17).

3.3.2 Ácidos grasos libres y estrés oxidativo.

La obesidad es asociada con niveles altos de ácidos grasos libres (AGL) en el plasma, los cuales inducen resistencia a la insulina (18).

Este aumento de AGL provoca un aumento en la acetil-coenzima A, que entra al ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico) para convertirse en citrato y conduce a una sobreproducción de NADH. El exceso de NADH mitocondrial aumenta la producción de radicales libres y produce estrés oxidativo (11 y 18).

En sujetos sanos, la administración de AGL (como Intralipid) aumenta el EO, evaluado por un aumento en el malondialdehído y una disminución en el plasma de la proporción del cociente GSH/GSSG (11).

Varios estudios *in vitro* han descrito la activación del factor nuclear NF-kB por los AGL, una consecuencia probable de que los AGL pueden incrementar la formación de ERO's y reducir la concentración del GSH (19). Este efecto podría también estar vinculado con la activación de la PKC θ mediada por los AGL, que tiene la habilidad única entre las diferentes isoformas de la PKC de activar el factor de NF-kB (20).

3.3.3 Estrés Oxidativo y SM

Muchos estudios apoyan que el EO juega un papel muy importante en las manifestaciones de SM, incluyendo aterosclerosis, hipertensión y Diabetes Mellitus tipo II (21). El estrés oxidativo es también asociado con adipocitos y resistencia a la insulina; lo que sugiere que el estrés oxidativo puede ser un claro evento en la patología de éstas enfermedades crónicas.

Está bien establecido que el balance antioxidante/oxidante juega un papel importante en la patogénesis de hipertensión (2). La disfunción endotelial



mediada en parte por EO es una causa de hipertensión. Las ERO's reaccionan con el óxido nítrico (ON) e induce su inactivación y su disponibilidad para llevar a cabo su efecto vasorelajante (21 y 22).

Varios estudios relacionan el SM con el estrés oxidativo en sujetos con hipertensión. El SM puede ser un "común denominador" que enlaza la enfermedad de arteria coronaria, hipertensión y EO (2 y 5).

Un exceso de grasa causa daño celular debido al efecto de la presión, el daño celular causa una alta producción de citocinas tales como TNF- α , la cual genera ERO's en los tejidos, aumentando la peroxidación de lípidos (9).

Otro posible mecanismo de formación de ERO's durante el sobrepeso u obesidad es el consumo de una dieta alta en grasa que puede alterar el metabolismo del oxígeno. Los depósitos de grasa son vulnerables a sufrir reacciones de oxidación. Si la producción de ERO's excede la capacidad antioxidante de la célula, el EO resulta en la peroxidación lipídica que contribuye al desarrollo de arteriosclerosis (9 y 14).

3.4 Algunas fuentes de radicales libres.

Cualquier organismo celular aerobio produce ERO's los cuales funcionan como intermediarios y/o productos de infinidad de reacciones oxidativas en la célula (11). El oxígeno es requerido para la generación de todos los ERO's y sus derivados. Existen fuentes exógenas y endógenas de radicales libres; las ERO's pueden producirse a través de la exposición a oxidantes ambientales, agentes tóxicos y metales pesados que pueden perturbar el equilibrio entre las reacciones de reducción celular y las de oxidación (23).



3.4.1 Las principales fuentes endógenas:

3.4.1.1. *Oxidación de ácidos grasos:* La oxidación de ácidos grasos por la mitocondria y por peroxisomas, es capaz de producir radicales libres. Por tanto, ERO's, los cuales pueden producir alteraciones en la fosforilación oxidativa y en el DNA mitocondrial, causando anomalías estructurales y agotamiento de ATP (9).

3.4.1.2. *Cadena de transporte electrónico mitocondrial:* La mitocondria provee la energía requerida para cualquier proceso celular, que permite llevar a cabo funciones fisiológicas. El sistema de transporte electrónico mitocondrial es una fuente de anión superóxido. El NADH, NADPH y FADH₂, producidos por metabolismo aerobio de proteínas, ácidos grasos y glucosa, participan en la producción de radicales libres en la mitocondria, la cual da como resultado el estrés oxidativo. Bajo condiciones fisiológicas normales, aproximadamente del 1-3% de O₂ consumido por la mitocondria, es convertido en anión superóxido y otros ERO's. Cuando la exposición de radicales libres es prolongada, puede resultar en el daño a biomoléculas tales como mutación del ADN, lípidos y proteínas contribuyendo a daño a tejidos y desarrollo de enfermedades (24 y 25).

3.4.1.3. *Múltiples vías:* Oxidación de NADPH por la NADPH oxidasa, oxidación de xantina (hipoxantina) por xantina oxidasa, oxidación de monoaminas (dopamina, epinefrina), acción de citocromo P-450 encargado del metabolismo de xenobióticos (9).

3.5 Diferentes sistemas antioxidantes.

Las reacciones químicas de los radicales libres ocurren constantemente en las células en el organismo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres. El



problema para la salud se produce cuando el organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres por un largo tiempo, producidos por diversos factores ambientales y por la alimentación (26 y 27).

Según Halliwell y Gutteridge, un antioxidante es cualquier sustancia que a bajas concentraciones, en relación con el sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la acción de dicho sustrato. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, su variabilidad operativa y su versatilidad para poder combinarse con una variedad de ERO's (28y 29).

En condiciones fisiológicas la regulación de la producción de especies reactivas está regulada por la defensa antioxidante, ya sea enzimática o no enzimáticamente.

3.5.1 Sistema antioxidante enzimático: es el principal sistema de defensa contra radicales libres y principalmente está compuesto por la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa, y la enzima glutatión reductasa (GR) de igual importancia para regenerar el GSH a partir del glutatión oxidado(23). La eficacia de esta triada enzimática reside en la triple acción defensiva al disminuir la producción de ERO's e impedir la interacción de éstas entre sí, para dar lugar a especies más estables de menor reactividad y evitar la oxidación de macromoléculas (27 y 28).

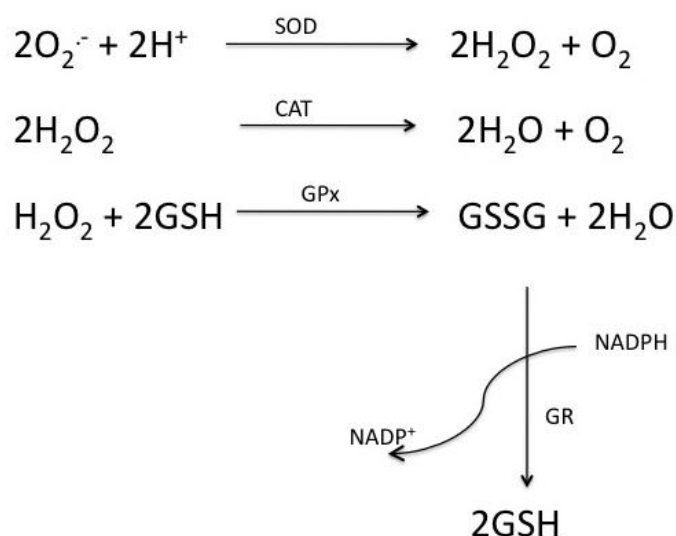


Figura 1. Generación de ERO's y el sistema de defensa antioxidante.



3.5.2 Sistema antioxidante no enzimático: este sistema incluye moléculas con características hidrofílicas y lipofílicas. Dentro del grupo de las hidrofílicas tenemos la vitamina C (ácido ascórbico), flavonoides, melanoidinas y GSH; cuyas funciones principales son proteger proteínas y ácidos nucleicos de la oxidación causada por radicales libres. En el grupo de moléculas lipofílicas se encuentran principalmente la vitamina E (α -tocoferol), los polioles y los β -carotenos que protegen la membrana lipídica y las proteínas membranales de la oxidación (30 y 31).

En modelos de SM inducido por un alto consumo de hidratos de carbono y grasas, se ha mostrado que existe una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes como la CAT y SOD (31 y 32). El consumo de hidratos de carbono induce una disminución en el contenido de moléculas antioxidantes tales como el GSH y la vitamina E (33).

3.6 GLUTATIÓN

El glutatión reducido (GSH), tripéptido soluble en agua, compuesto de L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, es el tiol más abundante de bajo peso molecular en células animales (0.5-10mM). Abunda principalmente en el citosol (85-90%), aun más que el resto de algunos organelos, incluyendo la mitocondria, matriz nuclear y peroxisomas (34).

El glutatión es sintetizado secuencialmente a partir de glutamato, cisteína y glicina, y es catalizado por dos enzimas citosolicas: γ -glutamilcisteínasintetasa (γ -GCS) y GSH sintetasa (34 y 35).

El grupo tiol del residuo de cisteína es un potente agente reductor, lo que hace que sea un importante antioxidante. El GSH es rápidamente oxidado (ya que el grupo tiol es altamente reactivo) no enzimáticamente a glutatión disulfuro (GSSG) por sustancias electrofílicas (radicales libres y ERO's ó ERN's).

El cociente GSH/GSSG es el par redox más importante que determina la capacidad antioxidante de la célula, pero este valor puede ser afectado por otros pares redox, incluyendo NADPH/NADP⁺ y tioredoxina_{red}/tioredoxina_{ox}. El cociente GSH/GSSG, el cual es a menudo usado como un indicador del estatus redox es >10, bajo condiciones fisiológicas normales.

La deficiencia de GSH contribuye a estrés oxidativo, el cual juega un importante papel en la vejez y la patogénesis de muchas enfermedades (Alzheimer, Parkinson, fibrosis quística, cáncer, enfermedades del hígado, ataques al corazón, diabetes, etc.) (36).

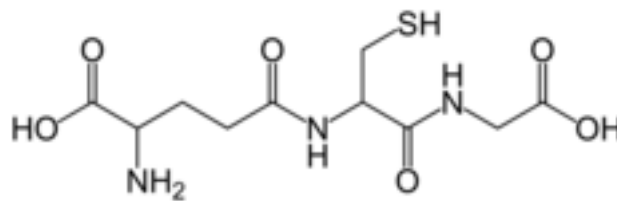


Figura 2. Molécula de glutati6n.

3.6.1 Síntesis, transporte y degradaci6n de GSH.

Biosíntesis: El GSH es sintetizado *de novo* a partir de los aminoácidos siguientes: glicina, cisteína y ácido glutámico; éste es producido intracelularmente en todos los tipos de 6rganos y células, siendo el hígado y el pulm6n como el primero y el segundo mayor productor y exportador respectivamente. La síntesis de GSH requiere de la acci6n consecutiva de dos enzimas, γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) y GSH sintetasa (34 y 35).

La γ -GCS es un heterodímero compuesto de una subunidad pesada que es catalíticamente activa (γ -GCS-HS con 73 kDa) y una subunidad ligera que es la regulatoria (γ -GCS-LS con 31kDa). La subunidad pesada contiene todos los



sitios de unión del sustrato, mientras que la subunidad ligera modula la afinidad de la subunidad pesada por sustratos e inhibidores.

La GSH sintetasa es un homodímero (52 kDa/subunidad) y es una enzima alostérica con sitios muy afines para el sustrato γ -glutamil.

Intracelularmente el GSH puede existir como un monómero en la forma reducida, o como un dímero disulfuro debido a la oxidación (GSSG). El GSSG esta presente en menos del 1% del contenido total de glutatión intracelular. Adicionalmente, una fracción de GSH intracelular puede ser encontrada como algunas formas de tioésteres(37).

El 85 a 90% de GSH es libremente distribuido en el citosol, aunque éste puede ser compartimentalizado en diferentes organelos incluyendo mitocondria, peroxisomas, matriz nuclear y retículo endoplásmico (35).

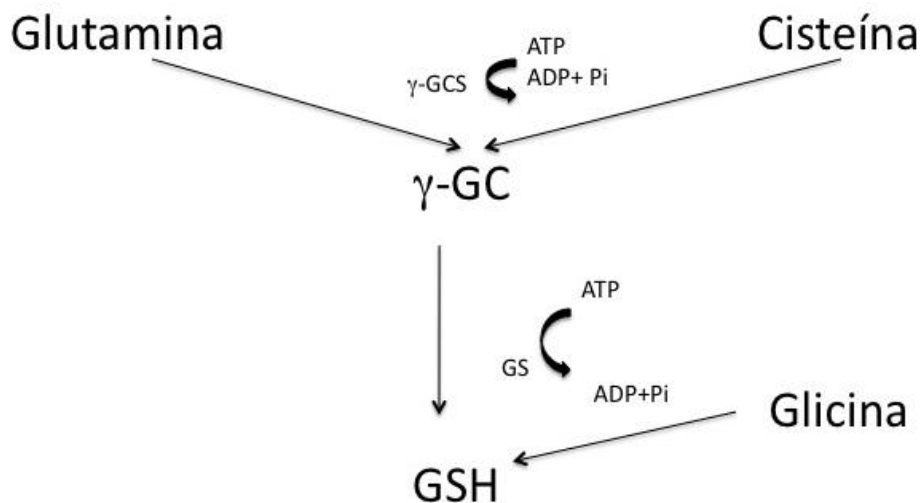


Figura 3. Síntesis de glutatión.

La concentración intracelular de GSH refleja un balance dinámico entre la síntesis, velocidad de consumo y su transporte. La síntesis de GSH inicia por la formación de γ -glutamilcisteína (γ -GC), un dipéptido a partir de la combinación



de glutamato y cisteína catalizado por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS), Después de esta etapa inicial, la glicina es adicionada a γ -GC por la actividad de GSH sintetasa (GS) (36).

Ambos pasos enzimáticos consumen una molécula de ATP por ciclo catalítico. La presencia del C terminal de la glicina protege al GSH contra la ruptura por γ -glutamilciclotransferasas intracelulares.

La disponibilidad de cisteína es un factor limitante para la formación de GSH. Otra ruta alternativa de síntesis de GSH es vía de la reserva que envuelve su degradación, o directo de reciclaje después de su oxidación.

Degradación del GSH: La degradación del GSH ocurre extracelularmente por la actividad de la γ -glutamiltranspeptidasa (γ -GT). La γ -GT es expresada principalmente en la superficie cóncava de la célula, e inicia el catabolismo de no solo el GSH sino también de glutatión S-conjugado y de complejos de glutatión.

La función de la γ -GT es remover la cadena de γ -glutamil del GSH y de los componentes de GSH-conjugados llevándolo a otros aceptores como aminoácidos u otros dipéptidos, produciendo cisteinilglicina o conjugados de cisteinilglicina. En otra etapa, estos productos son hidrolizados por ectoproteínas dipeptidasas (DTP); las cuales remueven el enlace peptídico entre la glicina y la cisteína.

Cisteína junto con la γ -glutamil-aminoácidos formados a partir de la acción de la γ -GT, son llevados por la actividad de transportadores específicos. La γ -glutamil-derivados son futuros sustratos para la γ -glutamil ciclo transferasa que forma 5-oxoprolina y el correspondiente aminoácido. 5-oxoprolina es finalmente convertido a glutamato por la actividad de la 5-oxoprolinasa (34, 35, 36 y 37).



Transporte del GSH

El GSH puede ser transportado de dos formas diferentes:

1. Dos familias de transportador de GSH han estado implicadas en el flujo a través de la membrana.

El primer grupo incluye la familia de proteínas resistentes a múltiples drogas (MRP) las cuales actúan como co-transportadores del GSH con la extrusión de un anión orgánico (OA^-). Este transporte requiere del uso de energía. Las proteínas MRP han sido propuestas para transportar GSSG y GSH-conjugados (36).

El segundo grupo incluye el polipéptido transportador de anión orgánico (OATP) el cual actúa como un GSH/ OA^- intercambiador. Este intercambio es simulado por la presencia de concentraciones altas de OA^- y es manejado por el gradiente electroquímico del cruce de GSH a través de la membrana plasmática (38).

El GSH transportado a través de la membrana mitocondrial: La carga natural de GSH (negativo en pH fisiológico) sugiere que GSH no puede difundirse pasivamente dentro de la mitocondria, porque la matriz mitocondrial tiene un potencial relativamente negativo al del citoplasma. Algunos investigadores sugieren que la mitocondria importa GSH del citosol por el transportador dicarboxilato (DIC) y el transportador 2-oxoglutarato (OGC) el cual actúa como un intercambiador de Pi^{2+} (fósforo inorgánico) y 2-oxoglutarato ($2-OG^{2-}$) para GSH citosólico. Este transportador disipa el gradiente de concentración entre el citoplasma y el citosola $\sim 5mM$ (38 y 39).

3.6.2 Diferentes funciones biológicas de GSH.

El GSH reactivo por el grupo tiol participa en una amplia variedad de procesos metabólicos, incluyendo oxidación-reducción (redox).

3.6.2.1 Antioxidante y regulador del balance redox

El GSH es un fuerte agente reductor que contribuye a la vía metabólica antioxidante, por su acción de donador de un protón, o como un co-factor de nucleofílicos conjugados. GSH constituye el mayor defensor antioxidante

dentro de la célula, su agotamiento es una causa o pre-requisito para la generación de ERO's (34-37).

El GSH puede combinarse con un amplio rango de especies reactivas como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y oxígeno singlete (1O_2) directamente, por donación de electrones y llegar a ser oxidado a radical tiol ($GS\bullet$). Es importante mencionar que la habilidad reactiva del GSH, es asociada con la formación de $GS\bullet$ el cual es eficientemente removido por el ascorbato, puede llevar reacciones oxidantes y daño oxidativo (37 y 40).

En general, las especies reactivas son reducidas o inactivadas por la generación de enlaces disulfuro entre dos moléculas de glutatión formando GSSG (40).

3.6.2.2 El GSH como cofactor de la glutatión peroxidasa (GPX).

La GPX en conjunto con la catalasa y superóxido dismutasa (SOD), tienen como función proteger la célula del ataque de ERO's. GPX detoxifica peróxidos de hidrógeno con GSH, actuando como un donador de electrones en la reacción de reducción, generando GSSG como producto final. La reducción de GSSG es catalizada por GSH reductasa (GR) en un proceso que requiere NADPH. GR es un miembro de la familia de flavoproteína-disulfuro-oxidoreductasa y existe en forma de dímero (37).

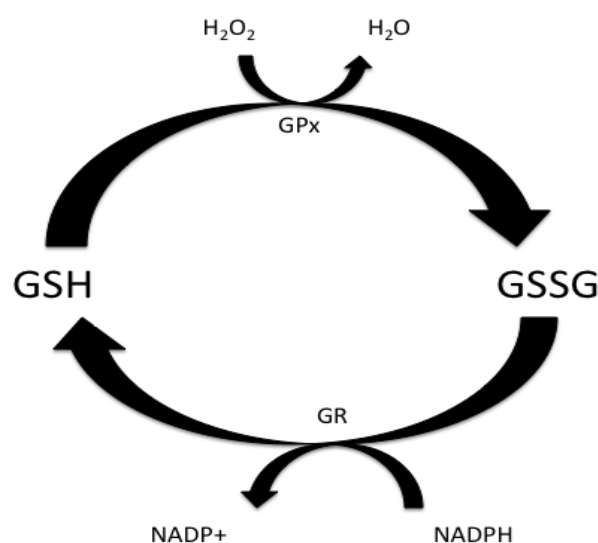


Figura 4. Ciclo redox (GSH/GSSG).



El Cambio del balance intracelular de GSH/GSSG es un indicador del estatus redox de la célula. Bajo condiciones de estrés oxidativo, GSH es consumido para neutralizar los radicales libres, por lo tanto los niveles de GSSG aumentan. El cociente de GSH/GSSG y la reducción del potencial son dos vías que expresan el medio ambiente redox de la célula. En condiciones fisiológicas normales el GSH/GSSG debe estar en proporciones de 90% para GSH y 10% para GSSG, este cociente es quien determina la capacidad antioxidante de las células (34, 35 y 56).

3.6.2.3 Otras funciones biológicas de GSH

Es impresionante la actividad de GSH, ya que participa en muchas otras vías metabólicas importantes. Puede actuar como sustrato de la formaldehído deshidrogenasa para formar S-formil-glutación. Este es fisiológicamente un importante proceso de desintoxicación ya que el formaldehído es un potente producto cancerígeno (36, 37).

Puede actuar como co-factor de trans-hidrogenasas, en la reducción de centros de ADN, proteínas y otras biomoléculas (36).

3.6.3 Alteración del metabolismo de GSH y SM.

Alteraciones de la homeostasis y metabolismo de GSH ha sido ampliamente reportado, para correlacionarlo con varias enfermedades metabólicas humanas. Muchos estudios asocian las enfermedades con el agotamiento del GSH (37). El agotamiento puede ser inducido por tres diferentes mecanismos:

- 1) Oxidación por especies reactivas.
- 2) Conjugación a proteínas y electrófilos.
- 3) Destrucción a través de la membrana.

3.6.3.1 Obesidad

La obesidad afecta muchos órganos en el cuerpo, tales como hígado, riñón y corazón. Arteriosclerosis y complicaciones cardiacas son los problemas más



comunes en individuos obesos. Evidencias sugieren que una fuente de estrés oxidativo es la obesidad, por lo tanto incrementan los niveles de lípidos en los tejidos, aunado a esto, el daño oxidativo deprime la defensa antioxidante, enzimas como CAT, GTS y GPX; así como la defensa antioxidante no enzimática, principalmente el GSH. Un sin número de investigaciones relacionan la caída de GSH con la obesidad (41).

3.6.3.2 Hipertensión

Se ha mostrado que la hipertensión esta asociada con disturbios en el metabolismo del GSH. Células mononucleares tomadas de sujetos hipertensos, muestran significativamente mas bajo la cantidad de GSH y mas alto el valor de GSSG en comparación a un grupo control (42). El metabolismo de GSH en eritrocitos es esencial no solo para el balance redox, sino también la biodisponibilidad de ON en eritrocitos, desde ahí, puede contribuir al desarrollo de hipertensión (43).

3.6.3.3 Diabetes

Las enfermedades metabólicas aparecen cuando una enzima critica es deshabilitada o si un mecanismo control es afectado por una vía metabólica. La elevada producción de radicales libres y estrés oxidativo juega un papel central importante en la patogénesis y sus complicaciones, incluyendo obesidad, la cual es el factor critico en las enfermedades metabólicas (44).

3.7 Consecuencias de la oxidación proteínica.

El metabolismo celular aeróbico, al utilizar el oxígeno como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria causa inevitablemente la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) que oxidan cualquier macromolécula a su alcance (DNA, lípidos y proteínas). Las proteínas sufren varios tipos de oxidación; una de ellas es la formación de grupos carbonilos, que ha sido



utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos (45).

Cuando el H_2O_2 se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre aceptando un electrón no apareado se produce el radical hidroxilo ($\bullet OH$) por medio de la reacción de Fenton.

Dentro de las principales modificaciones que las proteínas sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilos, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intra proteínicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis (45).

La carbonilación ocurre principalmente en los residuos de prolina, arginina y lisina, pues son los residuos más susceptibles a la oxidación catalizada por metales (OCM). Los productos de la carbonilación de estos residuos son el semialdehído glutámico (producto de la oxidación de la arginina y prolina) y semialdehídoaminoadípico (producto de la oxidación de la lisina) (46).

La oxidación por generación de grupos carbonilo se lleva a cabo químicamente por cuatro rutas principales:

1- Oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con ERO's

2- La segunda forma involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado de α -cetoácido.

3 y 4- Implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilos reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con ERO's (46).

La oxidación de proteínas provocadas por daño directo en lisinas, argininas, prolinas o treoninas, puede generar derivados carbonilo como aldehídos y cetonas. La carbonilación de proteínas es una oxidación severa, por lo que indican un estrés oxidativo más severo y representan un marcador de oxidación proteínica estable.



Los grupos carbonilos han sido detectados y cuantificados por conjugación con 2,4-dinitrofenilhidrazina, la medición de las entidades de carbonilo se realiza espectrofotométricamente y por ensayos inmunohistoquímicos (46 y 47).

3.8 GLICINA

La glicina, un aminoácido sencillo, no esencial, y no presenta actividad óptica, ha mostrado efecto benéfico cuando es suplementado en la dieta. En un modelo experimental de obesidad e hipertensión inducidas por una dieta no balanceada, la glicina reduce la presión arterial, los triglicéridos y la grasa intra-abdominal (1).

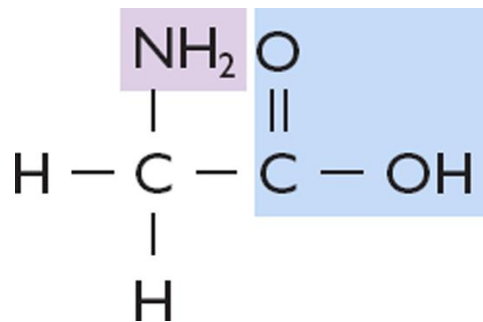


Figura 5. Estructura de la glicina.

3.8.1 Algunas funciones generales 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 de su receptor, activador del canal de cloro (Gly-R) (48). Este receptor fue detectado en células endoteliales y en células de Kupffer (48).



3.8.2 Glicina y estrés oxidativo.

El efecto protector de la glicina ha sido observado en condiciones experimentales de hipoxia/reoxigenación, que está asociado con incremento en la generación de radicales libres en túbulos proximales de riñón, hepatocitos y cardiomiocitos (49). Se ha reportado que la glicina protege las células endoteliales contra el daño de peróxido de hidrógeno y contra ciclosporina A que induce la formación de radicales libres en riñón (50).

Así la glicina puede inducir diferentes efectos para prevenir la formación de ERO's; minimizando el deterioro de la actividad de las enzimas antioxidantes y por inhibición de la activación de factor nuclear κ B (51). Un aumento de ERO's causa una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico y causa disfunción endotelial, la cual induce deterioro en la vasorelajación. El tratamiento de ratas hipertensas (alimentadas con sacarosa) con glicina incrementa los nitritos y nitratos (metabolitos de óxido nítrico) en el plasma (2). La glicina puede modular el EO por su participación en la síntesis de GSH que ha sido descrita con detalle en la biosíntesis de GSH. La disponibilidad de la glicina ha estado descrita como una limitante para la síntesis de GSH (2 y 51).

3.8.3 Efecto de la glicina sobre su receptor.

El receptor de la glicina (Gly-R) fue purificado por primera vez por Pfeiffer y Betz usando su alta afinidad por la estircnina (52).

El receptor de la glicina está compuesto de tres subunidades proteínicas distintas: una subunidad α de 48 kDa; una subunidad β de 58 kDa y una subunidad citoplasmática de anclaje (gefirina) de 93 kDa. El receptor de la glicina está compuesto de cinco subunidades, formadas a partir de subunidades α o la combinación de subunidades α y β que constituyen un complejo pentamérico transmembranal. La región citoplásmica de la subunidad β se encuentra formando un complejo con la proteína de anclaje, gefirina (53).



Las propiedades funcionales del Gly-R están relacionadas con la composición de las subunidades del pentámero completo.

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 de cloro (Cl^-) conduciendo a la hiperpolarización de la membrana. Con estímulos externos inducidos por endotoxinas, se produce un influjo dependiente del 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. De esta manera se bloquea la producción de señales intracelulares y la producción de citocinas que son dependientes del incremento de calcio intracelular, lo que previene la cascada de producción de citocinas inflamatorias (53, 54 y 55).

La estricnina un alcaloide, es un antagonista del Gly-R; a bajas concentraciones de este (500nM-1 μ M) revierte completamente el efecto de la glicina (52, 53 y 57).



4. HIPÓTESIS

La glicina suplementada a la dieta de un modelo de SM reduce el estrés oxidativo aumentando la biosíntesis de GSH en diferentes tejidos tales como: hígado, riñón, corazón y músculo esquelético

5. OBJETIVOS GENERALES

1. Investigar el mecanismo por lo cual la glicina reduce el estrés oxidativo, inducido por una dieta alta en sacarosa en la rata.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Evaluar el efecto de la glicina sobre la carbonilación de proteínas, como índice de estrés oxidativo.
- ii. Investigar el efecto de la glicina sobre el glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y sus precursores γ -glutamilcisteína (γ -GC) y Cisteína (Cys), en diferentes tejidos, tales como hígado, riñón, corazón y músculo.
- iii. Evaluar el efecto de la glicina sobre la expresión de las enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa.
- iv. Evaluar la participación del receptor de la glicina en el mecanismo por el cual la glicina reduce el grado de estrés oxidativo, utilizando estricnina como inhibidor.



7. JUSTIFICACION

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

En el SM, el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el mecanismo por el cual la acumulación de grasa intra-abdominal esta asociada con la resistencia a la insulina y con la hipertensión factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Investigar el mecanismo por lo cual la glicina reduce estos factores de riesgo es de gran interés científico, para entender la importancia del estrés oxidativo en el SM. Además el estudio de la biosíntesis de GSH en un modelo de SM no se ha estudiado a detalle, por lo cual este trabajo pretende esclarecer el mecanismo por el cual la administración de glicina participa en la biosíntesis de GSH.



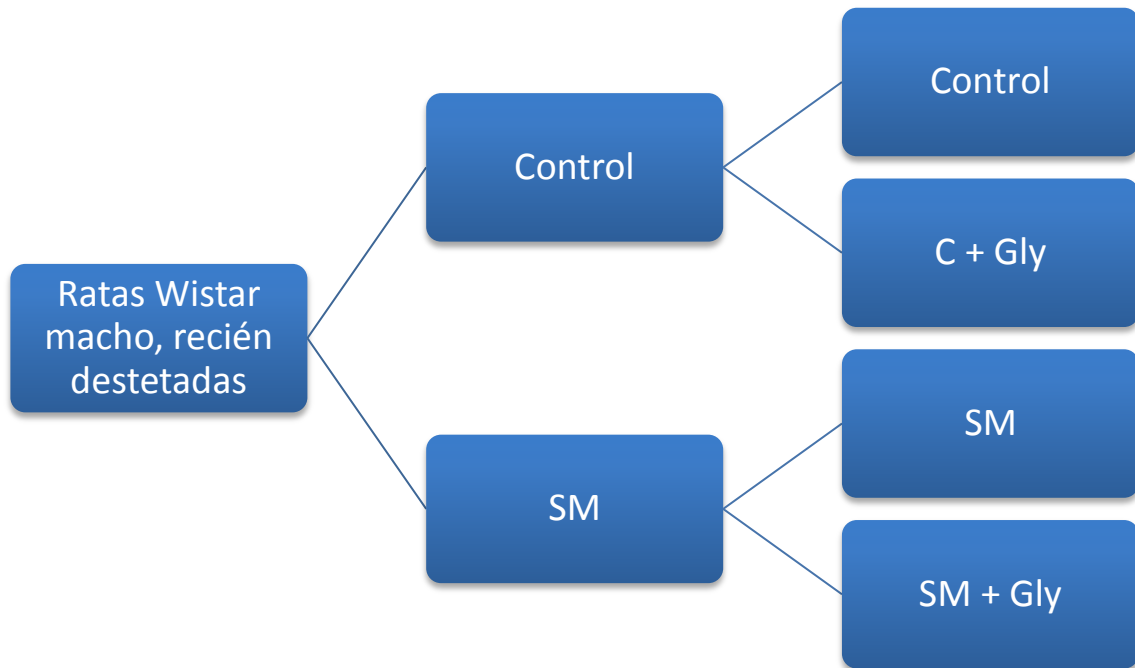
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.

8.1 Tratamiento de los animales con sacarosa.

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

- a) Control: ratas que recibieron solo agua de beber. Después de 20 semanas se subdividió el grupo en dos, es decir; seis ratas cada uno. Un grupo seguirá con agua y el otro grupo se le dará agua + Gly al 1 % por cuatro semanas.
- b) SM: ratas que consumieron sacarosa al 30 % en agua de bebida. Después de 20 semanas se subdivide el grupo en dos, es decir; seis ratas cada uno. Un grupo continuará con sacarosa al 30 % y el otro con sacarosa + Gly (30 % y 1 % respectivamente), por cuatro semanas más.

Al finalizar el tratamiento se pusieron las ratas en ayuno durante una noche. Al siguiente día se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/kg_{pc}), se sacrificaron, y se extrajo el hígado, riñón, corazón y músculo esquelético, posteriormente se homogenizaron los tejidos utilizando un homogenizador manual de 15 mL a 4° utilizando un buffer de lisis (50 mM NaF, 1% TritónX100 y 100 mM Tris-HCl, 5 mM pirofosfato de sodio, 10 mM EDTA, a pH 7.2) con 1 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de fluoruro-fenilmetilsulfonilo (PMSF), 2 µg/mL de aprotinina y 2 µg/mL de leupeptina como anti-proteasa). Después se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, para eliminar el tejido conjuntivo y residuos celulares, ya obtenido el homogenizado se cuantificó proteína utilizando el método de Lowry.



Tratamiento de los animales con sacarosa

8.2 Cuantificación de proteína

La proteína se cuantificó según el método de Lowry modificado.

Se prepararon tres soluciones:

- 1º. sol A (Na_2CO_2 al 1 %),
- 2º. sol B (tartrato de sodio y potasio al 1 %)
- 3º. sol C (CuSO_4 al 5 %).

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

Paralelamente se preparó 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 colocó: 0, 10, 20, 40, 60 μL de la solución de albumina sérica de bovino (ASB)



en tubos de ensayo y se llevó a 100 μ L de solución salina y se adicionó 1 mL de la mezcla hecha con las soluciones A (10 ml), B (100 μ L) y C (100 μ L). Después de 10 minutos de incubación se adicionó 100 μ L de Folin 1N y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

La absorbencia se determinó 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 Lambert y Beer, lo que permite determinar la concentración de proteína presente en las muestras (56).

8.3 Determinacion de GPX-1 y Catalasa por Western Blot

Se tomó el volumen necesario para 100 μ g en proteína de cada muestra, se suspendió en 25 μ L de buffer de carga (20 % de glicerol; 4 % de SDS; de una solución de Tris-HCl 125 mM, pH 6.8; 10 % de 2-mercaptoetanol y 0.004 % de azul de bromofenol) y se ajustó el volumen a 50 μ L con una solución de Leamli (Tris 40 mM, SDS 1 %, β -mercapto etanol al 1 %).

Se depositó 100 μ g de muestra en un gel de poliacrilamida al 13 % el resolvidor y al 6 % el concentrador, se colocó en una cámara de minigel Bio-Rad (10x10 cm x 0.75 mm). Las muestras se corrieron durante 100 minutos a 120 V. La transferencia de las proteínas se realizó en membrana de PVDF (Polivinildenedifloride, tamaño de poro 0.45 μ m, Millipore Corporation) a 350 mA durante 20 minutos en una cámara de transferencia en semi seco (Bio-Rad, Trans Blot SD).

La detección de proteínas no específicas se redujo bloqueando 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 incubaron con anticuerpos monoclonales contra GPX-1 y Catalasa (hecho en conejo marca abcam, proteína purificada) a una dilución de 1:1000 en TBS con 3 % de leche sin grasa en polvo, durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al final de incubación las membranas se lavaron 3 veces con TBS-



Tween (0.1 %) durante 5 minutos cada una y dos veces con TBS por 10 minutos cada uno.

Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:1000 en TBS-Tween (0.1 %) a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se lavó 5 veces, dos veces con TBS-Tween (0.1 %) y tres con solo TBS; las proteínas se revelaron por medio de quimioluminiscencia con un kit de luminol y H_2O_2 (Millipore). Las membranas incubadas con el reactivo quimioluminescente estuvieron expuestas a placas radiográficas (BioMax, Kodar) durante 5 minutos. Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría en un analizador de imagen UVP (Inc, Upland, CA, USA).

Para el control de carga, las mismas membranas se incubaron en una solución de 40 mM de SDS y 250 mM de glicina, pH:2, durante 30 minutos para eliminar los reactivos y los anticuerpos utilizados anteriormente. Posteriormente se incubó en una solución TBS-Tween (0.1 %) que contiene leche descremada al 5 % durante 1 hora, después se trató las membranas de la misma manera como se explicó anteriormente pero en este caso se utilizó anticuerpo anti- α -tubulina como control de carga.

8.4 Carbonilación de proteínas.

En un tubo Eppendorf se colocó 1 mg de proteína de las muestras de hígado de los diferentes tratamientos y se suspendió en una solución salina hasta completar un volumen de 400 μ L, se adicionó 100 μ L de sulfato de estreptomicina al 10 %, se agitó con vortex y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min para la precipitación del ADN. Después se recuperó el sobrenadante y se agregó 500 μ L de una solución de 20 % TCA (ácido tricloroacético), se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante. El pelet se re suspendió en 500 μ L del reactivo 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) al 10 mM en una solución de HCL (1 N), se incubó durante una hora a temperatura ambiente agitando con vortex cada 15



minutos. Posteriormente se agregó 500 μL de una solución de TCA al 20 % y se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó y el pelet se lavó 3 veces durante 10 minutos con 1 mL de etanol/acetato etílico (1:1, v:v), para eliminar el exceso de 2,4-DNPH, la suspensión se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 minutos para descartar el sobrenadante. El pelet obtenido se re disolvió en 1 mL de urea 6 M por 15 minutos a 37°C, para desnaturalizar la proteína. El material insoluble se eliminará por centrifugación 12 000 rpm durante 3 minutos y finalmente se leyó en el espectrofotómetro (Beckman DU 640) a 360-390 nm. Para calcular el contenido de proteínas carboniladas, se utilizó el coeficiente de absorción molar de 22,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, finalmente se hizo el cálculo y se reportó como concentración de los carbonilos por mg de proteína.

Cabe mencionar que para cada muestra se tuvo un blanco, que se trato de la misma manera sin adicionar el reactivo 2,4-DNPH , para realizar el cálculo, se sacó la diferencia entre el blanco y el reactivo (57).

8.5 Extracción y cuantificación de GSH, Cys, γ -GC y GSSG por HPLC.

Se depositó 10 mg de proteína en un tubo Eppendorff de 2 mL se adicionó 500 μL de solución de extracción que contiene 5 mM DETAPAc, 200 mM ácido metansulfónico, se agitó con un vortex durante 30 segundos y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente se centrifugó a 10 000rpm durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de Nylon con tamaño de poro de 0.45 μm , posteriormente se inyectó al equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) equipado con una columna de fase reversa Waters Spherisorb ODS-2 5u 250 mm x 4.6 mm, acoplado a un detector electroquímico equipado con un electrodo de carbono con referencia a un electrodo de hidrogeno a 520 mV y un detector a 215 nm en luz visible. La elución se efectuó por medio de una bomba cuaternaria con una fase móvil de 0.05 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.05 mM de ácido 1-Octanelsulfónico ajustado el pH



a 3.0 con ácido fosfórico, con flujo constante de 1 mL/min.

Para cuantificar el GSH, γ -GC y Cys en las muestras se hizo una curva estándar utilizando GSH en soluciones de concentraciones conocidas. En esta curva se interpolan las áreas obtenidas para las muestras problema.

Posteriormente se hizo el cálculo en base a la curva obtenida por el estándar y se reportó la concentración como nmol/ mg de proteína.

De la misma forma se cuantificó GSSG con un detector con longitud de onda de 515 nm en luz visible se hace una curva estándar utilizando GSSG en soluciones de concentraciones conocidas. En esta curva se interpolan las áreas obtenidas para las muestras problema y posteriormente se hace el cálculo en base a la curva obtenida por el estándar.

8.6 Tratamiento de animales para evaluar la participación del receptor de la glicina.

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

- a) Control: ratas control, solo se les dio agua de beber. Después de 20 semanas se subdividió el grupo en dos, es decir; seis ratas cada uno. Un grupo se le dio agua y Gly al 1 %. Otro grupo se les dio agua+Gly (1 %) + estircnina (0.5 μ M), por cuatro semanas más.
- b) SM: ratas que consumieron sacarosa al 30 % en agua de bebida. Después de 20 semanas se subdividió el grupo en dos, es decir; seis ratas cada uno. Un grupo con sacarosa al 30 %+ Gly (1 %) y el otro grupo con sacarosa + Gly + estircnina (30 %, 1 % y 0.5 μ M respectivamente), por cuatro semanas más.

Al finalizar del tratamiento se pusieron las ratas en ayuno durante una noche.

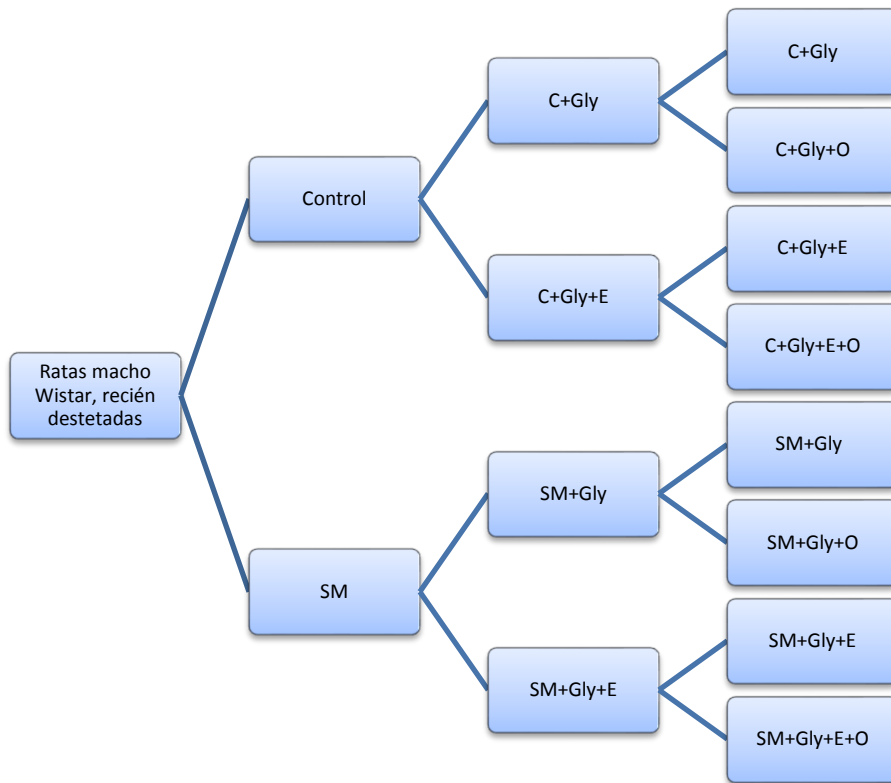
Al siguiente día se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/Kg_{pc}), el grupo Control + Gly se dividió en dos y uno de ellos se inyectó un volumen de 1 mL/kg_{pc}, por la vena porta inferior, un complejo ácido oleico(AO)/albúmina (4 mM/1 mM), después de 30 minutos se extrajo el hígado, riñón, corazón y



músculo esquelético. El otro grupo sirvió como referencia para evaluar el efecto del ácido oleico.

De la misma forma los grupos con SM se dividieron de la siguiente forma: SM+Gly y SM+Gly+Oleico; y SM+Gly+Estreznina y SM+Gly+Estricnina+Oleico. Posteriormente se homogeizaron los tejidos utilizando un homogenizador y una solución de lisis antes descrito. Después se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C, para eliminar el tejido conjuntivo y residuos celulares, ya obtenido el homogeneizado se cuantificó proteína utilizando el método de Lowry.

Se cuantificó GSH, Cys, γ -GCS y GSSG por HPLC y se determinó el grado de oxidación de proteínas por carbonilación.



Tratamiento de los animales para evaluar la participación del receptor.



9 RESULTADOS.

9.1 Características generales de los animales.

El tratamiento de las ratas Wistar con sacarosa durante 24 semanas indujo una mayor acumulación de grasa intra-abdominal 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 control. 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 intra-abdominal. La glicina no tuvo efecto en los animales control.

TABLA 1. Características generales en el modelo.

	C	SM	C + Gly	SM +Gly
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 (C vs SM) * p < 0.05 (SM +Gly vs SM), §p = 0.01 (C vs SM) y SM vs SM+Gly, ‡ p < 0.05 (C vs SM).



9.2 Efecto de la Gly sobre la biosíntesis de GSH en los diferentes órganos.

9.2.1 Hígado

El estatuto redox GSH/GSSG es un importante índice para determinar el equilibrio entre la producción y neutralización de radicales libres. La proporción de este cociente en hígado, es de 100:1 respectivamente, en condiciones fisiológicas normales. Se ha demostrado que el hígado presenta las concentraciones más altas de GSH, ya que en éste tejido presenta una actividad metabólica mayor.

En la Tabla 2 se ilustra los cambios en las concentraciones de GSH, producto y precursores; en el hígado de los animales tratados con glicina y sin glicina. La concentración de GSH en animales control es significativamente más alta en comparación con animales con SM, ya que en el SM hay una sobreproducción de ERO's que derivan del exceso de sacarosa ingerida. Inversamente la cantidad de GSSG en animales control es significativamente menor que en animales con SM. El cociente GSH/GSSG disminuye significativamente en el SM en comparación con el hígado de los animales controles.

En cuanto a la Cys es menor en animales con SM con respecto a controles, sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa. Así mismo la γ -GC es menor en animales con SM respecto a controles, pero no hay una diferencia significativa.

Cuando la Gly es suministrada a animales controles, éstos presentan un aumento significativo en la producción de GSH con respecto a los controles sin glicina, pero a su vez hay un aumento en la producción de GSSG pero éste aumento no es significativo. Por otro lado en animales con SM la glicina aumenta significativamente la producción de GSH y disminuye la de GSSG con respecto a animales con SM. Estos resultados sugieren que la Gly promueve la



biosíntesis del GSH, revirtiendo el efecto de los radicales libres.

En cuanto al contenido de Cys y de γ -GC, no existe diferencia significativa entre ellos en todas las diferentes condiciones experimentales.

TABLA 2. Efecto de la glicina sobre la concentración de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), cisteína (Cys), γ -glutamilcisteína (γ -GC), y sobre el cociente redox GSH/GSSG en hígado de ratas.

	C	CG	SM	SMG
GSH (nmol/mg)	45.5±17.1*	87.7±57.9‡	17.4±11.12**	40.0±13.4
GSSG (nmol/mg)	0.7±0.5	0.87±0.6	2.179±0.747***	1.0±0.5
Cys (nmol/mg)	17.6±11.63	20.0±16.4	7.218±10.4	23.3±19.9
γ-GC (nmol/mg)	11.3±5.7	17.7±7.2	4.60±2.21	12.9±5.1
GSH/GSSG (nmol/mg)	105.6±80.3 ^{oo}	141±102.4	8.91±6.41 [§]	46.2±23.5

Los valores representan la media \pm DS, n = 4 a 9 diferentes animales. * $p < 0.001$ (C vs SM) ** $p < 0.005$ (SM vs SMG), *** $p < 0.05$ (SM vs SMG), ^{oo} $p < 0.001$ (C vs SM), [§] $p = 0.001$ (SM vs SMG), ‡ $p < 0.5$ (CG vs SMG), en animales control C, control+glicina CG, síndrome metabólico SM y SM+glicina SMG.

9.2.2 Riñón

El riñón es uno de los órganos más activos metabólicamente ya que tiene como función principal, la filtración de la sangre y excreción de residuos metabólicos del organismo. Por ende es un tejido con gran impacto por los radicales libres generados por la dieta o por la acción catalizada por metales. La Tabla 3 muestra que la cantidad de GSH en los animales controles es significativamente mayor con respecto a los animales con SM.



TABLA 3. Análisis y cuantificación por HPLC de la concentración de glutatión reducido GSH, glutatión oxidado GSSG, cisteína Cys, γ -glutamilcisteína γ -GC, cociente del par redox GSH/GSSG en riñón de ratas.

	C	CG	SM	SMG
GSH (nmol/mg)	6.3±2.4*	12.3±3.7	1.1±0.6**	9.4±3.6
GSSG (nmol/mg)	0.87±0.27***	1.2±0.31	2.0±0.72‡	1.5±0.75
Cys (nmol/mg)	7.6±0.91''	11.3±4.7	2.4±2.6	6.4±5.7
γ-GC (nmol/mg)	0.52±0.44	3.2±2.3	0.57±0.71	1.0±0.62
GSH/GSSG (nmol/mg)	7.0±2.3 ^{§§}	12.0±4.0	0.70±0.4 ^{°°}	8.0±6.6

Los valores representan la media \pm DS, n = 4 a 9 diferentes animales. * $p < 0.001$ (C vs SM) ** $p < 0.005$ (SM vs SMG), *** $p < 0.05$ (C vs SM), ^{°°} $p < 0.001$ (SM vs SMG), ^{§§} $p < 0.01$ (C vs SM), ‡ $p < 0.05$ (SM vs SMG), '' $p < 0.001$ (C vs SM). En animales control C, control+glicina CG, síndrome metabólico SM y SM+glicina SMG.

Por otro lado, en animales con SM hay un aumento en el GSSG con respecto a animales controles, que se refleja en una importante disminución del GSH/GSSG en los animales con SM. Los resultados muestran que el cociente GSH/GSSG, refleja una proporción del orden de 10:1, lo cual coincide a lo que esta reportado en la literatura (35).

La Tabla 3 muestra una disminución en la cantidad de la cisteína en los animales con SM. En cuanto a la cantidad de γ -GC en el tejido no presenta cambios entre los diferentes tratamientos. El tratamiento de los animales con Gly induce un aumento significativo en la producción de GSH en animales con y sin SM, y está reflejado en un aumento en el cociente GSH/GSSG, lo cual indica que la glicina en los animales reduce el índice de EO en los animales con SM. En el caso de los precursores del GSH, la glicina normaliza la concentración de la cisteína y no afecta la γ -glutamilcisteína.



9.2.3 Corazón

El corazón es el órgano más activo de todo el organismo, es el encargado de bombear la sangre a través de todo el cuerpo. Se ha demostrado que en condiciones de isquemia/reperfusión hay un aumento en la producción de radicales libres que causan daño al funcionamiento por disminuir la disponibilidad del ON induciendo un aumento en la vasoconstricción, que está implicada en el desarrollo de hipertensión arterial, así el funcionamiento óptimo de este tejido depende de su sistema de defensa antioxidante, y por lo tanto de la función que puede tener el GSH dentro de este tejido.

La Tabla 4 muestra que en animales con SM hay una disminución significativa de GSH un aumento en la producción de GSSG con respecto a los animales control. Por otro lado la Cys no presenta diferencia significativa entre los animales controles y con SM. De manera análoga se observa diferencia significativa en la concentración del γ -GC entre ambos animales.

TABLA 4. *Glutati3n reducido (GSH), glutati3n oxidado (GSSG), ciste3na (Cys), γ -glutamilste3na (γ -GC) y cociente del par redox GSH/GSSG en coraz3n de ratas.*

	C	CG	SM	SMG
GSH (nmol/mg)	1.9 \pm 0.2*	3.51 \pm 1.0	0.938 \pm 0.41**	2.0 \pm 1.4
GSSG (nmol/mg)	0.7 \pm 0.13***	0.94 \pm 0.5	1.7 \pm 1.04 ^{oo}	0.45 \pm 0.24
Cys (nmol/mg)	0.4 \pm 0.32	0.7 \pm 0.5	0.41 \pm 0.5	0.6 \pm 0.53
γ-GC (nmol/mg)	0.28 \pm 0.19	0.6 \pm 0.366	0.22 \pm 0.18	0.5 \pm 0.22
GSH/GSSG (nmol/mg)	2.84 \pm 0.6 ^{ss}	5.2 \pm 4.1	0.78 \pm 0.62 \ddagger	3.4 \pm 2.6

Los valores representan la media \pm DS, n = 4 a 9 diferentes animales. * p < 0.001 (C vs SM) ** p < 0.05 (SM vs SMG), *** p < 0.05 (C vs SM), ^{oo} p < 0.001 (SM vs SMG), ^{ss} p < 0.01 (C vs SM), \ddagger p < 0.05 (SM vs SMG). En los animales control C, control+glicina CG, s3ndrome metab3lico SM y SM+glicina SMG.



En cuanto al cociente GSH/GSSG se observa una disminución en el SM en comparación con los animales control. La administración de la Gly a los animales controles como a los animales con SM, induce un aumento significativo en la cantidad de GSH en el corazón. La Gly induce un aumento en el cociente GSH/GSSG en ambos grupos de animales, Entre los cuatro grupos investigados no se encontró diferencia significativa en la cantidad de Cys y de γ -GC.

9.2.4 Músculo

En el músculo, al igual que los demás órganos, el SM disminuye significativamente el GSH y aumenta el GSSG en comparación con animales controles (Tabla 5). Estos cambios se reflejan en un aumento de cociente GSH/GSSG. En los animales con SM la cantidad de Cys en el SM reduce la concentración de éste aminoácido a diferencia de la γ -GC que no se observó diferencia significativa entre los dos grupos.

Cuando se les administra Gly en el agua de bebida a los animales controles y con SM, hay un aumento significativo en la concentración del GSH con respecto a su testigo. Por ejemplo, los animales con SM+Gly aumentaron significativamente la cantidad de GSH con respecto a los animales con SM y análogamente disminuyeron la cantidad de GSSG aunque no de una manera significativa. También los animales C+Gly aumentaron la cantidad de GSH con respecto a los animales control, aunque no fue significativo el incremento.

En cuanto a la Cys no se observó diferencia significativa entre los grupos de animales controles con y sin glicina, con excepción de los animales con SM, la Gly induce un aumento en la Cys en el SM.



Tabla 5. Efecto de la glicina sobre el contenido de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), cisteína (Cys), γ -glutamilcisteína(γ -GC) y cociente del par redox GSH/GSSG en músculo esquelético de ratas.

	C	CG	SM	SMG
GSH (nmol/mg)	3.9±0.8*	4.8±1.0	2.0±0.32	3.6±0.9
GSSG (nmol/mg)	0.55±0.1**	0.34±0.07	0.7±0.26***	0.4±0.08
Cys (nmol/mg)	14.5±10.2	29.8±15.5 ^{§§}	3.3±1.6	7.4±6.1
γ-GC (nmol/mg)	0.61±0.3	1.6±0.42	0.67±0.40	0.44±0.22
GSH/GSSG (nmol/mg)	7.2±1.4‡	14.3±2.5	3.33±2.0 ^{°°}	8.7±2.9

Los valores representan la media \pm DS, $n = 4$ a 9 diferentes animales. * $p < 0.01$ (C vs SM) ** $p < 0.5$ (C vs SM), *** $p < 0.5$ (SM vs SMG), ^{°°} $p < 0.001$ (SM vs SMG), ^{§§} $p < 0.01$ (CG vs C, SM y SMG), ‡ $p < 0.05$ (C vs SM), en los animales control C, control+glicina CG, síndrome metabólico SM y SM+glicina SMG.

9.3 Efecto de la glicina sobre la carbonilación de las proteínas como marcadores de estrés oxidativo en el SM.

La cuantificación de los grupos carbonilos en las proteínas por medio de su reacción con el 2,4-DNPH, es un índice de estrés oxidativo.

Nuestros resultados (Tabla 6) muestran que el consumo de sacarosa induce un aumento significativo en el contenido de las proteínas carboniladas, como índice de EO en todos los órganos estudiados.

El tratamiento con Gly de los animales con SM reduce la concentración de los carbonilos en la proteínas hasta los niveles encontrados en los animales controles en todos los órganos excepto el hígado. En hígado y en el riñón de los animales controles, la glicina induce un aumento en las proteínas carboniladas, pero este aumento no alcanza diferencia estadísticamente significativa.



TABLA 6. Efecto de la glicina sobre el contenido de carbonilos en proteínas de diferentes tejidos, en animales controles y con SM

	Controles (nmol/mg)		SM (nmol/mg)	
	-Gly	+Gly	-Gly	+Gly
Hígado	0.133±0.03*	0.33±0.2	1.54±0.82***	0.6±0.14
Riñón	0.46±0.33**	0.78±0.12	1.56±0.7***	0.8±0.4
Corazón	0.80±0.3‡	0.83±0.35	1.8±0.6***	1.1±0.62
Músculo	0.75±0.1*	0.43±0.25	1.3±0.61 ^{§§}	0.6±0.5 ^{°°}

Los valores representan la media \pm DS, n = 4 a 9 diferentes animales. * $p < 0.001$ (C vs SM) ** $p < 0.05$ (C vs SM), *** $p < 0.05$ (SM vs SMG), ^{°°} $p < 0.001$ (SM vs C), ^{§§} $p < 0.005$ (SM vs SMG), ‡ $p < 0.5$ (C vs SM).

9.4 Evaluación por Western Blot de la expresión las enzimas antioxidantes, GPX y Catalasa.

En el modelo de SM, el estrés oxidativo puede ser debido a un desequilibrio entre el sistema antioxidante y la producción de ERO's (producido por un exceso en la ingesta de hidratos de carbono). Una sobreproducción de ERO's implica mayor actividad en el sistema antioxidante; la GPX y la catalasa dos enzimas muy importantes en éste proceso, tienen como sustrato principal al H₂O₂ que es sintetizado por la actividad de la enzima SOD. La reducción de peroxido de hidrógeno por la GPX y la Catalasa deriva en la producción de H₂O.

9.4.1 Hígado

En homogeneizado de hígado, la enzima GPX-1 no muestra diferencia en su expresión entre los animales tratados: control con y sin glicina; y SM, con y sin glicina (Figura 6). Por otro lado la catalasa en animales control y control+Gly muestra menor expresión en comparación con animales SM y SM+Gly. El control de carga α -Tubulina refleja que en todos los pozos se cargó la misma cantidad de proteína

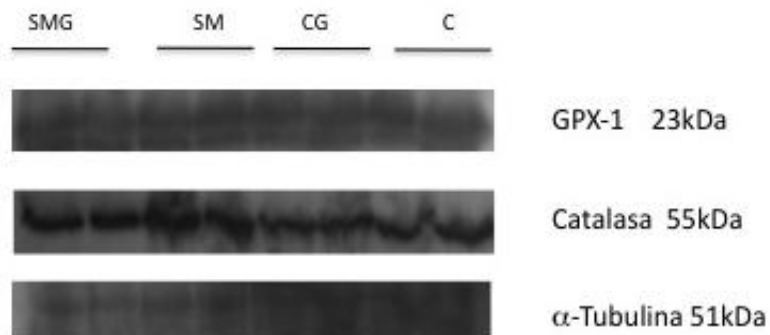


Figura 6. Análisis por Western Blot de GPX-1, Catalasa en presencia de α -Tubulina como control de carga. En animales control C, control+Glicina CG, Síndrome Metabólico SM, SM+glicina SMG.

9.4.2 Riñón

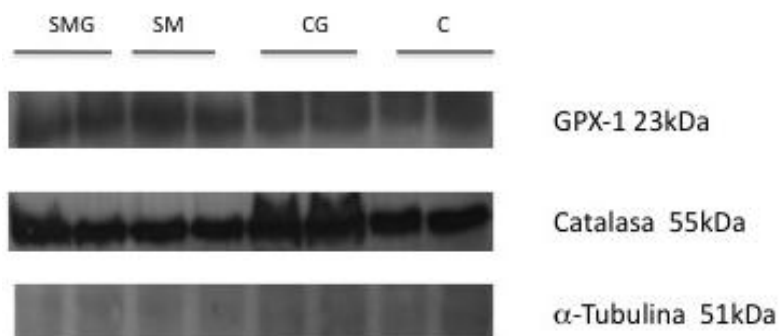


Figura 7. Expresión de enzimas antioxidantes por Western Blot. Glutación peroxidasa GPX-1, Catalasa y α -Tubulina como control de carga. En animales control C, control+Glicina CG, Síndrome Metabólico SM, SM+glicina SMG.

La glicina suplementada en el agua de bebida a los animales control y SM no induce diferencia en la expresión de la GPX-1, en el homogeneizado de riñón (Figura 7), sin embargo, la expresión de la catalasa presenta un aumento mínimo en animales controles tratados con glicina. Entre los animales SM con y sin glicina no existe diferencia en la expresión de la catalasa.

9.4.3 Corazón

La Figura 8, el análisis por Western Blot en homogeneizado de corazón de animales control y SM, tratados con y sin glicina, muestra que no existe diferencia de la expresión de la enzima GPX-1. En cuanto a la expresión de la catalasa el síndrome metabólico induce una disminución en su expresión y que el tratamiento con glicina aumenta su expresión en ambos animales.

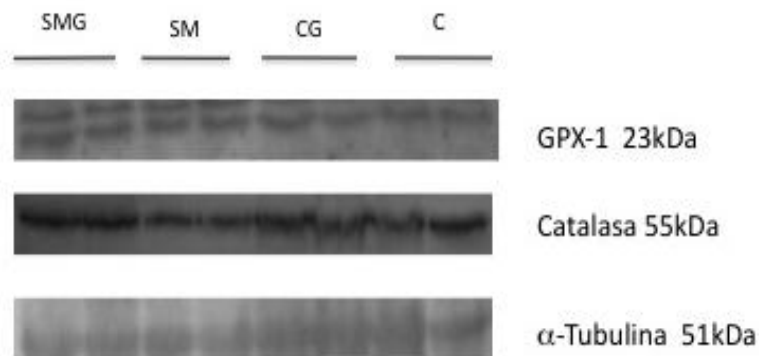


Figura 8. Expresión de enzimas antioxidantes por Western Blot. Glutatión peroxidasa GPX-1, Catalasa y α -Tubulina como control de carga. En animales control C, control+Glicina CG, Síndrome Metabólico SM, SM+glicina SMG.

9.3.4 Músculo

La figura 9 muestra un ligero aumento en la expresión de la GPX-1 en los animales SM con respecto a los animales con SM+Gly. En cuanto a los animales control con y sin glicina, la expresión es la misma.

Por otro lado la catalasa en los animales que se les administro Gly tienen una disminución en su expresión con respecto a los animales que no consumieron Gly.

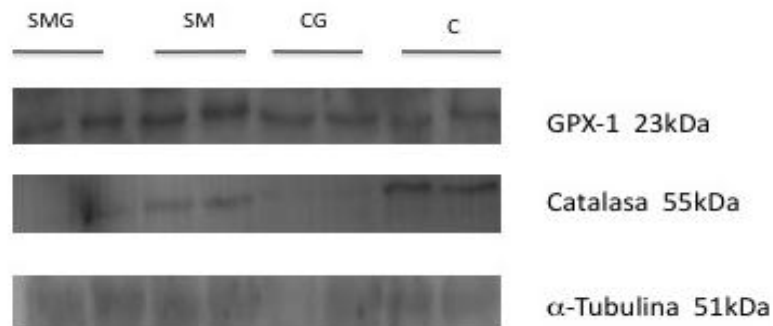


Figura 9. Expresión de enzimas antioxidantes por Western Blot. Glutatión peroxidasa GPX-1, Catalasa y α -Tubulina como control de carga. En animales control C, control+Glicina CG, Síndrome Metabólico SM, SM+glicina SMG.

9.5 Participación del receptor de la Gly en la biosíntesis de GSH en el hígado.

La investigación de la participación del receptor de la glicina (Gly-R) en la biosíntesis del GSH en los animales con y sin SM se ha realizado por medio del uso en estriquina, un antagonista con alta afinidad del Gly-R, a bajas concentraciones (500 nM) con la finalidad de describir la posible participación del receptor de la Gly en el mecanismo por lo cual la glicina reduce el estrés oxidativo en los animales con SM.

La administración de ácido oleico induce la generación de ERO's y un aumento en los niveles de estrés oxidativo en animales *in vivo*, por lo tanto el sistema de defensa antioxidante se activa para neutralizar estos ERO's.

La Tabla 7 muestra que la administración de ácido oleico en animales control y SM sin Gly disminuye la concentración de GSH y aumenta el glutatión oxidado GSSG. La administración del ácido oleico no afecta significativamente la



concentración del GSH en el hígado de ambos animales con glicina, tampoco altera la cantidad de GSSG.

La administración de Gly (1 %) en el agua de bebida aumenta los niveles de GSH en ambos animales con y sin SM.

Sin embargo, la estircnina antagonista del Gly-R, en presencia de ácido oleico revierte el efecto de la Gly en el control disminuyendo el GSH y amentando el GSSG. En el hígado de los animales con SM la estircnina aumenta el GSSG y no muestra efecto sobre el GSH. La estircnina en ausencia de ácido oleico no afecta las proporciones de GSH ni de GSSG. La estircnina revierte el efecto de la Gly e induce un desbalance en el cociente GSH/GSSH.

TABLA7. Efecto del ácido oleico y la estricnina sobre el glutatión en el homogenizado de hígado.

(nmol/mg)	Controles					Síndrome Metabólico				
	G	O	GO	GE	GOE	G	O	GO	GE	GOE
GSH	87.7±57.9 *	12.9±3.4	89.4±20.7	71.0±16.5	58.1±11 ^{oo}	40±13.4**	7.4±0.24ç	30.6±26.8 #	55.7±38.3	67.0±15.7
GSSG	0.87±0.6 ***	2.7±0.3 °	0.98±0.2	0.46±0.222	1.5±0.2 §	1±0.5****	3.5±0.21ç	1.2±0.7 #	0.57±0.15	2.2±1.2
GSH/GSSG	141.0±102‡	4.8±7.4	97.3±45.2	189.9±129.1	39.4±12.2	46.2±23.5	3.0±3.5 ç	27.52±24 #	98.0±69.0	46.1±43.0

Los valores representan la media \pm DS, n = 3 a 6 diferentes animales. * p< 0.001 (CG vs CO), ** p<0.001 (SM vs SMO), ***p<0.05 (C vs CGEO), **** p<0.005 (SMG vs SMGEO), ° p<0.001 (CO vs CG), ^{oo}p<0.005 (C vs CGEO),§p<0.01(C vs CGEO), ‡ p<0.05 (C vs CO, CGO y CGEO), ç p<0.005 (SMO vs SMGEO), # p<0.005(SMGO vs SMGEO). En animales+Gly: G; +Oleico: O; +Gly+Oleico: GO; +Gly+Estricnina: GE;+Gly+Oleico+Estricnina: GOE



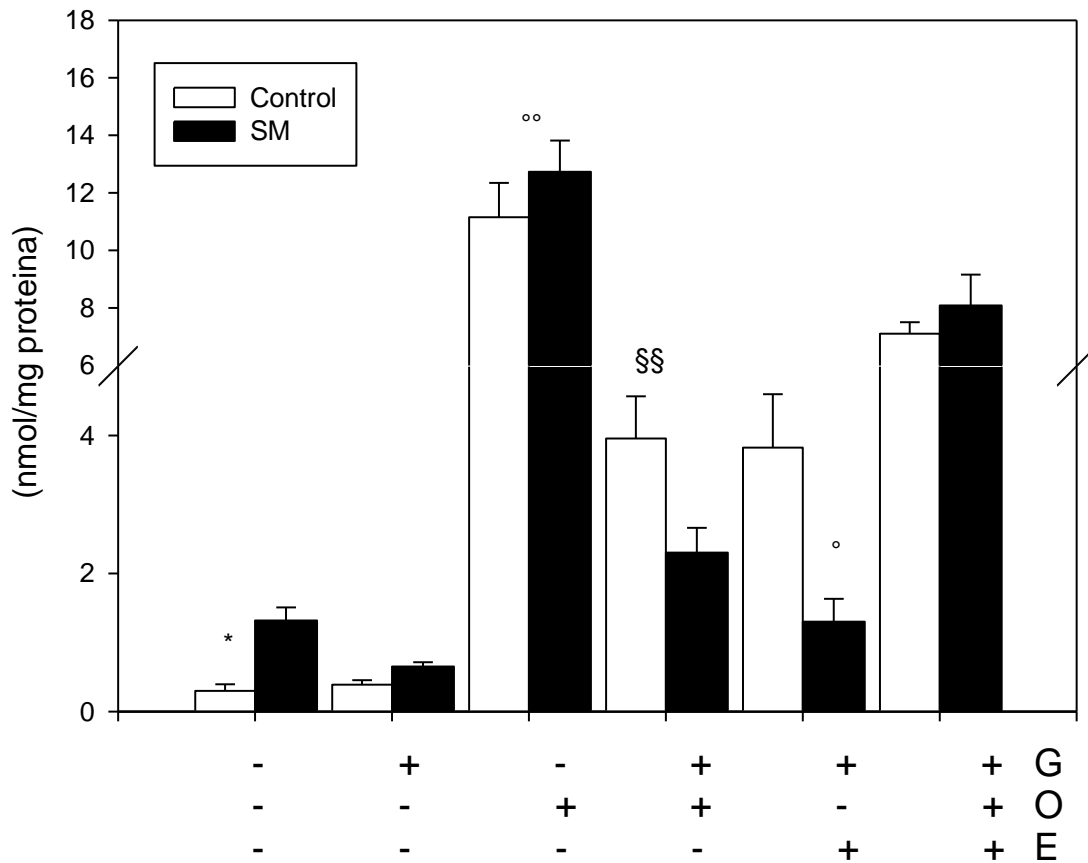
9.6.1 Efecto de la estricnina sobre la oxidación de proteínas en el hígado.

Los cambios en el estatuto redox (GSH/GSSG) están asociados con un aumento en la generación de especies reactivas que causan modificación de las proteínas por carbonilación.

La Tabla 8 muestra que la administración del ácido oleico aumenta la cantidad de los carbonilos en el homogeneizado de hígado en ambos animales con y sin SM. La Gly reduce la cantidad de las proteínas carboniladas en los animales con SM en comparación con los animales controles. La administración del ácido oleico en presencia de estricnina exacerba el aumento en la concentración de las proteínas carboniladas en ambos animales tratados con glicina. La estricnina no afecta la carbonilación de las proteínas en los animales tratados con glicina. La glicina reduce el aumento de la carbonilación inducido por el ácido oleico, tanto en animales control y con SM; aunque este abatimiento no es por completo en comparación con los animales control.

El tratamiento de los animales con estricnina como antagonista del receptor de glicina (Gly-R) revierte el efecto protector de la glicina en las diferentes condiciones.

Figura 10. Efecto del ácido oleico y la glicina en presencia de estricnina sobre la carbonilación de proteínas en hígado



Los valores representan la media \pm DS, $n = 3$ a 6 diferentes animales. * $p < 0.001$ (C vs CO), $^{\circ\circ} p < 0.001$ (CO vs CGO) y (SMO vs SMGO), $^{\circ\circ\circ} p < 0.05$ (CGO vs CGEO), $^{\circ} p < 0.01$ (SMGE vs SMGEO). En animales controles (con glicina y sin glicina) y en animales SM (con glicina y sin glicina), con oleico O, Control+Gly+Oleico GO, Control+Gly+Estricnina GE, Control+Gly+Oleico+Estricnina GOE y SM+Gly+Oleico GO, SM+Gly+Estricnina GE, SM+Gly+Oleico+Estricnina GOE.

10. DISCUSIÓN.

En nuestro laboratorio ha sido desarrollado un modelo experimental de SM inducido por un alto consumo de sacarosa, el cual causa alteraciones en el metabolismo de lípidos que contribuyen al desarrollo de la obesidad, la hipertensión y la resistencia a la insulina (5-7, 58 y 59).

En este modelo, el aumento de los triglicéridos observado en los animales con SM, refleja una alta actividad lipogénica en el hígado (58). La hipertrigliceridemia resulta en una acumulación del exceso de energía como triglicéridos en el tejido adiposo sobre todo en la cavidad intra-abdominal. La acumulación de grasa intra-abdominal se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa y con la hiperinsulinemia e hipertensión (1, 4, y 58) como se ha encontrado en nuestro modelo de SM. El mecanismo por el cual se acumula grasa en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura (6). En el tejido adiposo hay una alta actividad lipolítica que esta asociada con mayor liberación de ácidos grasos no esterificados o libres.

El aumento descontrolado de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo, desencadena un desequilibrio en la producción de ERO's; como consecuencia estas especies dañan directamente a la célula y a las biomoléculas, que son fundamentales para un buen funcionamiento celular (11, 19, 22 y 46).

La sobreproducción de ERO's es controlada por el sistema de defensa antioxidante, en los cuales intervienen fuentes enzimáticas y no enzimáticas (28, 29).

El tripéptido glutatión (GSH) es una de las fuentes antioxidantes más importantes para la función de la célula. Además el GSH hace parte del cociente redox GSH/GSSG que está asociado directamente con el estrés oxidativo. El GSH rápidamente reacciona donando un electrón reduciendo el H_2O_2 y otros hidroperóxidos lipolíticos, formando un puente disulfuro con otra molécula de glutatión dando glutatión oxidado por medio de la glutatión peroxidasa (36).



La biosíntesis de GSH puede ser llevada a cabo por dos vías principalmente, la síntesis *de novo* o directamente por vía de la reserva que se involucra en su degradación. La primera requiere de la biodisponibilidad de tres aminoácidos, el ácido glutámico, la cisteína y la glicina. Esta síntesis es mediada por la actividad consecutiva de las enzimas γ -GCS y GS. Una vez formado el GSH, es distribuido libremente en el citosol, en el retículo endoplásmico, núcleo y mitocondria (34-37).

El SM inducido por alto consumo de sacarosa en los animales está asociado con una disminución en el contenido del GSH, un aumento en el GSSG y en un aumento en el contenido en proteínas carboniladas en los diferentes tejidos analizados. Estos resultados indican un aumento en el estrés oxidativo en los diferentes tejidos analizados probablemente debido a un aumento en la generación de radicales libres, por ejemplo, en mitocondrias de hígado (61) en riñón, en corazón y en musculo esquelético estudio publicado en nuestro laboratorio han mostrado que la mitocondria participa en la generación de estrés oxidativo en el SM. También la depleción del GSH ha sido asociada con estrés oxidativo en células hepáticas (62) e induce oxidación del ADN en diferentes órganos *in vivo* (63).

En nuestro modelo de SM la reducción en la concentración del GSH puede ser también una causa del estrés oxidativo observado en los animales. Por otro lado la disponibilidad de la cisteína que es precursor del glutatión puede influir en su biosíntesis. En los animales con SM, la cisteína ha sido encontrada disminuida en todos los tejidos analizados. Cabe señalar que la cisteína es un aminoácido no esencial y el organismo puede sintetizarla a partir de la metionina y de otras moléculas estructurales.

La administración de glicina (1%) en el agua de bebida de los animales control y SM induce un aumento en la biosíntesis de GSH, una disminución en el GSSG y en la carbonilación de proteínas en todos los diferentes tejidos estudiados. Estos resultados sugieren que la glicina disminuye el estrés



oxidativo en los tejidos analizados por modulación del cociente redox (GSH/GSSG) y participando en el biosíntesis del GSH.

El aumento en la concentración de glutatión puede ser debido a la biodisponibilidad de glicina, que es un precursor directo del glutatión. La vía de la biosíntesis del glutatión incluye la reacción de la glicina con la γ -glutamil-cisteína por medio de la glutatión sintetasa. Los resultados muestran que el SM reduce la concentración de la cisteína y de la γ -glutamil-cisteína en los diferentes tejidos analizados. El mecanismo por el cual el SM reduce la concentración de los dos precursores del glutatión no está bien establecido en nuestro modelo pero el estrés oxidativo ha sido asociado con disminución en los tioles en diferentes condiciones experimentales (64). La disminución de cisteína así como la γ -glutamil-cisteína pueden afectar la vía de la síntesis del GSH. El tratamiento de los animales con glicina aumenta la concentración de la cisteína y de γ -glutamil-cysteína en todos los tejidos analizados en ambos animales. Por lo tanto la síntesis *de novo* de la cisteína puede promoverse por medio de la glicina suplementada en la dieta de los animales. Recientemente se ha descrito que la suplementación de la glicina junto con cisteína en la dieta de pacientes con diabetes no controlada (65) y en sujetos con edad avanzada (66) induce un aumento del GSH. En el modelo de SM tratado solamente con glicina, el aumento del GSH se refleja en un cambio en el cociente GSH/GSSG y una disminución de la carbonilación de proteínas.

Recientemente, el mecanismo por el cual la glicina en la dieta protege contra el estrés oxidativo y aumenta la síntesis de GSH ha sido propuesto que depende del transportador de glicina GLYT1 (67).

En nuestro trabajo no hemos analizado la participación del transportador de glicina pero el efecto protector de la Gly es sensible a estriocina un antagonista de receptor de glicina. La glicina por medio de su receptor activa un canal de cloro que despolariza la membrana inhibiendo la entrada de Ca^{++} dependiente de voltaje (53-55). Este efecto de la glicina a través de su receptor ha sido la propuesta del mecanismo por el cual la glicina ejerce un efecto anti inflamatorio en diferentes condiciones patológicas (50).



En el hígado donde la glicina ha mostrado su efecto benéfico de una manera muy clara, la administración del ácido oleico causa un aumento en el estrés oxidativo, aumentando la concentración de GSSG, disminuyendo la concentración de GSH y aumentando las proteínas carboniladas. Esto sugiere que el ácido oleico induce un aumento en la generación de EROs al nivel de la mitocondria de hígado como se ha reportado recientemente en nuestro modelo (61).

La protección de la glicina contra el estrés oxidativo inducido por ácido oleico puede ser atribuida al GSH aumentado en el hígado de los animales tratados con glicina. Por otro lado al bloquear el receptor con estriquina, la Gly pierde su efecto benéfico sobre la producción de ERO's inducida por ácido oleico, y como consecuencia la síntesis de GSH disminuye, el cociente GSH/GSSG disminuye y el índice de proteínas carboniladas aumenta. Este resultado sugiere que el efecto protector de la glicina contra el estrés oxidativo inducido por ácido oleico esta mediado por su receptor que es sensible a estriquina y que activa el canal de cloro.



12. CONCLUSIONES

- El síndrome metabólico inducido en las ratas Wistar por alto consumo de sacarosa, está asociado con estrés oxidativo y disminución de la concentración del GSH en los diferentes tejidos analizados.
- La glicina suplementada a la dieta de los animales con SM tiene un efecto benéfico sobre el estrés oxidativo por medio de un aumento en la biosíntesis del glutatión.
- La glicina protege contra el estrés oxidativo inducido por el ácido oleico por medio de la activación de su receptor sensible a estircina y que activa el canal de cloro.



11. REFERENCIAS.

1. El Hafidi M, Perez I, Zamora J. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and BP in sucrose-fed rats. *Am J Physiol* 2004 287:R1387-1393
2. El Hafidi M, Pérez I, Baños G. Is glycine effective against elevated blood pressure? *Curr Opin Nutr Metab Care*. 2006; 9:26-31
3. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for Health. *J Nutr*. 2004, 134:489-92
4. Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl*; 1988, 4:13-16
5. Baños G, Perez-Torres I y El Hafidi M. Medicinal Agents in the Metabolic Syndrome. *Cardio Hema Agents Med Chem*, 2008,6,237.252
6. Baños G, Pérez-Torres I, El Hafidi M, Guarner V. Insulin resistance and the Metabolic Syndrome. "New Research" edited by Elwood F. Benhagen. Edit. *Nova Sci Pub*.2008. New York; 102:179-184
7. Zachari T, BloomgardenMD. Obesity, hipertension and Insulin Resistance. *Diabetes Care*; 2002; 25:2088-2097
8. Martínez de MoretínB.E., Rodríguez MC, Martínez J.A. Síndrome Metabólico, resistencia a la insulina y metabolismo. *Endocrinología y Nutrición*. 2003; 50:324
9. Fernández-Sánchez A, Madrigal E, Bautista M, Esquivel, et. al. Inflammation, Oxidative Stress and Obesity. *Int J Sci*. 2011, 12:3117-3132



10. Página oficial; Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010, www.oms.com
11. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et.al .Increased oxidative stress in obesity and its impacton metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004; 114:1752-1761
12. Sjöholm A, Nystrom T. Infalmtion and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; 22:1, 4-10
13. Ghilardi N, Skoda RC. The leptin receptor activates Janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol.* 1997: 11:4, 393-399
14. Sánchez J, López D, Pinzon O, Sepúlveda J, et. Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo. *Revista colombiana de Cardiología.* 2010; 17:167-176
15. Yamuchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S. Adiponectin simulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated proteína kinase. *Nat Med.* 2002; 8:11, 1288-1295
16. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectina receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26:3, 439-451
17. Patel C, Ghanim H, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and Nuclear Factor-kB activation alter a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92, 4476.4479
18. Prentki M, Joly E, El Assaad W, Roduit R: Malonyl-CoA signaling, lípid partitioning, and glucolipototoxicity: role in cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl. 3):S405–S413, 2002



19. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*; 2003; 280:719-722
20. Andrew W, Agnes F, Stephen J. Activation of protein kinase C: a physiological reaction *Trends in Biochemical Sciences*. 1987; 2:53-54
21. Christian R, Kunal S. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2009. (84)705-712
22. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, et. al. Oxidative Stress, Nitric Oxide and Diabetes. 2010 7:15-25
23. Yung-Zhong F, Sheng Y, Guoyao W. Free Radicals, antioxidants and Nutrition. *Reg of Physiol Syst Nutr*. 2002; 18:872-879
24. Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552:335-344
25. Nicolson G. Metabolic Syndrome and Mitochondrial Function: Molecular Replacement and Antioxidant Supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J cell Biochem*. 2007; 100:1352-1369
26. Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants-*EUROFEDA*. *Mol Aspects Med*. 2002; 23:1-38
27. Valko M, Leibfritz, Moncol Jan, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Interna J Biochem and cell Biol*. 2007; 39:44-84
28. Halliwell B. (1999) Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu Rev Nutr*; 16:33-50
29. Halliwell B, Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning). *Free Rad Res*. 1999; Vol 31:261-272



30. Cuerda C, Luengo M, Valero M, Vidal A, et al. Antioxidantes y diabetes mellitus: revision de la evidencia. *Nutrición Hospitalaria*. 2011; 26(1):68-78
31. Kuang C. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol and Med*. 1991; 11:215-232
32. Sweaza KL, Leivk M, Walker BR. Comparasion of mechanism involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutr Metab*. 2010, 4:7-14
- 33 Wang Q, Sun Y, Ma A, Li Y, Han X, et. Effects of vitamina E on plasma lípid status and oxidative stress and metabolic syndrome. *Nutr Res*. 2010, 80:178-187
34. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:916-21
35. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004; 134:489-92
36. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role in the pathophysiology of human diseases. *Archf Physiol Bioche*.2007; 113(4/5): 234-258
37. Townsend DM, TewKD, Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57:145-55
38. Ballatori N, Hammond CL, CunninghamJB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanism of reduce glutathione transport: role the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxico lAppl Pharmacol* . 2005; 204:238-55



39. Hagenbuch B, Meier PJ. 2004 Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 447:653-65
40. Wlodek L. 2002. Beneficial and harmful effects of tilos. *Pol J Pharmacol* 54:215-23
41. Saad A Noeman, Hala E Hamooda and Amal A Baalash. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2011; 3:17
42. Chávez, F. J., Mansego, M. L, Blesa, S., Gonzalez-Albert, V., Jimenez, J., Tormos, M. C., et al. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Ame J Hypert.*2007; 20, 62–69
43. Prasad, A., Andrews, N. P., Padder, F. A., Husain, M., &Quyyumi, A. A. (1999). Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardio*, 34, 507–514
44. Rajagopal V, Sekhar M, Sisipoom V, et al. Glutathione Syntesis is dismished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care.* 2011; 34:162-167
45. Stadtman Earl R. and Oliver Cynthia N. Metal-catalyzed of Proteins. Physiologiical consequences. *J Biol Chem.* Vol. 266, No 4. 2005
46. Díaz-Acosta Alondra E, Membrillo-Hernández Jorge. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista especializada en ciencias Químico-Biológicas.* 2006; 9(1):34-44



47. Levine Rodney. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32:9, 790-796
48. Matthias F, Ronald G Tthurman and Michael Wheeler. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002, 283: G856-G863
49. Ruiz-Meana M, Piña P, García-Dorado, et al. Glycine protects cardiomyocytes against letalreoxygenation injury by inhibing mitochondrial permeability transition. *J Phisiol.* 2004; 558:873-882
50. Zhong Z, Connor HD, Yin M, et al. Dietary glycine and renal denervation prevents ciclosporina A-induced hydroxil radical production in rat kidney. *Mol Pharmacol.* 1999; 56:455-463
51. Mauriz JL, Matilla B, Culebras JM, et al. Dietary glycine inhibits activation of nuclear factor kappa B and prevents liver injury in hemorrhagic shock in the rat. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:1236-1244
52. Wheeler MD, IkejemaK, Enomoto N, Zhong Z, et al. Glycine: a new anti-inflammatory immune nutrient. *Cell Mol Life Sci* 56(1999) 843-856
53. Matilla B, Mauriz J M, Culebras M, González-Gallego J, González P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr Hosp.* 2002; XVII (1) 2-9
54. Kuhse J, Betz H, Kirsch J. The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-chanel complex. *Curr Opin Neurobiol.*1995, 5:318-323
55. Zhong Z, Wheeler MD, Li X, et al. L-Glicine: a novel antiinflamatory, immune modulatory and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6:229-240



56. Paolisso G, Giosué DM, Pizza G, D'amore A, et al. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am Physiol Soc.* 1992; 263:E435-E440
57. Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes M, Thurman R. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca^{2+} due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Liver.* 2002; 283:G1249-G1256
58. El Hafidi M, Valdez Raúl y Baños G. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exper Hypertension.* 2000; 22(1), 99-108
59. Pérez I, El Hafidi M, Sanchez and Baños G. Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo- γ -linoleic and linoleic acids. *Medic Sci Reser.* 1999; 27:847-849
60. Rodriguez E, Perea J. M, Lopez M y Ortega R. Obesidad, Resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipoquinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria.* 2990; 24:4, 1-8
61. Ruiz Ramírez A, Chávez Salgado M, Pineda Flores JA, Zapata EG, Masso FR, El Hafidi M. High sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 doi: 10.1152/ajpendo.00631.2010
62. Tapryal N, Mukhopadhyay C, Mishra MK, Das D, Biswas S, Mukhopadhyay CK. Glutathione synthesis inhibitor butathionesulfoximine regulates ceruloplasmin by dual but opposite mechanism: Implication in hepatic iron overload. *Free Radic Biol Med.* 2010, 1;48(11):1492-500.
63. Gokce G, Ozsarlak-Sozer G, Oktay G, Kirkali G, Jaruga P, Dizdaroglu M, Kerry Z. Glutathione depletion by buthioninesulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo. *Biochem.* 2009, 9; 48(22):4980-7.



64. SenCK. Cellularthiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul.* 2000; 36:1-30.
65. Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, Jahoor F. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care.* 2011;34(1):162-7.
66. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation *Am J Clin Nutr.* 2011 94:847-853
67. Alison Howard, Imran Tahir, SajidJaved, Sarah M.Waring, Dianne Ford and Barry H. Hirst Glycine transporter GLYT1 is essential for glycine-mediated protection of human intestinal epithelial cells against oxidative damage *J Physiol* 588.6. 2010, 995–1009.