



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESION DE
GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DE
AMINOACIDOS E HIDRATOS DE CARBONO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

GUADALUPE BEATRIZ RODRIGUEZ FUENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1994





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 está 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 SEGUN EL TEMA:

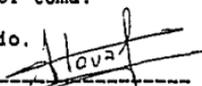
Presidente. Prof: Guadalupe Vélez Pratt.
Vocal. Prof: Armando Roberto Tovar Palacio.
Secretario. Prof: Raúl Genaro Aguilar Caballero.
1er. suplente Prof: María Estela Cevallos Ferriz.
2do. suplente Prof: Jesús Fernando Montiel Aguirre.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Nutriología Molecular . Instituto Nacional de la
Nutrición "Salvador Zubirán"

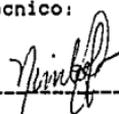
Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.



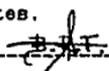
Nombre completo y firma del supervisor técnico:

M. en C. Nimbe Torres y Torres.



Nombre completo y firma del sustentante:

Guadalupe Beatriz Rodríguez Fuentes.



! NO DESISTAS !

Cuando vayan mal las cosas

como a veces suelen ir;

Cuando ofrezca tu camino

sólo cuestas que subir;

Cuando ya el dolor te agobie

y no puedas ya sufrir,

descansar acaso debes;

PERO NUNCA DESISTIR

Tras las sombras de la duda

ya plateadas ya sombrías

puede bien surgir el triunfo,

no el fracaso que temías

y no es dable a tu ignorancia

figurarse cuan cercano

puede estar el bien que

anhelas y que juzgas tan lejano.

Lucha, puedes por más que en

la brega tengas que sufrir.

! CUANDO TODO ESTE PEOR,

MAS DEBEMOS INSISTIR !

AGRADECIMIENTOS .

Dr. Panduro por haberme permitido realizar la mayor parte de este trabajo en el Departamento de Gastroenterología y proporcionarme además las herramientas necesarias para hacerlo.

Dra. Ana Rosa Rincón por haberme ayudado con su asesoría técnica y apoyo.

Dr. Armando Tovar por su valioso asesoramiento para la realización de esta tesis.

A los honorables miembros del jurado.

A todos mis profesores de la licenciatura, ya que no sólo legaron en mí sus conocimientos sino que además fueron mis amigos.

A todos los integrantes del laboratorio de Hepatología Molecular del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, no sólo por su ayuda sino también por el sentimiento de compañerismo demostrado.

GRACIAS SEÑOR, QUE ME PERMITISTE LLEGAR A UNA DE MIS METAS MAS GRANDES, Y POR HABERME ILUMINADO EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES DE LA REALIZACION DE MI TESIS.

A MIS PADRES:

Ya que gracias a la formación y al cariño que me han dado, a su paciencia, confianza, comprensión incondicional pude terminar con esta tesis y de esta forma concluir una etapa más en mi vida.

A VICTOR MANUEL HERNANDEZ:

Sin tu ayuda no me hubiera sido posible continuar, porque siempre has estado junto a mí aún en los momentos más difíciles, te agradezco todo el apoyo moral, tu paciencia y todo el amor que me has dado.

A MI TIO PEDRO:

Con amor, por su gran motivación para seguir adelante y además por creer siempre en mí.

A MI PRIMA DULCE:

Por tu cálida sonrisa y tus palabras de aliento a través de los años, porque más que una prima has sido una hermana.

A MIS PRIMOS CESAR Y ALFREDO:

Por el apoyo que siempre, incondicionalmente me han dado.

A MANUEL BUTRON:

Por tu incansable apoyo, por que en todo momento me escuchaste, pero sobre todo por ser mi amigo.

DR. FERNANDO MONTIEL:

Por su apoyo moral, valiosos consejos e incalculables conocimientos.

A MIS TIOS TACHO, BLANCA Y VICTORIA:

Por su apoyo y comprensión.

A VILMA MALDONADO:

Por todo el tiempo y la ayuda incondicionales que me diste, por haberme escuchado y por todos tus consejos.

A ANA MARIA RIVAS:

Por la comprensión y paciencia que en algún momento me diste.

A PATRICA NUMO Y A MARTHA RAMOS:

Porque me legaron sus experiencias de trabajo y conocimientos, porque siempre me tendieron la mano incondicionalmente.

A TODOS MIS AMIGOS:

Porque forman parte de mi vida y de todas mis vivencias, porque de una u otra forma han contribuido a mi formación como persona y como profesionista.

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCION	1
- Generalidades	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES	5
A. Fisiología del hígado.....	5
B. Metabolismo de aminoácidos.....	5
a) Utilización de aminoácidos	6
b) Aspectos nutricionales	7
c) Aspectos metabólicos	12
C. Niveles de regulación de la utiliza- ción de aminoácidos.....	14
a) Absorción, reabsorción y almace- naje	15
b) Síntesis y degradación de amino- ácidos	16
c) Regulación a nivel enzimático ..	20
d) Regulación a nivel génico	23
D. Factores que influyen en la utilización de aminoácidos	25
E. Enzimas.	30

a) Tirosina aminotransferasa (TAT)	31
a.1 AMPc e inducción de TAT....	33
a.2 Efecto de la insulina	34
a.3 Inducción por actinomicina D.	34
a.4 Ontogenia de la enzima	37
a.5 Ritmo diurno de TAT	38
b) Fenilalanina hidroxilasa (PAH)....	40
b.1 Reacción que cataliza	40
b.2 Generalidades de la enzima.	40
c) Fosfoenolpiruvato carboxicinasas (PEPCK)	48
c.1 Generalidades	48
c.2 Reacción que cataliza	51
F. OBJETIVOS	60
- General.	
- Particulares.	
G. JUSTIFICACION	61
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	62
- ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	62
I. Composición de las dietas	64

I.1	Tratamientos dietarios	66
I.1	Dieta al 18% de proteína.	66
I.2	Dieta al 6% y al 50% de proteína	67
II.3	Dieta al 6% y al 50% de proteína P.L.	68
II.	Estudios moleculares	69
II.1	Extracción del ARN total.	70
II.2	Detección de ARNm especí- ficos con la técnica de Northern Blot	72
II.3	Transferencia del ARN de los geles de agarosa a las membranas de hibridación.	73
II.4	Marcaje del ADNc con [α - ³² P]dCTP	75
II.5	Expresión y cuantificación de los niveles de ARNm	77
II.6	Autoradiografía	78
II.7	Técnica del dot blot	79
CAPITULO III.	RESULTADOS Y DISCUSION	80
-	Tablas de los datos asentados en las gráficas	80
-	Gráficas de ganancia de peso en los diferentes tratamientos dietarios	90

- Gráfica de ingesta de alimento en los diferentes tratamientos dietarios.....	91
- Niveles hepáticos de ARNm específicos de cada una de las enzimas:	
TAT.....	94
PAH.....	99
PEPCK	104
Albúmina	118
- Northern y dot blot de las enzimas estudiadas.....	95

CAPITULO IV. CONCLUSIONES	113.
---------------------------------	------

ANEXO	115
-------------	-----

REFERENCIAS	123
-------------------	-----

LISTA DE TABLAS.

TABLA	Página
TABLA I. Gramos consumidos de alimento por día de cada una de las diferentes dietas...	80
TABLA II. Ganancia de peso por día de tratamiento.	
TABLA III. Densitometría de la enzima Tirosina aminotransferasa.....	81
TABLA IV. Densitometría de la enzima Fenilalanina hidroxilasa.....	82
TABLA V. Densitometría de la enzima Fosfoenolpiruvato carboxicinasa.....	83
TABLA VI. Densitometría de albúmina.....	84
TABLA VII. Efecto de dietas con diferente contenido proteico en el crecimiento en ratas....	85
TABLA VIII. Efecto de dietas con diferente contenido proteico en la ingesta de alimento.....	86
TABLA IX. Efecto de dietas con diferente contenido proteico en la ingesta relativa.....	87

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA	Página
FIGURA No.1 Interacción entre la dieta, las hormonas. la expresión genética y la actividad enzi- mática.	3
FIGURA No.2 Ganancia de peso individual de ratas ali- mentadas con diferentes niveles de protei- na de una variedad de alimentos.	9
FIGURA No.3 Ganancia de peso contra ingesta de N ₂ (mg de proteína balanceada.	10
FIGURA No.4 Rutas de entrada de los esqueletos carbonados de los aminoácidos en el ciclo de ácido tri- carboxílico.	18
FIGURA No.5 La vía de la expresión genética.	24
FIGURA No.6 Reacción que cataliza la enzima tirosina aminotransferasa	31
FIGURA No.7 Reacción que cataliza la enzima Fenilalanina hidroxilasa	40
FIGURA No.8 Conversión de la fenilalanina y de la tirosina en los ácidos acético y fumárico.	41
FIGURA No.9 Esquema general de los aminoácidos en el ciclo del ácido tricarboxílico.	43
FIGURA No.10 Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de PAH.	46

FIGURA No.11 Ruta central de los hidratos de carbono	50
FIGURA No.12 Gluconeogénesis.	52

FIGURAS DE LA SECCION DE RESULTADOS.

FIGURA No.1 Ganancia de peso (g) en ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	90
FIGURA No.2 Ingesta de alimento en ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	91
FIGURA No.3 Niveles relativos de ARNm de la enzima TAT en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	94
FIGURA No.4 Northern Blot de la enzima TAT con tratamiento de caseína al 18%. Experimento control.....	95
FIGURA No.5 Dot blot de la enzima TAT bajo los diferentes tratamientos dietarios.	96
FIGURA No.6 Niveles relativos de ARNm de la enzima PAH en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	99
FIGURA No.7 Northern Blot de la enzima PAH con tratamiento de caseína al 18%. Experimento control....	100
FIGURA No.8 Dot Blot de la enzima PAH con los diferentes tratamientos dietarios.....	101
FIGURA No.9 Niveles relativos de ARNm de la enzima PEPCK en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	104

FIGURA No.10	Northern Blot de la enzima PEPCK con tratamiento con caseína al 18%. Experimento control.	105
FIGURA No.11	Dot blot de la enzima PEPCK bajo los diferentes tratamientos dietarios.	106
FIGURA No.12	Niveles relativos de ARNm de albúmina en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.....	108
FIGURA No.13	Northern Blot de albúmina con tratamiento con caseína al 18%. Experimento control.	109
FIGURA No.14	Dot Blot de albúmina bajo los diferentes tratamientos dietarios.	110
FIGURA No.15	Dot Blot de ribosomal 28S.....	111

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio es el de cuantificar el efecto agudo de dietas con diferente contenido proteico en forma de caseína y la alteración de las concentraciones de los ARNm específicos para la fenilalanina hidroxilasa y la tirosina aminotransferasa en hígado de rata. También se evaluaron las concentraciones de ARNm de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de albúmina.

Los resultados mostraron que en aquellas ratas adaptadas a consumir dietas con 18% de caseína, si el día del experimento se les administraba una dieta con baja concentración de proteína 6% o se le continuaba dando una dieta con un contenido adecuado de proteína, en este caso 18% de caseína, los cambios observados para los ARNm de las enzimas tirosina aminotransferasa y fenilalanina hidroxilasa fueron relativamente pequeños indicando que el organismo de estas ratas está preparado para hacer frente a la carga de aminoácidos aportados por estas dietas, sin embargo si durante el día del experimento se les suministraba una dieta con un contenido muy alto de proteína (50%), se observó un aumento de hasta alrededor de 10 veces sus niveles basales, lo que indica que el organismo de estas ratas no está preparado para degradar el exceso de aminoácidos aportados por esta dieta, por lo que requiere sintetizar más enzima para poder así, oxidar el excedente de aminoácidos y así poder regresar las concentraciones

plasmáticas de aminoácidos a valores "normales". Las ratas adaptadas a consumir dietas que contenían 50% de proteína, cuando fueron expuestas a dietas con 50% o menor cantidad de proteína no requirieron mayor cantidad de ARNm de ambas enzimas.

Las concentraciones de la enzima clave en la gluconeogénesis fosfoenolpiruvato carboxicinasas, mostraron un aumento conforme se prolongó el período de ayuno, sin embargo en animales adaptados a una dieta con 50% de caseína y alimentados con la misma dieta el día del experimento no mostraron el aumento en las concentraciones de su ARNm específico durante el ayuno, quizá porque el exceso de aminoácidos fue oxidado y así evitó la formación de glucosa endógena. Las concentraciones de ARNm de albúmina tuvieron algunas fluctuaciones, sin embargo en las últimas 12 horas del día experimental no mostraron cambio.

I N T R O D U C C I O N .

INTRODUCCION

GENERALIDADES.

El metabolismo es el proceso fisiológico principal de los seres vivos. La degradación o formación de compuestos orgánicos en el interior de las células tiene lugar siguiendo una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. En estas reacciones, un compuesto dado es convertido por medio de varios pasos intermediarios en un producto final. El conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales la célula controla todas las funciones enzimáticas es un reto muy grande en el estudio del metabolismo.

La regulación metabólica es un término utilizado para describir el control del uso de vías energéticas o del metabolismo intermedio. Esta regulación es afectada por agentes del medio extracelular que regulan el flujo de intermediarios a través de vías específicas. Estos agentes influyen en la cinética de enzimas claves en el metabolismo, así como en los mecanismos que controlan las concentraciones de dichas enzimas (síntesis y degradación).

Para la identificación de enzimas reguladoras y la determinación de su papel en una vía metabólica se utilizan

métodos tradicionales como por ejemplo, las mediciones de sustratos e intermediarios marcados isotópicamente (3), mediciones de las concentraciones de sustratos y productos, y mediante el uso de efectores alostéricos de la enzima reguladora e inhibidores enzimáticos específicos, así como el análisis de las propiedades cinéticas de la enzima purificada. Todos estos estudios han conducido a un adelanto significativo en el entendimiento de muchos fenómenos regulatorios.

Durante el desarrollo de un organismo, una gran variedad de diferentes tipos de células se forma a partir del huevo fertilizado. Cada una de ellas posee un grupo de características enzimáticas que determinan sus particularidades estructurales y fisiológicas. La formación de las enzimas que son tejido-específico se llama "diferenciación enzimática" (4, 5).

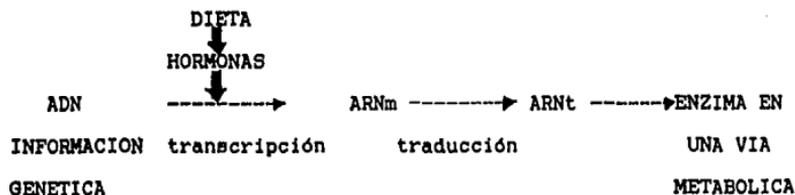
Cada célula somática de un organismo posee el mismo grupo de genes. Sin embargo, no toda la información codificable es accesible a la transcripción. Aparentemente, en la diferenciación enzimática, el control de la transcripción requiere un preciso orden espacial y temporal para la formación de los ARNm's específicos para cada tipo celular y estado fisiológico (2).

La dieta, las hormonas y los metabolitos pueden cambiar el metabolismo, alterando directamente la actividad de la enzima,

su degradación o su síntesis, o bien modificando la expresión de su gen codificador (1).

Toda enzima es codificada por un gen, el cual se transcribe a ARN, sufre un proceso de maduración para convertirse a ARNm y finalmente se traduce a proteína. La síntesis de proteína puede elevarse si se incrementa la concentración de ARNm en el citoplasma, ya sea porque el nivel de transcripción está aumentado y/o la degradación está disminuida.

FIGURA No.1 INTERACCION ENTRE LA DIETA, LAS HORMONAS, LA EXPRESION GENETICA Y LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.



El uso de técnicas de ADN recombinante permite estudiar los mecanismos de inducción enzimática e identificar el o los niveles

en los cuales se lleva a cabo su regulación, como por ejemplo, los mecanismos por los cuales algunas hormonas o nutrimentos actúan alterando los niveles de ARNm de las enzimas reguladoras.

Los puntos de control de la regulación de la expresión de un gen son muy diversos, y pueden incluir, entre otros, el proceso de la transcripción, la maduración del ARNm, el transporte del mensaje del núcleo hacia el citoplasma, la estabilidad del ARNm, la traducción de los ARNm's, etc.

La regulación de los niveles de los ARNm's específicos en respuesta a alteraciones del medio extracelular tales como las de origen dietético y hormonal, parecen ser un punto muy importante en la homeostasis del metabolismo.

CAPITULO I

ANTECEDENTES .

A N T E C E D E N T E S

A) FISILOGIA DEL HIGADO.

De manera general, una vez que los nutrimentos son absorbidos del tracto gastrointestinal, la mayor parte de ellos llegan directamente al hígado, que es el principal centro de distribución de éstos en el metabolismo de los mamíferos.

Tal vez el hígado sea el órgano que muestra una mayor flexibilidad metabólica, puesto que es el primero en recibir los nutrimentos del intestino y tiene que ajustar sus actividades metabólicas a la composición variable de la mezcla de nutrimentos y a la entrada discontinua o intermitente de ellos. El hígado funciona en el tratamiento y distribución de los nutrimentos recibidos, así como en el mantenimiento de su concentración constante en la sangre sistémica (7).

B) METABOLISMO DE AMINOACIDOS.

Las funciones más importantes del hígado en cuanto al metabolismo de aminoácidos son la síntesis de algunos aminoácidos, la desaminación de éstos, y la interconversión de los diferentes aminoácidos, además de participar en la formación de urea para suprimir la de amonía de los líquidos corporales.

colaborando así en la regulación del pH al mantener el balance ácido-base.

Los aminoácidos son la base de la formación de las proteínas tisulares y también son precursores de muchas moléculas nitrogenadas de importancia fisiológica, como los ácidos nucleicos, neurotransmisores como serotonina y norepinefrina; y hormonas como tiroxina y epinefrina.

No todos los aminoácidos de las proteínas de la dieta pueden ser sintetizados por los mamíferos, por lo que un abastecimiento continuo de estos aminoácidos se requiere para el crecimiento en organismos jóvenes, o para el embarazo, la lactancia, y para el mantenimiento en los organismos adultos (9). La carencia de alguno de ellos por sólo algunas horas da como resultado fallas en el crecimiento en infantes y pérdida de las proteínas tisulares en el adulto.

Utilización de aminoácidos.

Los factores biológicos que influyen en la utilización de aminoácidos, pueden ser de dos tipos: los relacionados con los aspectos nutricionales y los asociados a factores metabólicos.

Aspectos nutricionales.

En cuanto al punto de vista nutricional, el mayor interés es el que concierne a factores dietarios que influyen en la eficiencia de la utilización de aminoácidos para la síntesis proteica.

Se ha prestado mucha atención a todos los estudios realizados en los últimos años sobre nutrición proteica, particularmente sobre la eficiencia de utilización de una proteína: que es la proporción del N₂ ingerido o absorbido que es retenido en el cuerpo. La eficiencia de utilización se ha aceptado como una medida de la proporción de los aminoácidos dietarios que son utilizados para síntesis de proteínas tisulares y síntesis de otros compuestos nitrogenados importantes.

Los principales factores biológicos que influyen en la utilización de aminoácidos son las cantidades relativas de aminoácidos en la dieta y la cantidad total de aminoácido consumido.

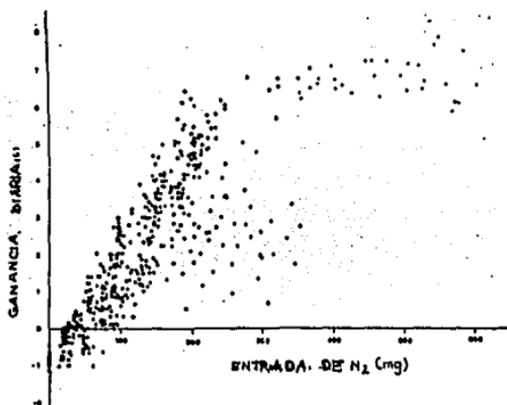
La influencia de estos dos factores es determinada por los requerimientos de aminoácidos (cantidad mínima de aminoácidos que pueden ser ingeridos para mantener la máxima velocidad de crecimiento en el organismo joven o para prevenir la pérdida de

N₂ en el organismo adulto).

Los requerimientos alimenticios pueden ser una medida de la cantidad mínima de aminoácidos requerida para la máxima velocidad de síntesis de proteínas tisulares, junto con la máxima cantidad de aminoácidos que es permisiblemente oxidados bajo estas condiciones (10). La eficiencia de retención de nitrógeno puede bajar si la cantidad o el patrón de aminoácidos consumida no es el adecuado para satisfacer los requerimientos.

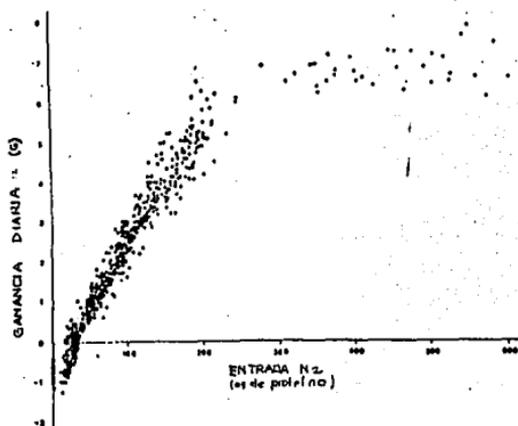
Las figuras No. 2 y No.3 ilustran los efectos tanto del patrón de aminoácidos como la eficiencia de utilización de proteínas para el crecimiento en ratas alimentadas con diferentes cantidades de una variedad de proteínas o mezclas de proteínas que difieren considerablemente en su patrón de aminoácidos.

FIGURA No. 2 GANANCIA DE PESO DE RATAS ALIMENTADAS CON NIVELES GRADUALES DE PROTEINA.



Ganancia de peso de ratas alimentadas con niveles graduales de proteína a partir de una variedad de alimentos. (Tomada de Uribe-Peralto., Ph.D Thesis, Universidad de Wisconsin).

FIGURA No.3 GANANCIA DE PESO CONTRA INGESTA DE N₂ .



Ganancia de peso de ratas a partir de la gráfica anterior como una función de la ingesta balanceada de proteína; estimada usando un patrón de aminoácidos. (Tomada de Uribe-Peralto, Ph. D. Thesis, Universidad de Wisconsin.)

En la figura No.2 se muestra el requerimiento de una cantidad específica de proteínas para mantener un intervalo particular de crecimiento.

En cambio, cuando se traza la gráfica que muestra el intervalo de crecimiento únicamente alrededor de la porción balanceada de aminoácidos en la dieta, el dispersamiento es menor indicando que los aminoácidos presentes en exceso del requerimiento en las dietas son utilizados únicamente como fuentes de energía.(Figura No.3)

Se han hecho mediciones de eficiencia de utilización de a.a. empleando dietas que contienen incrementos graduales en la proteína. El balance de nitrógeno retenido por aumento de la ingestión de proteína, disminuye a medida que esta se aproxima al nivel normal (11,12).

Los dos principales factores biológicos que influyen en la utilización de aminoácidos son, la cantidad de aminoácidos consumidos, y la proporción de los diferentes aminoácidos. Estos factores determinan que cantidad de los aminoácidos consumidos puede ser utilizada para la síntesis de proteína y cuánta para oxidación como fuente de energía.

Resultados de una serie de estudios en humanos, indican que cuando la entrada de energía en adultos se encuentra en un intervalo de $\pm 15\%$ del requerimiento, la retención de N_2 disminuye entre 1-2 mg por cada Kcal que se restringe cuando la ingesta de energía está severamente disminuída (hasta el 40%), la retención de N_2 baja cerca de 6 mg por cada Kcal restringida.

Cuando el déficit calórico es más severo se aumenta la utilización de aminoácidos para el abastecimiento energético. Como los sujetos de estos estudios probablemente no fueron depletados en grasa, una proporción sustancial de su energía se tomó de las reservas corporales, por lo que la utilización de proteínas otorga una menor porción del requerimiento total de energía. Es bien conocido que durante inanición, la proteína se conserva mientras los niveles o reservas de grasas se ven disminuídos. Estudios en animales muestran que algunos aminoácidos son canalizados hacia la síntesis de proteína de la misma forma que cuando existe una severa restricción de entrada de energía (13).

Aspectos metabólicos.

Respecto al punto de vista metabólico, el mayor interés se centra en aquellos factores que regulan el metabolismo de aminoácidos, particularmente su catabolismo, y la síntesis de

proteínas, así como las interacciones entre ambos procesos. (14)

La importancia relativa de los diferentes sistemas regulatorios depende en última instancia del estado nutricional del organismo, el cual determina la cantidad de aminoácidos utilizados como fuente de energía y la probabilidad de efectos adversos a partir de la acumulación de aminoácidos en líquidos corporales (15,16).

La sobrevivencia de un organismo bajo diferentes condiciones nutricionales y fisiológicas depende entre otros factores, de la regulación de la concentración y utilización de aminoácidos (17).

Quando la ingestión de proteína no es excesiva y el abastecimiento de energía es el adecuado (Kcal), la necesidad primordial es asegurar que los aminoácidos van a ser utilizados preferencialmente para síntesis de proteínas tisulares, antes que comenzar a diversificarse en vías metabólicas y a ser degradados (18). Quando las proteínas o los aminoácidos son consumidos en exceso se canalizan a vías degradativas, principalmente para proveer energía y prevenir su acumulación en los fluidos corporales.

Durante períodos de inanición, o si la entrada de fuentes de energía es severamente inadecuada, la mayor necesidad del cuerpo es para abastecimiento de glucosa y energía, para así poder mantener el funcionamiento normal del sistema nervioso central. La sobrevivencia bajo dichas condiciones depende de la canalización de aminoácidos que son liberados durante el rompimiento de proteínas tisulares o de la dieta, en la vía de producción de glucosa o en las oxidativas para la obtención de energía.

La alta eficiencia de utilización de aminoácidos para la formación de tejidos cuando la ingesta es baja, la estabilidad de las concentraciones de los aminoácidos ingeridos de la dieta (proteína dietaria), en plasma y la poco común toxicidad del amonio o de efectos adversos a partir de las acumulaciones de los aminoácidos en individuos sanos que consumen elevadas cantidades de proteína, indican que la regulación de la utilización de aminoácidos está regulada rápida y efectivamente por el estado nutricional y fisiológico del organismo (19,20,21).

C) NIVELES DE REGULACION DE LA UTILIZACION DE AMINOACIDOS.

El número de mecanismos potenciales para el control de la utilización de aminoácidos en el cuerpo es limitado. Dentro de éstos se encuentran:

Absorción, reabsorción y almacenaje.

El control de la absorción de los nutrimentos representa uno de los principales sistemas regulatorios del control de los niveles de aminoácidos. La regulación del vaciamiento gástrico controla el flujo de aminoácidos para su absorción en el intestino y reduce la probabilidad de una sobrecarga de los sistemas metabólicos del organismo. Sin embargo, los aminoácidos liberados durante la digestión son casi totalmente absorbidos, incluso cuando la ingesta de a.a en animales experimentales alcanza un nivel tóxico, lo que indica que la absorción intestinal de a.a. no es un sitio de regulación (22,23). La excreción renal como en el caso de la absorción intestinal, es básicamente un proceso unidireccional en el cual prácticamente todos los aminoácidos son reabsorbidos a pesar de que existan excedentes de éstos en el organismo, por lo que tampoco es considerado como un sitio de regulación de la concentración de aminoácidos (24).

Una ingesta alta en proteína no conduce a la acumulación de proteínas en el cuerpo, como en el caso de hidratos de carbono y ácidos grasos, que se almacenan en forma de glucógeno y grasa, respectivamente. Los aminoácidos que no son utilizados

inmediatamente para síntesis de proteínas son removidos rápidamente de la circulación y degradados para proveer energía. (25,26,27).

Las proteínas tisulares son, no obstante, degradadas cuando el cuerpo es sujeto a un período de privación (28). La proteína muscular, en particular, experimenta degradación durante inanición prolongada; los aminoácidos son liberados y utilizados para mantener en estado funcional órganos críticos y para la síntesis de glucosa (29). Debido a que cada proteína lleva a cabo una función, el degradamiento de éstas no es un proceso benéfico, por lo que se puede decir que no existe un verdadero reservorio de proteínas.

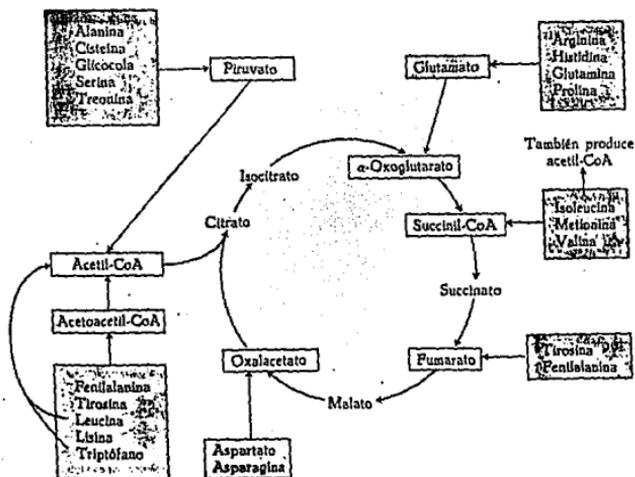
Síntesis y degradación de aminoácidos.

La regulación de la síntesis de proteínas y la degradación de aminoácidos, son los mecanismos más importantes para el control de la utilización de aminoácidos. Si estos sistemas presentan anomalías o están sobrecargados, el control de la ingesta de alimento es un mecanismo que permanece para prevenir acumulaciones de aminoácidos en los líquidos corporales que sean tóxicos (30).

Para la degradación oxidativa de los 20 diferentes aminoácidos que se encuentran en las proteínas, existe casi una vía degradativa para cada aminoácido en los vertebrados. Todas estas secuencias convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen a la formación de piruvato, acetyl CoA o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los esqueletos carbonados de 11 de los aminoácidos producen en último término ya sea directamente o por la vía del piruvato, acetyl CoA, otros 5 se convierten en α -oxoglutarato, 3 rinden succinyl CoA y 2 producen oxalacetato (31). (Figura No.4)

FIGURA No. 4

RUTAS DE ENTRADA DE LOS ESQUELETOS CARBONADOS DE LOS AMINOACIDOS EN EL CICLO DEL ACIDO TRICARBOXILICO.



Una porción del esqueleto carbonado de fenilalanina y tirosina, se degrada a través de su incorporación al ciclo de los ácidos tricarboxílicos como acetil CoA y la otra como fumarato.

Quando los aminoácidos son degradados, uno de los productos finales de su catabolismo es el ion amonio NH_4^+ , el cual es tóxico. Altas concentraciones de muchos de los aminoácidos conducen a efectos adversos y a toxicidad (32), por lo que el nitrógeno que ellos contienen se convierte en urea y se excreta a través de la orina; los α -cetoácidos formados por las reacciones de transaminación pueden ser utilizados para síntesis de glucosa o ácidos grasos, o pueden ser oxidados directamente.

El catabolismo de los aminoácidos tiene lugar principalmente en el hígado, aunque el riñón también participa activamente (33). Esta degradación es controlada por varios factores: al aumentar la cantidad de aminoácidos que entran al hígado provenientes de la sangre portal en el posprandio, opera un mecanismo a corto plazo que produce un incremento en la oxidación de éstos para mantener su concentración constante en los tejidos y en la sangre (34); por otro lado existe un mecanismo a largo plazo por medio del cual se produce una inducción de las enzimas degradadoras de aminoácidos si las concentraciones de éstos son muy elevadas.

Se ha observado que en ratas alimentadas con una dieta con un desequilibrio en su concentración de histidina, la velocidad de crecimiento de éstas se vió aumentada en proporción directa con el aumento en la concentración de histidina hasta alcanzar el requerimiento de este aminoácido (34). Cuando la

ingestión de histidina es baja, la velocidad de crecimiento también lo es, y menos del 10% de la histidina que es consumida es oxidada como ocurre cuando la dieta no es carente en ningún a.a. indispensable. Por otro lado, cuando la ingestión de histidina excede la cantidad necesaria requerida para síntesis proteica, las concentraciones de ésta en sangre y tejidos aumenta, así como su velocidad de oxidación.

Resultados similares se han obtenido con los aminoácidos triptofano (35), lisina (36), treonina (37). Estas observaciones indican que los aminoácidos son utilizados eficientemente y como fuente de energía cuando la ingesta de éstos es alta y da evidencia de que el exceso de a.a. no se conserva en el organismo.

Regulación a nivel enzimático.

Se han identificado diversos sistemas regulatorios para el control de enzimas del metabolismo de a.a. El control metabólico se considera que depende principalmente de la concentración de sustrato y de su relación con las constantes de Michaelis-Menten (K_m) de las enzimas para los pasos limitantes de la síntesis de proteínas y de la degradación de a.a. (38); También la concentración intracelular de sustrato, en este caso, de aminoácidos, depende de las características cinéticas de su transporte a través de la membrana plasmática (39).

Las enzimas o los transportadores pueden regularse de manera constitutiva o adaptativa. Cuando es constitutivamente, la velocidad del proceso que catalizan depende entonces de las concentraciones de los sustratos que entran en las reacciones. Cuando la regulación es adaptativa, la cantidad del catalizador (enzima o acarreador) puede aumentar en respuesta a un cambio en la demanda metabólica. y por lo tanto, la capacidad del sistema puede entonces alterarse (40).

Con respecto al control del metabolismo de a.a existe tanto regulación constitutiva como adaptativa, lo que da dos características importantes de sus sistemas enzimáticos o de transporte. Primero, la velocidad de una reacción enzimática se aumenta a medida que se eleva la concentración de sustrato. En segundo lugar, la velocidad de una reacción enzimática también aumenta directamente en proporción a la cantidad de la enzima. La concentración de sustrato requerido para la mitad de la velocidad máxima (K_m) es diferente para cada enzima.

La comparación de los valores de K_m para diferentes enzimas del metabolismo de aminoácidos provee una guía de las velocidades relativas que podrían ser esperadas con una concentración dada de a.a. Si la concentración de sustrato es baja, por debajo del valor de K_m , la velocidad de reacción será también baja. Si la concentración de sustrato es alta, por arriba del valor de K_m ,

entonces la velocidad de la reacción podrá alcanzar el máximo.

Las reacciones catabólicas alcanzan sus velocidades máximas, si las concentraciones de a.a. en hígado se elevan por arriba de los valores normales, como por ejemplo, durante la absorción de los aminoácidos de una comida alta en proteínas.

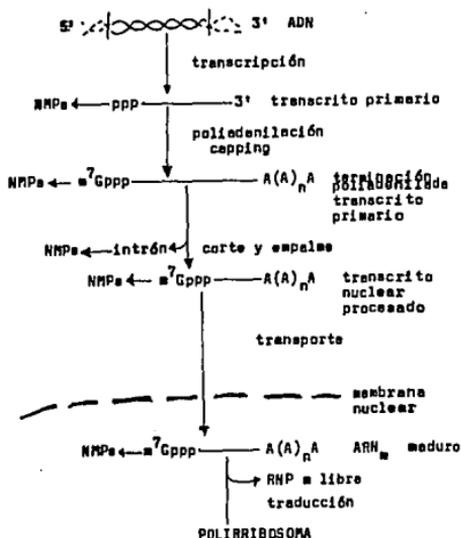
La utilización de aminoácidos preferencialmente se dirige hacia la síntesis de proteínas. Las Km de las enzimas que regulan la activación de aminoácidos para la síntesis de proteínas, las aminoacil ARNt sintetetasas tienen valores de Km de 1/10 o menos de la concentración normal de a.a. libres en hígado, mientras que las enzimas degradadoras de aminoácidos tienen constantes de Michaelis varias veces mayores de las concentraciones de los aminoácidos libres en hígado, lo que asegura que los a.a puedan ser canalizados preferencialmente hacia la síntesis de proteínas cuando la ingesta de éstos es baja (41).

De esta manera, los factores que alteran ya sea las concentraciones de aminoácidos en el organismo, las cantidades de las enzimas degradadoras de los mismos en los tejidos o el transporte de a.a. hacia el interior de la célula influirán en la utilización de aminoácidos.

Regulación a nivel génico.

Se sabe que algunos genes de las células eucarióticas superiores pueden responder a condiciones nutricionales (42). La expresión de una proteína se inicia con la transcripción a partir de ADN y continúa con la elongación del transcrito naciente, seguido de la terminación hacia abajo del extremo 3'. La secuencia AAUAAA, localizada hacia arriba del sitio de terminación en el ARN, dirige la ruptura y poliadenilación. El extremo 5' del transcrito está cubierto con un residuo 7-metil guanilato en un enlace poco común 5'-5' trifosfato. El transcrito primario de un gen típico eucariote contiene secuencias de intrones que no aparecen en el ARNm maduro debido a que ellos son removidos en una o más reacciones de corte y empalme. El ARNm maduro es transportado del núcleo hacia al citoplasma. La velocidad de transporte del núcleo y la degradación en el citoplasma también influyen en los niveles de ARNm's específicos presentes (43), a partir de los cuales se va a sintetizar una proteína (Figura No.5).

FIGURA No.5 VIA PARA LA EXPRESION GENETICA.



Esquema general para el proceso de transcripción, transporte y productos intermediarios y finales en la síntesis del ARNm.

Los niveles de enzima del metabolismo pueden estar modificados como consecuencia de un cambio de los niveles de ARNm en el citoplasma debido a un aumento en la velocidad de transcripción o a una disminución en la velocidad de degradación del ARNm (44).

D) FACTORES QUE INFLUYEN LA UTILIZACION DE AMINOACIDOS.

Algunas hormonas, pueden regular la expresión de genes de algunas enzimas metabólicas. La insulina, glucagon y triyodotironina (T3) están involucrados en la mediación de los efectos de la dieta sobre las vías metabólicas, así como los factores que afectan la liberación de estas hormonas también influyen en la utilización de aminoácidos. La ingestión de alimentos, particularmente aquellos altos en hidratos de carbono, estimulan la liberación de insulina. La insulina a su vez, estimula la entrada de a.a., particularmente al músculo y también la incorporación de éstos en proteínas (45). La secreción de glucagon se estimula por inanición y se inhibe por la alimentación (dieta alta en hidratos de carbono). La triyodotironina circulante se aumenta por alimentación y se disminuye por inanición (46).

La dieta también influye en la síntesis de proteínas de otra forma. La formación de polirribosomas (que constan de una cadena

de ribosomas unidas al ARNm) dependen de un continuo abastecimiento de aminoácidos. Durante inanición los polisomas se disgregan y la velocidad de síntesis proteica disminuye. La alimentación con una mezcla completa de a.a. resulta en la agregación de los ribosomas y restaura la velocidad en la síntesis proteica (47). Jefferson y Korner (48) y más recientemente Flaim (49) examinaron este fenómeno en hígados perfundidos. Ellos concluyeron que bajas concentraciones de a.a. disminuyen la concentración de ARNm necesario para la formación de polisomas, sin embargo vieron que la disminución en la síntesis proteica se debía a un decremento de un componente requerido para la iniciación de la formación de la cadena polipeptídica y recientemente se ha descrito una disminución del factor de iniciación 2.

Por otro lado, Colombo et al (50) mostró que en ratas alimentadas con dietas con diferentes concentraciones de proteínas (8.7%, 17%, 32% y 52%) durante 15 días, los patrones de a.a. en plasma no se ven significativamente influenciados por la concentración y cantidad de a.a. en el alimento. También observaron que las actividades de las enzimas alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa y colinesterasa, aumentaron de 2 a 5 veces en animales alimentados con alto contenido proteico.

Al analizar el cerebro de animales que recibieron una dieta baja en proteína se encontró que la concentración de valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y tirosina fue mayor que en el grupo testigo y además se observó un aumento de dichos a.a. conforme aumenta también el contenido de proteína en la dieta. Las concentraciones de tirosina y triptofano en cerebro fueron inversamente proporcionales al contenido de proteína en la dieta. De manera general, los resultados muestran que a pesar de una ingestión variable de proteína, el cuerpo tiende a almacenar a.a. en límites relativamente estrechos, favoreciendo de esta manera, la homeostasis de a.a.

El transporte de a.a. juega un papel importante en la regulación de las concentraciones intracelulares de a.a. Se ha observado en ratas adaptadas a diferentes concentraciones de caseína (5%, 15% y 60%), que cuando éstas son elevadas inducen en el hígado algunos sistemas de transporte de a.a., incluyendo a los sistemas Gly, A, T, y⁺, y N, mientras que los sistemas ASC y L no observaron cambios. Los resultados indican que el transporte puede modular la utilización de Ala, Ser, Thr, Gly, Gln y Asp y en algunas condiciones el transporte puede ser el punto más importante del control del metabolismo de algunos a.a. como es el caso de Arg y Asn los cuales están presentes en bajas concentraciones en hígado. Para a.a. transportados por sistemas no concentrativos como los aminoácidos aromáticos y los de cadena

ramificada, su metabolismo celular puede también limitarse por el proceso de transporte. En conclusión durante la adaptación a una dieta alta en proteína existe aparentemente una adaptación coordinada de transporte de a.a. y su metabolismo celular. Para algunos aminoácidos la inducción de enzimas catabólicas parece ser tan grande que el transporte puede jugar un papel importante en el control de flujos metabólicos (21).

En general, las actividades de enzimas degradadoras de a.a. son bajas cuando la ingestión de proteína es baja y elevadas cuando la ingestión de proteína es alta durante un cierto período de tiempo (41,42). Estudios en ratas alimentadas con dietas con alto contenido proteico (50% o más), han mostrado que los animales dejan de comer por un cierto período, posiblemente debido a alteraciones en la competencia entre a.a. por su transporte a través de la barrera hematoencefálica, dando como consecuencia una alteración en la producción de neurotransmisores involucrados en la regulación del apetito (41). Sin embargo, después de un cierto período de adaptación, los animales son capaces de ingerir dietas con alto contenido proteico (43) debido a un aumento en la síntesis de enzimas degradadoras de a.a., lo cual ha sido confirmado en estudios recientes, en donde se ha observado una elevación de los ARNm's específicos de varias de estas enzimas, indicando un aumento transcripcional de los genes que las codifican (38).

Así, el control de la ingestión de alimento sirve como un mecanismo final para prevenir sobrecargas severas de los sistemas degradadores de a.a. en el cuerpo. Mientras el organismo se adapta a una ingesta alta en proteína, durante este período de adaptación las enzimas degradadoras de a.a. son inducidas; subsecuentemente, el organismo funciona bien y es capaz de compensar una excesiva carga de a.a. de los fluidos corporales sin llegar a niveles tóxicos de NH^+ , ni acumulaciones de a.a.

Las enzimas del catabolismo de aminoácidos poseen la propiedad de disminuir la oxidación cuando la entrada de éstos es inadecuada, pero de estimularla rápidamente cuando la entrada excede a la requerida para la síntesis proteica. Las respuestas adaptativas que aumentan las enzimas degradadoras de a.a. y disminuyen la ingesta de alimento, ocurren si la ingestión de a.a. es tan alta, que la capacidad para degradar aminoácidos se excede.

Los cambios en las concentraciones de aminoácidos en los líquidos corporales, como resultado de cambios, ya sea en la cantidad o calidad de la mezcla de a.a. provistos por la dieta, o por causa del deterioro o limitaciones de las enzimas degradadoras de éstos, pueden alterar el abastecimiento de a.a. al cerebro y de ahí su utilización para la formación de neurotransmisores. Todo en conjunto aumenta la posibilidad de que

la proteína proveniente de la dieta y las modificaciones en las concentraciones de los aminoácidos puedan conducir a cambios en el funcionamiento del organismo, como en el caso de algunas patologías del metabolismo de los aminoácidos.

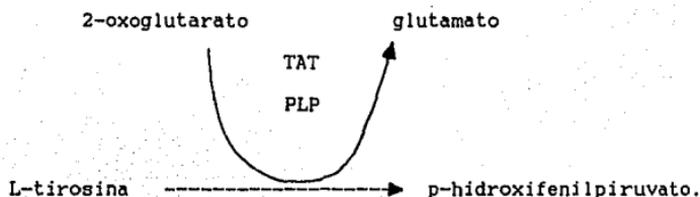
E) ENZIMAS.

ENZIMAS DEL CATABOLISMO DE AMINOACIDOS.

Tirosina aminotransferasa (TAT E.C.2.6.1.5).

La TAT (L-tirosina:2 oxoglutarato aminotransferasa), enzima clave en el catabolismo de la tirosina, cataliza la reacción en la que el grupo amino de la tirosina, es transferido al átomo de carbono de su α -oxoácido, que es la primera reacción en la vía en la cual la tirosina se degrada formando finalmente fumarato y acetato. Esta enzima previene la acumulación de niveles tóxicos de tirosina en las células y también provee sustratos gluconeogénicos y cetogénicos (51).

FIGURA No.6. Reacción que cataliza:



Esta enzima cataliza una reacción de transaminación, permitiendo la intersección entre las vías metabólicas de aminoácidos y de ácidos dicarboxílicos.

La TAT es un dímero de 53.000 daltones, se encuentra principalmente en hígado. Sin embargo, estudios realizados por Kenney et al (54) demostraron al purificar a la enzima que hay cuatro picos separados en columna de hidroxapatita de citosol hepático crudo, lo que indica la existencia de cuatro formas de la enzima: la forma I se encuentra en riñón, corazón, cerebro y otros tejidos, mientras que las formas II, III y IV parecen ser únicas en hígado (53). La TAT tiene un coeficiente de sedimentación de 5.9S y un punto isoeléctrico de 5.6. Aunque sus diversas formas difieren en su cinética y características fisicoquímicas.

Se ha observado que la actividad de la .tirosina aminotransferasa se regula únicamente a través de cambios en la velocidad de su síntesis o degradación; no existen evidencias que consideren que modificaciones covalentes o efectos alostéricos contribuyen a la regulación de esta enzima (52). La expresión de la tirosina aminotransferasa está regulada por varias hormonas. se inhibe por la hormona del crecimiento y se induce por glucagon, AMPc y glucocorticoides (56).

Las hormonas glucocorticoides, como otras hormonas esteroides llevan a cabo sus principales acciones vía unión y activación a un receptor específico, el que en su momento es capaz de alterar la transcripción de ARNm's específicos.

Su inducción por glucocorticoides, reportada inicialmente por Lin y Knox en 1957 (citado por Greenwald et al 1984) fue uno de los primeros ejemplos de control hormonal de enzimas en mamíferos. La administración de glucosa reduce la actividad basal e inhibe la inducibilidad de TAT.

Se ha observado que el consumo de glucosa disminuye los niveles basales de TAT. El máximo nivel de actividad enzimática seguido de inducción por hidrocortisona también se ha encontrado disminuido por el consumo de glucosa. Además, se vió que la hidrocortisona es menos efectiva como inductor de esta enzima en animales a los que se les dió glucosa únicamente que en aquellos a los que se les dió alimento más glucosa.

El agente responsable del efecto de la glucosa es desconocido. Existen diversas posibilidades potenciales regulatorias y una de ellas podría estar mediada por la liberación de hormonas, como la hormona de crecimiento.

Un gran número de compuestos biológicos además de los esteroides se conoce que ejercen algún tipo de influencia sobre la inducción de la tirosina aminotransferasa, entre los que se encuentran la insulina, la concanavalina A, AMPc, interferón, glucagon, la hormona del crecimiento, piridoxina, norepinefrina, nicotinamida y piridoxal 5 fosfato.

AMPc e inducción de TAT. El aumento en la tirosina aminotransferasa después de la aplicación de AMPc puede explicarse por un aumento en su velocidad de síntesis (60,61,62). Aunque la TAT es fosforilada (59), la enzima responsable de esto, in vivo, no parece ser una cinasa dependiente de AMPc (63) y la fosforilación aparentemente no altera la actividad catalítica de TAT.

Snoeck et al (63) sugieren que el AMPc aumenta la velocidad de iniciación de la traducción del ARNm de TAT. De esta forma, el AMPc y los glucocorticoides aumentan la producción del ARNm de TAT, pero cada uno por medios diferentes ya que sus efectos son sinérgicos (64,65).

Efecto de la insulina en el ARNm de TAT. La insulina afecta la actividad de TAT de dos maneras: en el hígado y en células H411E la insulina aumenta la síntesis de TAT (66.67), mientras que en células HTC aumenta la actividad de TAT por estabilización de la proteína y por lo tanto, disminuyendo su degradación. Dichos estudios han concluido que la insulina, de manera principal conduce a un aumento en la velocidad de traducción del ARNm hepático.

Inducción de TAT por Actinomicina D. De manera análoga a los ejemplos citados, se ha observado que la actinomicina D dada en pequeñas dosis a ratas, bloquea la inducción de TAT inducida por la hidrocortisona. Y administrada en grandes dosis, muestra un aumento adicional en la actividad, que no se observa cuando se da la hormona únicamente.

La actinomicina D afecta la degradación de TAT. Cabe mencionar además que en presencia de otros antibióticos se observa un aumento del ARNm de TAT. La cicloheximida y otros inhibidores de la síntesis proteica como la puromicina y emetina aumentan la actividad de TAT en hígado de forma análoga al efecto que causan los glucocorticoides o los nucleótidos cíclicos.

Así como estos factores desempeñan un papel importante en la regulación de esta enzima, hay otro que quizá es uno de los más importantes y es del que menos se ha estudiado, la dieta.

Previos reportes indican la importancia del nivel de la proteína dietaria en la regulación del nivel de varias enzimas hepáticas en la rata (68,69,70,71,72).

Para estudiar la relación entre la dieta y las funciones hormonales Potter et al (69) desarrollaron el concepto de cambios sistemáticos adaptativos en términos de un acceso limitado a la comida bajo condiciones de luz controladas, y encontraron una aparente oscilación en la actividad de TAT a niveles intensificados en ratas adaptadas a regimenes "8+16" o a "8+40" comparadas con ratas alimentadas ad libitum.

Los datos reportados muestran que en ratas adaptadas al regimen "8+16" con dietas al 12, 30 y 60% de proteína, la TAT aumenta a un nivel máximo 6 horas después del inicio de la ingestión de comida, más tarde disminuyen gradualmente; los niveles máximos de la actividad enzimática se observaron en proporción al aumento del contenido proteico de la dieta. Además al cambiar la dieta del 12% a una de 60% de proteína el día del sacrificio o al adrenalectomizarlas, la actividad de TAT mostró los mismos patrones oscilatorios que la de ratas adaptadas a una dieta con 60% de proteína. Dieciseis horas después de que las ratas comieron, se vió un segundo aumento en la actividad en el hígado de aquellas adaptadas al regimen "8+40", así como tambien se observó un nivel mayor de corticoesterona plasmática, una menor deposición de glucógeno hepático y el aumento en los niveles de tirosina aminotransferasa dependen del estado adrenal.

Unicamente TAT exhibe una oscilación en su nivel de actividad (75,76) con una periodicidad de 24 horas en la que el valor máximo de la actividad ocurre aproximadamente seis horas después de comenzar la fase de obscuridad del ciclo luz-obscuridad. Las ratas que comen ad libitum, lo hacen justamente al comenzar la fase de obscuridad (77) y comen aproximadamente el 80% de su ingesta total durante esta fase (78).

En todas las condiciones anteriores la resolución de las contribuciones hormonales y nutricionales permanecen incompletas y ambas, pueden afectar simultáneamente la activación, inactivación, inhibición, síntesis o degradación de la TAT (79). La actividad de TAT permanece oscilante aún en ausencia de las adrenales, páncreas, las glándulas tiroideas y la pituitaria.

Estudios realizados en ratas adrenalectomizadas y en controles a las que se les cambió de una dieta con contenido proteico de 12% a 60%, y se les midió la actividad de TAT, mostraron que la actividad de esta enzima aumenta significativamente por 6 horas después de cambiar a una dieta con alto contenido proteico y oscila diariamente. No se observó diferencia en los niveles de actividad de la TAT entre los dos grupos de ratas, y sólo hasta 6 días después del cambio de dieta, el nivel máximo de actividad de TAT llegó a ser ligeramente menor en el grupo de ratas adrenalectomizadas. La participación de las

glándulas adrenales en la adaptación inicial de esta enzima a una dieta al 60% de proteína parece ser mínima. Sin embargo la presencia de las adrenales es necesaria para mantener los niveles de otras enzimas para una adaptación a dietas con alto contenido proteico (80).

Cambios en la actividad enzimática como resultado de cambios en la velocidad de síntesis y degradación de la enzima (proteína) en el hígado de rata, ocurre en un ciclo de 24 horas como consecuencia de los hábitos alimenticios, de los cambios en la composición dietaria y del estado hormonal en la rata (80).

Ontogenia de la enzima. La actividad de TAT aumenta rápidamente después del nacimiento de una forma completamente análoga a la inducción en las ratas adultas, y su aumento natural es también dependiente de la presencia de hormonas adrenales.

La actividad de TAT en la vida fetal es baja, y representa entre el 10% y el 20% de la actividad en el hígado de ratas adultas; la actividad de la TAT inmediata al nacimiento es muy baja (1 hora después); una hora después la actividad de tirosina aminotransferasa aumenta marcadamente y alcanza su máximo nivel en el hígado de las ratas 12 horas después del nacimiento, el cual es cercano al doble de la actividad de las ratas adultas. En las subsiguientes 36 horas, la actividad disminuye gradualmente, y

finalmente en el segundo día después del nacimiento se alcanza la actividad presente en las ratas adultas. Parece ser que la liberación de los esteroides adrenales se relaciona con el marcado aumento en la actividad después del nacimiento, lo cual parece indicar que el gen de TAT es mucho menos activo que en la rata adulta.

Ritmo diurno de TAT. La actividad de la TAT cambia durante la maduración del hepatocito (81). También se han observado durante el día marcadas variaciones en la actividad de la enzimas con respecto a la hora del día en que se mide la actividad, mostrando características del ritmo circadiano (82). El ritmo circadiano aparece a los diez días de edad de las ratas y se mantiene en las siguientes edades.

El valor máximo de actividad de TAT en el hígado de ratas de diez días de edad es a las 3:00 horas; después del destete el pico de actividad ocurre a la medianoche y permanece invariable hasta alcanzar la edad de 18 meses; después el valor máximo cambia otra vez a las 3:00 horas (83). Las variaciones en la actividad representan probablemente cambios en la síntesis enzimática (84).

Los mecanismos responsables para este ritmo circadiano no están completamente entendidos. La composición de la dieta parece

jugar un papel importante debido a que los hidratos de carbono reducen la actividad de TAT (85), mientras que las proteínas la aumentan (86). La inducción dietaria no puede, sin embargo, ser la responsable del ritmo espontáneo de TAT, ya que el ayuno por 48 horas influye sobre el nivel basal de actividad de TAT, pero el valor máximo a la medianoche se mantiene (52).

El ritmo circadiano está además acompañado por diferencias en la síntesis del ARNm durante el día. El valor máximo del ARNm es a las 19:00 horas en ratas de 12 meses y regresa a las 3:00 horas en ratas de 24 meses de edad. Por lo anterior se ve que el ritmo circadiano de la actividad de TAT es debido a diferencias en la expresión genética a través del día, lo cual además se ve influenciado por la edad (53).

Fenilalanina hidroxilasa (Fenilalanín-4 monooxigenasa)

E.C.1.14.16.1

Esta enzima es representativa de las monooxigenasas u oxigenasas de función mixta. Es la encargada de catalizar la hidroxilación de L-fenilalanina a L-tirosina (87) usando tetrahydrobiopterina como cofactor. Esta enzima es sintetizada en el hígado y existen una gran variedad de síndromes que han sido observados en el hombre debidos a la deficiencia de esta enzima. Dicha enzima está involucrada en la ruta del catabolismo de fenilalanina. Incorpora un átomo de oxígeno procedente del oxígeno molecular a la fenilalanina para dar grupo p-hidroxilo; el otro átomo de oxígeno se reduce a agua. El reductor es NADPH y la reacción es la siguiente:

FIGURA No.7 Reacción que cataliza:



PAH

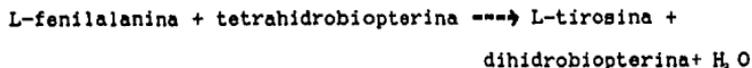
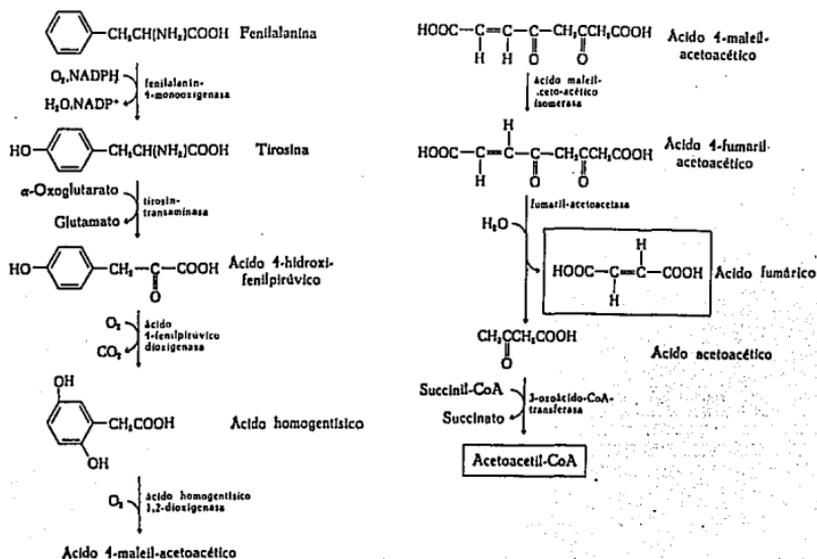


FIGURA No. 6

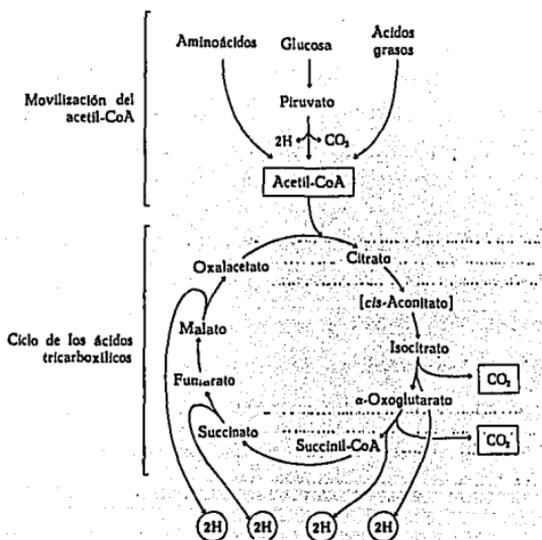
CONVERSION DE LA FENILALANINA Y DE LA TIROSINA EN LOS ACIDOS ACETOACETICO Y FUMARICO.



El donador de electrones en esta reacción es la tetrahydrobiopterina que es la forma reducida de la dihydrobiopterina, la cual a su vez funciona como coenzima en el transporte de equivalentes de reducción desde NADPH, el último donador de electrones, al aceptor electrónico, que es uno de los átomos de O_2 . Al final de la ruta degradativa de la fenilalanina y tirosina sus productos son oxidados de acuerdo a la figura No.8.

FIGURA No.9

ESQUEMA GENERAL DE LOS AMINOACIDOS EN EL CICLO DEL ACIDO TRICARBOXILICO.



La fenilalanina hidroxilasa ocupa un papel central en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos. La hidroxilación de fenilalanina representa un medio importante para producir

tirosina y es el paso limitante en el catabolismo de fenilalanina. Debido a la naturaleza limitante de la reacción de hidroxilación, la fenilalanina hidroxilasa es principalmente responsable de la regulación de las concentraciones de fenilalanina en el cuerpo y del mantenimiento de su homeostasis. La fenilalanina hidroxilasa ha sido purificada de hígado de rata, mono y humano (88.89.90.91.92), lo que ha ayudado mucho al entendimiento de su estructura y funcionamiento. La proteína humana, muestra un 96% de homología en la secuencia de aminoácidos con la correspondiente enzima en la rata.

La enzima activa tiene un peso molecular de cerca de 100.000 daltones y es un dímero que comprende dos subunidades de pesos moleculares individuales de entre 49.000-52.000 daltones. Sin embargo, se considera incierta la identidad de las subunidades, y existen evidencias de que en la rata la enzima está compuesta de dos monómeros idénticos. Se conoce que la enzima de rata es sustrato para una cinasa dependiente de AMPc; los monómeros purificados presentan ambas formas, fosforiladas y defosforiladas (93).

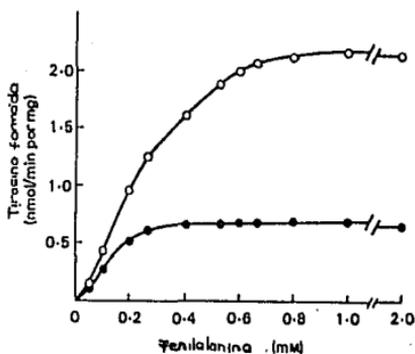
La holoenzima es una metaloproteína que contiene una mol de hierro/mol de subunidad y requiere al cofactor tetrahidrobiopterina para ser activa.

El desarrollo de técnicas de ADN recombinante han hecho capaz el estudio de la estructura primaria de la enzima y las bases moleculares para la fenilcetonuria a nivel genético. La deficiencia de esta enzima da como resultado la fenilcetonuria (PKU), un desorden autosómico recesivo con una incidencia de un caso/10,000 nacimientos caucásicos (98). Análisis de las clonas de ADNc humano revelan que en fenilcetonúricos no se encuentra la molécula entera de su ARNm, la cual es de aproximadamente 2.5 Kb de largo.

Varios investigadores han reportado que esta enzima, que es ordinariamente limitante del catabolismo de fenilalanina (93), no está completamente activa in vivo (94,95,96).

La enzima no se induce en grandes cantidades en animales a los que se les ha dado una dieta alta en proteína pero puede ser activada in vitro por un mecanismo de fosforilación-defosforilación (94) y en una variedad de otras formas in vitro (92); puede además ser activada por sustrato (95), por hierro (96) y por un sistema sensible a Mn^{2+} . El tipo de respuesta que se observa como consecuencia de un aumento en la concentración de sustrato se muestra en la figura No.10.

FIGURA No.10 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN LA
ACTIVIDAD DE PAH.



Efecto de la concentración de sustrato en la actividad de la fenilalanina hidroxilasa en extracto crudo de hígado antes y después de la activación; círculos cerrados antes de la activación; círculos abiertos después de la activación. (Gráfica tomada de Hasegawa y Kauffman, 1982).

El significado fisiológico de los diferentes sistemas de activación aún no se ha establecido pero, a partir de las observaciones en la activación de la fenilalanina hidroxilasa por tratamiento con glucagon en ratas, el mecanismo de fosforilación-defosforilación dependiente de AMPc, está evidentemente involucrado en la regulación de fenilalanina in vivo (97).

La activación alostérica de la fenilalanina hidroxilasa purificada, por concentraciones de fenilalanina por debajo de 0.1mM (98) puede ser un mecanismo funcional in vivo.

La velocidad del catabolismo de fenilalanina aumenta en respuesta a un aumento de la concentración de sustrato por arriba de 1.0-2.0 mM de fenilalanina, ya que el valor de Km de la enzima para este a.a. es del orden de 0.2-0.3 mM. Hasegawa y Kaufmann(97) han reportado que los efectos combinados de fosforilación y del proceso de activación sensible a Mn^{2+} dan como resultado un aumento de casi 20 veces la actividad de la fenilalanina hidroxilasa en preparaciones de la enzima cruda. La respuesta rápida para normalizar los niveles de fenilalanina en ratas alimentadas con una carga de fenilalanina se puede explicar por la activación de la enzima por un gran número de sistemas de regulación in vivo.

Fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK E.C.4.1.1.3.2.)

Debido a la fuerte naturaleza exergónica de la glucólisis, la formación de hidratos de carbono a partir de lactato y piruvato no procede por la vía reversa de la ruta de Embden-Meyerhof-Cori(99): La energía adicional para la síntesis de glucógeno puede ser abastecida por tres pasos separados: por hidrólisis de un enlace azúcar-fosfato en el paso de fructosa difosfato a fructosa 6-fosfato, por la utilización de uridina trifosfato para la conversión de glucosa 1-fosfato a glucógeno, y por la formación de ácidos dicarboxílicos a partir de piruvato seguido de la utilización de guanosina trifosfato para formar fosfoenol piruvato a partir de oxalacetato. Estas reacciones claves pueden estar bajo control metabólico para su operación cíclica continua que conduce a la disipación de energía (100).

En los organismos heterótrofos, la conversión del lactato, del piruvato, de los aminoácidos y de otros precursores sencillos, primero en glucosa y después en glucógeno, constituye también una ruta fundamental.

En la mayoría de las células, la conversión de la glucosa o de la glucosa-6-fosfato en piruvato catalizada por las enzimas glucolíticas constituye la ruta central del metabolismo de los

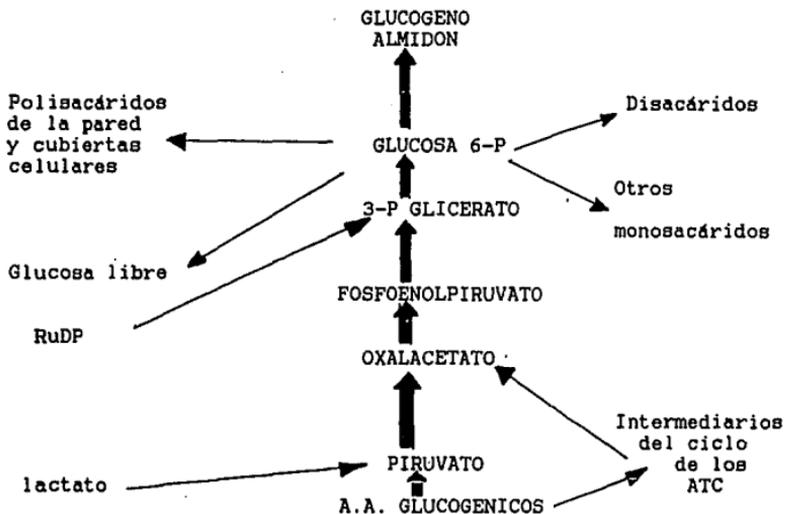
hidratos de carbono, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. De modo comparativo, el proceso inverso, o sea la transformación del piruvato en glucosa-6-fosfato es la ruta fundamental de la síntesis de los glúcidos en muchos organismos distintos.

Convergiendo sobre esa ruta central, existen otras rutas que la alimentan, que parten de precursores no glúcidos. A partir de la glucosa-6-fosfato formada por la ruta central, varias rutas biosintéticas divergentes conducen a la formación de otros monosacáridos y sus derivados, varios disacáridos, polisacáridos almacenables como combustible tales como almidón, glucógeno y componentes de las paredes y cubiertas celulares como la celulosa, xilanos y los peptidoglucanos.

Ver figura No.11

FIGURA No.11

RUTA CENTRAL DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.



La mayoría de los pasos de la ruta central que conduce desde el piruvato a la glucosa 6P, son catalizados por enzimas de la secuencia glucolítica, y por tanto, proceden por etapas inversas a las empleadas en la glucólisis. No obstante, en la ruta glucolítica hay dos etapas irreversibles que no pueden ser utilizadas en la conversión de piruvato a glucosa. En la dirección de la biosíntesis estas etapas son alcanzadas mediante

un "rodeo" de reacciones alternativas que son termodinámicamente favorables y en el sentido de la síntesis.

La conversión de piruvato en fosfoenlpiruvato es el primer paso de rodeo. Durante la gluconeogénesis, la fosforilación del piruvato se logra por una ruta alternativa mediante una secuencia de reacciones de rodeo que requiere la cooperación de enzimas tanto del citosol como de los compartimentos mitocondriales. Esta etapa es catalizada por la piruvato carboxilasa de las mitocondrias, la cual cataliza la primera reacción anaplerótica por la que se generan productos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, y es una reacción irreversible. El oxalacetato formado producto de esta reacción mitocondrial es reducido a malato a expensas del NADH. El malato así formado puede entonces abandonar la mitocondria. En el citosol, el malato es reoxidado por la forma citoplasmática de la malato deshidrogenasa ligada al NAD⁺, formando oxalacetato extramitocondrial.

En la última etapa del rodeo, la fosfoenlpiruvato carboxicinasa (GTP o PEPCK) actúa sobre el oxalacetato formando fosfoenlpiruvato y CO₂, según una reacción en donde el GTP actúa como donador de fosfato:

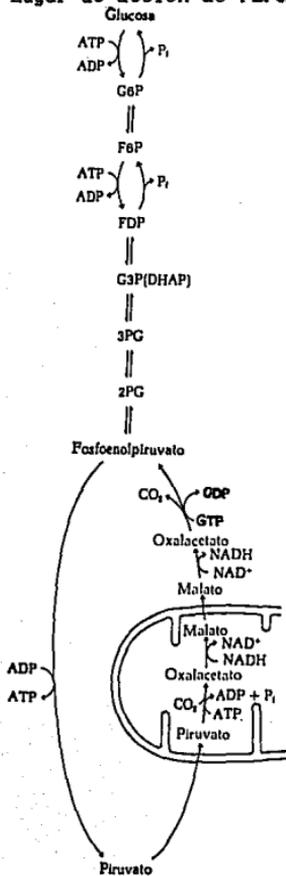


Esta enzima debido a su poca afinidad por CO_2 , es biológicamente activa sólo en la dirección de la formación de fosfoenolpiruvato (101).

FIGURA No.12

GLUCONEOGENESIS.

Lugar de acción de PEPCK



El gen de PEPCK tiene una copia en el genoma y codifica para un ARNm que contiene 2624 bases (102); la adición de cerca de 200 residuos de adenina al extremo 3' da un ARNm de aproximadamente 2.8 Kb. El gen de PEPCK se extiende 6.0 Kb y contiene 10 exones y 9 intrones.

Esta enzima forma parte de un ciclo que es potencialmente futil involucrado en la interconversión de piruvato y fosfoenolpiruvato y juega un papel central en la regulación de la síntesis de glucosa.

La insulina y glucagon tienen efectos opuestos en PEPCK. La concentración de esta enzima aumenta en animales en inanición y diabéticos, o tratados con glucagon o AMPc, y disminuida en animales que han estado en inanición y son realimentados con una dieta alta en hidratos de carbono principalmente o en animales diabéticos que han sido inyectados con insulina (103).

La dieta regula la cantidad de enzima (proteína) por control en su síntesis (104,105). La velocidad de síntesis de PEPCK y el nivel de su ARNm son altos en ratas en inanición. La realimentación con una dieta "chow" normal o la administración de glucosa por canalización al estómago ocasiona una rápida disminución tanto en la síntesis como en la abundancia del ARNm (106,107).

Si las ratas son tratadas con AMPc más glucosa, la disminución en la síntesis de la enzima se bloquea (108). Del mismo modo, si ratas en inanición son realimentadas con glucosa para reducir la síntesis enzimática y la cantidad del ARNm, la inyección de análogos de AMPc, ocasiona un rápido aumento en la velocidad de síntesis de PEPCK y del nivel de su ARNm (109,110).

Por otro lado, el glucagon imita la acción de AMPc (111) lo que sugiere que los efectos de inanición y realimentación son mediados, en parte por cambios en la concentración de glucagon. La concentración de PEPCK es muy alta en el hígado de ratas diabéticas; la terapia con insulina ocasiona que los niveles de esta enzima disminuyan y que sean comparables con los de ratas normales (112).

De esta manera, la insulina, también juega un papel en el control del nivel de esta enzima. La concentración del ARNm de PEPCK aumenta en el hígado de ratas diabéticas y disminuye por tratamiento con insulina (113). La insulina también inhibe la acumulación del ARNm de PEPCK en células de hepatoma en cultivo; esto sugiere que el efecto de insulina in vivo es directo y no vía cambios en el nivel de alguna otra hormona o factor (114,115).

La correlación entre la velocidad de síntesis de la enzima y el nivel de ARNm durante manipulaciones hormonales y dietarias

indican que la regulación de la expresión del gen de PEPCK es pretraduccional.

Los glucocorticoides y las hormonas tiroideas también conducen a un aumento en la acumulación de PEPCK en el hígado. El efecto de glucocorticoides en el animal intacto es complejo, debido a que el tratamiento con esteroides adrenales aumenta la secreción de insulina, lo que a su vez, suprime a PEPCK en el hígado (116).

Se han observado efectos estimulatorios de glucocorticoides en animales diabéticos (117), en células de hepatoma en cultivo (118,119) y en cultivos primarios de hepatocitos en rata.

Los glucocorticoides amplifican la estimulación por AMPc y esto da como resultado ya sea un efecto aditivo, como en las células Reuber H-35 (120), o un efecto sinérgico, como en cultivos de hepatocitos (121,122). La hormona tiroidea ocasiona un aumento en la acumulación de PEPCK en ratas intactas (123), y en hepatocitos en cultivo. Como los glucocorticoides, la hormona tiroidea amplifica el efecto de inanición (124) o de AMPc (125,126). Los cambios de PEPCK ocasionados por glucocorticoides y hormona tiroidea son debidos a la regulación en la abundancia del ARNm de PEPCK (127,128,129,130).

Los ADNc y genómico para esta enzima han sido clonados en

dos laboratorios (131,132,133,134) y utilizados para investigar la estructura del ARNm y de su gen, así como los mecanismos por los que las hormonas regulan la expresión del gen.

Los estados de inanición, así como el AMPc, glucocorticoides y hormona tiroidea estimulan la transcripción del gen de PEPCK (135,136), mientras que la administración de glucosa a animales intactos y la adición de insulina a células de hepatoma inhiben la transcripción (137,138,139).

La abundancia de intermediarios nucleares del ARNm de PEPCK también fueron cuantificados, utilizando análisis Northern Blot. El aumento en la transcripción da el aumento en los niveles de los intermediarios nucleares con cinéticas similares. Este resultado fue observado con estimulación con AMPc o dexametasona (140,141) e inhibición con insulina (142).

La magnitud de los cambios en la velocidad de transcripción son en general, proporcionales a la magnitud de los cambios en las concentraciones de su ARNm; así, la regulación de PEPCK por hormonas debe ser exclusivamente transcripcional.

Las secuencias cis-acting que confieren la especificidad hormonal en la regulación de la transcripción del gen de PEPCK han sido identificados en una serie de elegantes experimentos de ingeniería genética (143,144,145,146). En el primer grupo de

experimentos, 620 pb de ADN a partir del extremo 5' del gen de PEPCK (incluyendo 547 pb de la secuencia 5') fueron unidos al gen estructural para timidina cinasa de herpes simplex. Este gen quimérico fue transfectado en células FAO-2B que fueron hechas deficientes en timidina cinasa. Las células FAO-2B son derivadas de una desviación de hepatoma y expresan muchas de las características de los hepatocitos normales diferenciados. En las células que contenían el gen quimérico con la secuencia 5' flanqueante en la orientación correcta, la actividad de la timidina cinasa y las concentraciones tanto del ARNm de PEPCK endógeno y el ARNm de la timidina cinasa fueron aumentados por el AMPc (147). Estos experimentos indican que la secuencia del extremo 5' de 620 pb contiene un elemento promotor y un elemento regulatorio para AMPc. El gen quimérico contiene tanto el elemento promotor como el regulatorio del gen de PEPCK. Para identificar más precisamente las secuencias responsables para respuesta a AMPc y glucocorticoides independientes de elemento promotor de PEPCK, fueron construídos vectores los que contenían la parte estructural del gen para la timidina cinasa de Herpes Simplex unidos a su propio elemento promotor más regiones 5' distantes del gen de PEPCK.

Este nuevo grupo de genes quiméricos contenían diferentes cantidades de secuencia 5' flanqueante del gen PEPCK ligado, ya sea al extremo 5' o 3' del gen de la timidina cinasa. La secuencia requerida para la respuesta a AMPc se encontró en la

región del extremo 5' de ADN de 47pb. Una secuencia de 12 pb dentro de esta región muestra una similitud significativa con las secuencias de los 4 genes regulados por AMPc. Como muchas secuencias de elementos que regulan la velocidad de transcripción, el elemento regulatorio de AMPc de 47 pb es efectivo ya sea en orientación y a una distancia significativa del sitio de inicio de la transcripción. Dos elementos regulatorios a glucocorticoides fueron identificados, pero las secuencias que especifican la respuesta inhibitoria a insulina no se han encontrado (147,144,143).

En forma general, la actividad de esta enzima es multifactorialmente regulada; las condiciones alimenticias así como todos los demás factores antes mencionados, también afectan la actividad de esta enzima. Períodos de inanición dan como resultado una inducción de la actividad que es dependiente del sexo (147). También se han visto aumentos en la actividad después de que las ratas han consumido una dieta alta en proteína o en grasas (145). Cuando los hidratos de carbono en la alimentación son reemplazados por proteína, el hígado se fuerza a compensar la escasez de la glucosa dietaria por síntesis de novo de varios precursores. Simultáneamente procesos como la glucólisis o lipogénesis se reducen (134).

Estos cambios en el metabolismo están asociados con un aumento en la actividad de PEPCK seguido de un cambio en la

velocidad de síntesis el cual es inducido por niveles elevados de AMPc (105).

Se han llevado a cabo estudios en los que se ha visto que la alimentación con dietas altas en proteína conducen a una reacción sexo-dependiente de los niveles de PEPCK. La actividad de esta enzima no cambia en machos, mientras que es duplicada en hembras. Además en machos, la proporción molar de insulina/glucagon cambió en favor de la insulina, mientras que el cambio fue justamente el opuesto en hembras. Estas diferencias podrían ser debidas a una menor sensibilidad en los machos que en las hembras a la relativa escasez de hidratos de carbono en la dieta proteica. Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la proteína dietaria induce un aumento en la actividad de PEPCK en los machos (146) el cual está asociado con un cambio en las concentraciones de hormonas reguladoras, principalmente de altos niveles de glucagon y bajos de insulina.

En el hombre, la ingestión dietas a base de proteína conduce a una inducción de la secreción de insulina (147,144). También se ha visto que la alimentación con dietas a base de ácidos grasos aumentan la gluconeogénesis (139), y la actividad de PEPCK también se ve aumentada, lo que parece ser independiente de cambios en los niveles plasmáticos de insulina y glucagon (140).

O B J E T I V O S .

- OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la concentración de proteína dietaria sobre la expresión de los genes de las enzimas Tirosina aminotransferasa, Fenilalanina hidroxilasa y Fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

- OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Estudiar el efecto agudo de una dieta con 6% de caseína en los niveles de ARNm de las enzimas tirosina aminotransferasa (TAT), fenilalanina hidroxilasa (PAH) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK).
- 2.- Estudiar el efecto de una dieta con 18% de caseína en los niveles de ARNm de las enzimas tirosina aminotransferasa (TAT), fenilalanina hidroxilasa (PAH) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK).
- 3.- Estudiar el efecto agudo de una dieta con 50% de caseína en los niveles de ARNm de las enzimas tirosina aminotransferasa (TAT), fenilalanina hidroxilasa (PAH) y fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK).

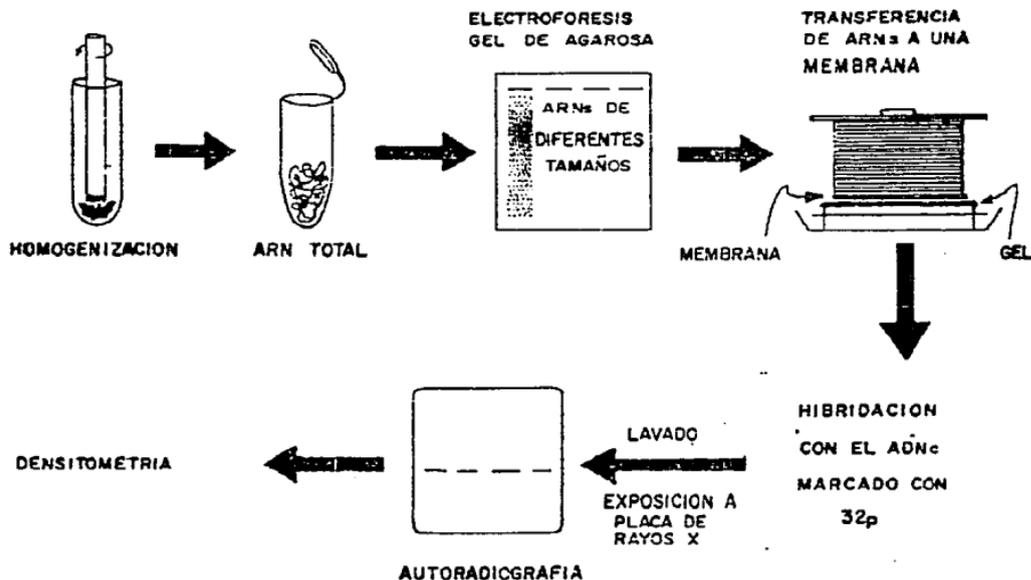
JUSTIFICACION.

La TAT y PAH son enzimas claves involucradas en el catabolismo de aminoácidos en el hígado y la PEPCK en la gluconeogénesis. Estas enzimas son reguladas por hormonas y por la dieta a nivel de su actividad enzimática. No se tiene un panorama preciso sobre el efecto de la variación de la concentración de la proteína dietaria sobre la regulación de la expresión genética de estas enzimas detectada a nivel de la concentración de su ARNm.

CAPITULO II.

MATERIALES Y METODOS.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIALES Y METODOS.

I. DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO PROTEICO.

Ratas Wistar fuerón alimentadas con diferentes dietas, variando el contenido proteico (6%, 18%, y 50% de caseína). Ver Tabla I.

Todas las ratas procedieron del bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición S.Z. Las ratas fueron pesadas diariamente así como también la cantidad de alimento ingerido, por diferencia del peso del comedero antes y despúes de comer.

I. COMPOSICION DE LAS DIETAS.

Dieta al 6 % de caseína.

CANTIDAD DE LOS COMPONENTES EN %	
CASEINA.	6.00
MEZCLA DE VITAMINAS.	0.50
ACEITE DE MAIZ.	5.00
MEZCLA MINERAL.	5.00
METIONINA.	0.20
TREONINA.	0.40
CERELOSA.	41.45
ALMIDON DE MAIZ.	41.45

Dieta al 18% de caseína.

CANTIDAD DE LOS COMPONENTES EN %	
CASEINA.	18.0
MEZCLA DE VITAMINAS.	0.5
ACEITE DE MAIZ.	5.0
MEZCLA MINERAL.	5.0
CERELOSA.	35.65
ALMIDON DE MAIZ.	35.65

NOTA: cuando la dieta es baja en proteína, tiene que suplementarse con treonina y metionina en la siguiente proporción:

0.3 % metionina aproximadamente 2.0 g / Kg de dieta.

0.4 % treonina aproximadamente 4.0 g / Kg de dieta.

Dieta al 50% de caseína.

CANTIDAD DE LOS COMPONENTES EN %.	
CASEINA.	50.0
MEZCLA DE VITAMINAS.	0.5
ACEITE DE MAIZ.	5.0
MEZCLA MINERAL.	5.0
CERELOSA.	19.75
ALMIDON DE MAIZ.	19.75

Todos los componentes empleados en las diferentes dietas son de la Compañía Teklad con excepción de la treonina y la metionina las cuales se adquirieron de Sigma.

**I.1 .- TRATAMIENTO DE LAS RATAS CON UNA DIETA AL 18% DE PROTEINA
(grupo control).**

A 18 ratas macho de la cepa Wistar de entre 70.0-80.0 g de peso corporal se les proporcionó una dieta al 18% de caseína, que es equivalente a la dieta Chow, que habitualmente consumen las ratas.

a) El protocolo se dividió en tres etapas. La primera etapa corresponde a la ADAPTACION, en la cual a 18 ratas se les proporcionó una dieta con caseína al 18% "ad libitum", durante dos días.

b) En la etapa de PRETRATAMIENTO, durante cinco días las ratas fueron sometidas a la misma dieta con caseína al 18% pero ahora por períodos de 7 horas (9:00 a.m.-16:00 p.m.). La finalidad es forzar a las ratas a consumir la mayor cantidad de dieta en un periodo más corto que el habitual.

c) La tercera etapa corresponde al TRATAMIENTO. Se les dió la misma dieta al 18% y las ratas se sacrificarón a diferentes tiempos. Se dividieron en seis diferentes grupos de tres ratas cada uno, numerándose al azar haciendo uso de una tabla de números aleatorios.

El primer grupo, que corresponde al tiempo 0, es decir a la hora 0, las tres ratas se sacrificarón a las 9:00 a.m. cuando aún no habían ingerido alimento. El segundo grupo se refiere al tiempo 1, esto es que cuando las ratas se sacrificarón, ya tenían 1 hora de haber empezado a ingerir alimento (10:00 a.m.). El mismo criterio se utilizó para los demás grupos a los tiempos 3

hrs (12:00 p.m.), 6 hrs (15:00 p.m.), 12 hrs (21:00 p.m.), y 24 hrs (9:00 a.m. del día siguiente) respectivamente.

I.2.- TRATAMIENTO DE LAS RATAS CON UNA DIETA AL 6 % y AL 50 % DE CASEINA.

En este protocolo se emplearon 30 ratas macho de la cepa WISTAR de entre 70.0 - 80.0 g de peso corporal.

a) Etapa de ADAPTACION, durante un período de dos días, se les proporcionó a las ratas una dieta al 18% de caseína "ad libitum".

b) Etapa de PRETRATAMIENTO, las ratas consumieron la dieta con caseína al 18% por períodos de 7 horas, durante cinco días.

c) Posteriormente, a partir del octavo día, se empezó la etapa de TRATAMIENTO, a 15 ratas se les proporcionó una dieta baja en proteína (6% de caseína) y a otro grupo de 15 ratas una dieta alta en proteína (50% de caseína). Se sacrificaron a diferentes tiempos, 3 ratas de cada grupo: 1 hora (10:00 a.m.), 3 ratas a las 3 hrs (12:00 p.m.), a las 6 hrs (15:00 p.m.), a las 12 hrs (21:00 p.m.), y a las 24 hrs (9:00 a.m.) respectivamente.

I.3.- TRATAMIENTO DE LAS RATAS CON UNA DIETA CON CONTENIDO
PROTEICO BAJO Y ALTO. (6% Y 50%)

PERIODO LARGO.

Utilizamos 30 ratas macho de la cepa Wistar de entre 80.0 - 90.0 g de peso corporal procedentes del bioterio del INNSZ. El peso se modificó debido a que estudios previos en ratas alimentadas con dietas con alto contenido proteico (50% o más), han mostrado que éstas dejan de comer por un cierto período (102). Sin embargo, después de un cierto período de adaptación, los animales son capaces de ingerir dietas con elevado contenido proteico (103). También se les numeró al azar y se formaron 9 grupos de tres ratas cada uno. Todo el protocolo duró en total dieciocho días, con dos etapas de adaptación y además el número de días totales es mayor.

a) La primera de cuatro etapas fue la de ADAPTACION 1., en esta, se les dió de comer a las ratas durante tres días una dieta con caseína al 18 % "ad libitum".

b) En la segunda etapa de ADAPTACION 2. Las ratas fueron alimentadas por un período de siete días en el que consumieron una dieta con caseína al 50 % "ad libitum" para que se habituaran a un contenido proteico alto.

c) Una tercera etapa es la de PRETRATAMIENTO, las ratas consumieron una dieta con contenido proteico alto (50% de caseína) pero por períodos de 7 horas. Esta etapa duró seis días.

d) La cuarta etapa: TRATAMIENTO duró dos días, se formaron dos grupos, a uno de ellos se les dió una dieta baja en proteína (6% de caseína) y al otro una dieta alta en proteína (50% de caseína). Se dividieron de tres en tres para los tiempos o hrs (aún no han consumido alimento), al tiempo 1 hra (10:00 a.m), 3 hrs, 6 hrs, y 24 hrs.

Después de que todas las ratas se sacrificaron por decapitación, se les retiró el HIGADO y fueron congelados rápidamente en hielo seco con acetona, almacenándose posteriormente en un congelador a -70°C hasta que fueron procesados para la extracción del ARN total. El hígado se pesó antes de congelarlo.

Una vez que se tienen todos los hígados almacenados a -70°C , se llevó a cabo la extracción del ARN total, seguido de un análisis espectrofotométrico para después realizar una electroforesis en gel de agarosa y llevar a cabo la detección de ARN mensajeros específicos con la técnica del Northern Blot.

II. ESTUDIOS MOLECULARES.

REACTIVOS.

Los principales reactivos se adquirieron de las siguientes casas comerciales:

Tiocianato de guanidina de Sigma Chemicals, Co.

EL Acetato de sodio, el formaldehído al 37% y el Fenol grado Biología Molecular fueron obtenidos de Merck.

El Cloroformo y el Etanol absoluto de J.T. Baker.

El Bromuro de Etidio fue de Boehringer Manhein, Alemania.

Las membranas de Gene Screen de DuPont, New England, EUA; El (α - 32 P)dCTP fue Amersham, Inglaterra.

La ADN polimerasa I fragmento Klenow fue de Bio Labs, EUA. El líquido de centelleo utilizado fue Aquasol-2 de DuPont de New England Nuclear, EUA. La película de rayos X fue Kodak X-Omat XAR-5. Las bolsas de hibridación fueron de Kapak Corporation, EUA.

Los ADNc (sondas) que se utilizarón para determinar los ARNm específicos (albúmina, PEPCk, TAT, PAH, ribosomal 28S) fueron proporcionadas por la Unidad de Hepatología Molecular del INNSZ por el Dr.A.Panduro.

Todo el material y las soluciones usadas en las técnicas de Biología Molecular se esterilizarón previamente y en muchos casos se utilizó material nuevo (puntas de pipetas, tubos eppendorf y pipetas Pasteur), el agua utilizada fue destilada, desionizada y estéril.

II.1 Extracción de ARN total.

El ARN celular total se aisló utilizando el método de Chomczynsky y Sacchi (148) por medio de extracciones con tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo.

Un fragmento de hígado de aproximadamente 100 mg se homogenizó con 2.0 mL de solución desnaturalizante, solución A (tiocianato

de guanidina 4 M, citrato de sodio 0.25 M pH -7.0, sarcosil al 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1 M). El homogenado se transfirió a un tubo Corex de 15.0 mL y se agregó 0.2 mL de acetato de sodio 2 M pH=4.0. 2.0 mL de fenol precalentado a 65°C y 0.4 mL de cloroformo. La suspensión final se agitó y se enfrió en un recipiente con hielo durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C ; la fase acuosa que contiene el ARN se precipitó con cloruro de sodio 0.25 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío durante 30-60 minutos a -70°C. Esta mezcla debe de tener una concentración final de NaCl de 0.1 M. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 8,000 rpm a -10°C; se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 0.4 mL de solución A y se repitió la extracción con fenol-cloroformo como se hizo anteriormente, al término de la extracción se volvió a precipitar con etanol-NaCl se centrifugó y se redisolvió la pastilla de ARN en 50-100 μ L de amortiguador T/E (Tris-HCL 0.01 M pH=7.0, EDTA 0.001 M). Se determinó la absorbancia tomando 2 μ L de cada una de las muestras a 260/280 nm, que nos sirve como parámetro para saber la pureza de las muestras, pues la relación 260/280 nos da la proporción ácido nucleico/proteína; dichas relaciones representan una buena extracción cuando los valores están en el rango de 1.8-2.0. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 μ g de ARN. Además simultáneamente se hizo un barrido con 2 μ L de una muestra y 1.0 mL de amortiguador T/E también para ver la pureza de las muestras.

II.2 Detección de ARNm específicos con la técnica de Northern Blot

Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

La electroforesis se hizo de acuerdo con el método de Thomas (149). Por medio de esta técnica el ARN es separado de acuerdo a su tamaño y/o carga a través del gel de agarosa desnaturizante.

Preparación del gel (0.8% de agarosa). Se disolvió 0.8 g de agarosa en 60.0 mL de agua desionizada estéril a 95°C hasta que la solución se tornó transparente, se dejó enfriar aproximadamente a 45°C y se agregaron 6.64 mL de MOPS 12X, 13.00 mL de formaldehído al 37% y 4.0 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se vació la mezcla en el molde del gel. Se dejó solidificar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra. Las muestras que se corrierón se desnaturizarón previamente. Se colocaron 23 µL de solución desnaturizante (500 µL de Formamida, 83 µL de MOPS 12X y 162 µL de Formaldehído al 37% por cada mL de solución). Se desnaturizaron 10 µg de ARN a 65°C durante 5 minutos. Inmediatamente se colocaron en hielo. Se agregó a cada muestra 3

μL de amortiguador de carga (Azul de bromofenol al 0.25%, Cianol-xileno al 0.25% y Ficoll 400 al 15%) y se centrifugó en una microcentrífuga brevemente para depositar todo el contenido en el fondo. Se depositaron en el gel. Se corre la electroforesis durante 2-3 horas a 40 volts en un amortiguador de MOPS. Una vez que la electroforesis se completó, el gel se lavó varias veces con agua destilada para quitar el exceso de bromuro de etidio y formaldehído. Se observó con luz UV y se tomaron fotografías del mismo. Se comprobó que la cantidad de ARN colocada en cada línea del gel fuera constante por la intensidad de la fluorescencia del bromuro de etidio (colorante de ácidos nucleicos, tiene la capacidad de intercalarse entre bases) con la luz UV en las bandas de ARN 18S y 28S.

II.3 Transferencia del ARN de los geles de agarosa a las membranas de hibridación.

La transferencia se realizó de acuerdo con las indicaciones del fabricante de las membranas de Gene Screen (DuPont, New England).

Cuyo fundamento es que, una vez separado el ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa se transfiere por capilaridad en medio salino. La transferencia puede hacerse a membranas de vidrio o nylon (150), en celulosa activada (151), o en nuestro

caso, a membranas de nitrocelulosa. la sensibilidad con la que el ARN se une a la nitrocelulosa puede ser detectada por hibridación, en donde el ARN puede ser fácilmente cuantificado e identificado. Largas moléculas de ARN desnaturalizado (>9.0 Kb) se transfieren con alta eficiencia, aún cuando la fragmentación del ARN es generalmente innecesaria.

El enlace del ARN desnaturalizado a la nitrocelulosa es no covalente pero esencialmente irreversible.

La membrana se humedeció previamente en el amortiguador de fosfatos (0.025 M pH=6.5) durante 15 minutos; se cortaron dos hojas de papel filtro del tamaño del gel. También se humedecieron dos hojas de papel filtro # 2 de mayor tamaño, en amortiguador de fosfatos; y se colocaron sobre un puente o soporte de vidrio elevado a manera que los extremos quedaran inmersos en el amortiguador del recipiente en el que está el soporte.

Se colocaron en el siguiente orden el gel, la membrana, cuatro piezas de papel filtro, una columna de toallas absorbentes cortadas de menor tamaño que el gel. Sobre estas piezas se colocaron un rectángulo de vidrio y una pieza de metal, la cual ejercerá una cierta presión sobre cada uno de las capas descritas permitiendo de esta forma la absorción y con ello la transferencia del ARN.

La transferencia se dejó durante un periodo de 12-16 horas, cuidando de cambiar las toallas absorbentes. Una vez transcurrido el tiempo, se observó con el transiluminador de luz UV para

asegurarnos de que la transferencia haya sido completa.

Después se marcaron sobre la membrana las bandas 16S y 28S del ARN ribosómico; se enjuagó la membrana con amortiguador de fosfatos para eliminar residuos de agarosa (ya que interfieren con la autoradiografía), se horneó a 82°C durante 2-4 hrs, para fijar del ARN. Y mientras se lleva a cabo la hibridación, la membrana se guardó a -20°C.

II.4 Marcaje del ADNc con $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dCTP}$.

Las sondas utilizadas se marcaron radiactivamente con ^{32}P por la técnica de "Random Primer" descrita por Summers (152).

La técnica de "Random Primer" consiste en alinear oligonucleótidos (de 8.0 pb sintetizados al azar) con la sonda, la cual se desnatura previamente, formando un complejo primer-molde que representa un sustrato para el fragmento Klenow de la polimerasa I, la cual sintetiza la hebra complementaria partiendo del nucleótido monofosfato del extremo 3' (OH), del oligo cuando se le adicionan los cuatro nucleótidos (dNTP's) (uno de los cuales está marcado con ^{32}P) y las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la reacción; este método produce sondas con alta actividad específica.

En un tubo eppendorf se colocaron 200 ng del molde de ADNc. Se desnaturizaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo por espacio de 5

minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron los siguientes reactivos:

- 5 μ L de amortiguador labeling 10X el cual incluye los random octadeoxiribonucleótidos.
- 6 μ L de una mezcla dNTP (2 μ L de dATP, dTTP, y dGTP).
- 5 μ L de [α - 32 P]-dCTP (3,000 ci/mmol).
- 1 μ L de enzima ADN polimerasa I fragmento Klenow.
- Se aforó a 50 μ L con agua destilada y desionizada estéril.

Opcionalmente centrifugar en microcentrifuga brevemente, para depositar todo en el fondo.

Se incubaron a 37°C durante 1 hora y media. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción, por adición de 5 μ L de EDTA 0.2M pH=8.0, 2.5 μ L de carrier (ARN de levadura), y una décima parte de solución de Acetato de sodio).

El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol (155 μ L) y se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm y se separó el sobrenadante a otro tubo eppendorf, la pastilla se disolvió en 200 μ L de amortiguador TE 10:1 pH=8.0 (Tris-HCl 10 mM pH=8.0, EDTA 1 mM). Se determinó la actividad específica de la sonda marcada, colocando 2 μ L de ésta en un filtro de fibra de vidrio, se lavó en un kitasato con un filtro al vacío con HCl 0.5 N y etanol 3 veces. El filtro se colocó en un frasco con líquido de centelleo y se contó el 32 P durante 1 minuto. La determinación de la actividad específica se realizó por duplicado para cada sonda marcada.

II.5 Expresión y cuantificación de los niveles de ARNm.

Prehibridación e hibridación. Las membranas "Gene Screen" se prehibridarán con la siguiente solución (8 mL /bolsa):

Formamida desionizada.	50	%
*Solución Denhardt.	0.04	%
+Solución de citrato de sodio.	5.0	%
Dodecil sulfato de sodio.	1.0	%
ADN de esperma de salmón.	50	g/mL.

*** Solución Denhardt:**

Polivinil pirrolidona (40 KDa).	2	%
Albúmina sérica bovina.	2	%
Ficoll (400 KDa).	2	%

+ Solución de citrato de sodio:

Citrato de sodio	0.3	M
NaCl	3.0	M

Se selló la bolsa y se colocó en un horno a 42°C por un período de 4 horas. Al finalizar dicho período se le adicionó el ADNc radiactivo previamente desnaturalizado y se incubó a 42°C durante 16-48 hrs con agitación constante. Se llevaron a cabo los lavados post-hibridación dos veces con 100 mL de sol.de citrato de sodio 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos con

agitación constante. Se lavó dos veces más con 100 mL de la siguiente solución: solución de citrato de sodio 2X y dodecil sulfato de sodio al 0.5% a 65°C / 30 minutos con agitación constante. Finalmente se lavó dos veces con solución de citrato de sodio salino 0.1X a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación constante.

II.6 Autorradiografía.

Una vez que se concluyeron los lavados, la membrana se secó sobre una hoja de papel filtro y se llevó a cabo la autorradiografía. La membrana se colocó en una bolsa de plástico y se dispuso en un cassette de exposición Kodak X-Omat con intensificadores. En un cuarto oscuro se colocó la película de rayos X y el cassette se colocó a -20°C el tiempo necesario (está en función de la sonda y de la marca). La placa se reveló en un equipo automatizado, se realizó la densitometría y los resultados son expresados como la relación de las unidades densitométricas en relación al grupo control.

II.7 Técnica del Dot Blot.

Esta técnica se realizó de acuerdo con Kafatos, White, Bancroft (153,154). En dicha técnica un exceso de marca se hace hibridar con el ARN que es inmovilizado en un soporte sólido. Las medidas densitométricas de las autorradiografías resultantes pueden permitir estimaciones comparativas de la cantidad de la secuencia "blanco" en varias preparaciones de ARN. Las muestras de ARN que se utilizaron para esta técnica fueron las mismas que ya se habían extraído para Northern.

Se colocaron cada una de las muestras (3 μ g de ARN) en la membrana y se secaron con una lámpara durante 15 minutos. Se enjuagaron con una solución SSC 2X, se secó con papel filtro y se horneó durante 4 hrs a 82 °C.

Se llevó a cabo la prehibridación, la hibridación, la autorradiografía y el análisis densitométrico como se describió en la técnica de Northern.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO III.

RESULTADOS
Y
DISCUSION.

TABLA I. GRAMOS CONSUMIDOS DE ALIMENTO POR DIAS DE CADA UNA DE LAS DIFERENTES DIETAS.

TIEMPO (días)	GRAMOS DE DIETA 18%-18% ± E.S.	GRAMOS DE DIETA 18%-6% ± E.S.	GRAMOS DE DIETA 50%-50% ± E.S.
-2	9.49 ± 0.21	10.30 ± 0.56	12.82 ± 0.40
-1	10.03 ± 0.31	11.43 ± 0.39	12.89 ± 0.61
0	1.94 ± 0.10	1.59 ± 0.10	1.63 ± 0.19
1	3.98 ± 0.11	5.93 ± 0.22	9.46 ± 0.40
2	6.02 ± 0.25	6.44 ± 0.23	11.70 ± 0.50
3	7.00 ± 0.21	7.36 ± 0.27	12.84 ± 0.41
4	8.08 ± 0.28	7.88 ± 0.43	12.54 ± 0.43
5			13.79 ± 0.71

TABLA II. GANANCIA DE PESO (g) POR DIA DE TRATAMIENTO.

TIEMPO (días)	GRAMOS DE PESO ± E.S. Dieta 18%-18%	GRAMOS DE PESO ± E.S. Dieta 18%-6%	GRAMOS DE PESO ± E.S. Dieta 50%-50%
-3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
-2	3.91 ± 0.93	3.68 ± 0.97	9.74 ± 0.91
-1	7.70 ± 1.02	7.41 ± 1.04	16.04 ± 1.20
0	0.72 ± 1.01	-1.89 ± 0.83	2.60 ± 1.53
1	1.61 ± 0.96	-2.04 ± 0.96	4.31 ± 1.66
2	2.92 ± 1.01	-1.63 ± 0.85	13.35 ± 2.04
3	4.80 ± 1.01	0.51 ± 0.92	19.91 ± 2.53
4	4.65 ± 3.07	2.76 ± 1.10	25.69 ± 2.52
5			30.65 ± 3.09

E.S= Error estándar.

TABLA III. DENSITOMETRIA DE LA ENZIMA TIROSINA AMINOTRANSFERASA TAT.

DIETA	Caseína 18%		Caseína 6%		Caseína 50%	
	X U.D. (%)	E.S	X U.D (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
1	100.00	0.0	100.00	0.0	100.00	0.00
3	229.52	3.81	68.21	1.00	320.58	0.60
6	291.14	2.29	115.50	0.95	608.82	1.60
12	265.21	1.05	150.38	0.70	808.80	0.72
24	522.22	2.25	34.88	1.45	1011.76	0.48

DIETA	Caseína 6% P.L		Caseína 50% P.L	
	X U.D. (%)	E.S	X U.D (%)	E.S
0	100.00	0.00	100.00	0.00
1	372.00	0.86	239.24	0.63
3	405.26	0.94	443.03	0.54
6	126.81	1.10	237.97	0.54
24	261.84	1.20	162.02	0.99

U.D. Unidades densitométricas.
E.S. Error estándar.

TABLA IV. DENSITOMETRIA DE LA ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA PAH.

DIETA	Caseína 18%		Caseína 6%		Caseína 50%	
	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
3	131.02	1.61	54.01	0.56	300.00	0.73
6	95.47	1.36	31.75	0.60	350.00	0.69
12	191.57	0.64	20.27	0.64	741.66	0.94
24	165.00	0.48	3.37	0.48	1033.33	1.20

DIETA	Caseína 6% P.L.		Caseína 50% P.L.	
	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
0	100.00	0.00	100.00	0.0
1	135.35	0.75	33.33	0.52
3	230.30	0.73	77.77	0.54
6	88.88	1.15	144.44	0.49
24	115.15	0.84	128.88	0.50

U.D. Unidades densitométricas
E.S. Error estándar.

TABLA V. DENSITOMETRIA DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXICINASA PEPCK.

DIETA	Caseína 18%		Caseína 6%		Caseína 50%	
TIEMPO (hrs)	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
3	263.56	0.84	22.88	0.18	116.27	1.20
6	242.96	0.78	62.68	0.20	118.60	0.84
12	451.00	0.72	103.98	0.16	163.95	0.82
24	429.00	0.00	44.27	0.11	230.23	0.79

DIETA	Caseína 6% P.L		Caseína 50% P.L.	
TIEMPO (hrs)	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
0	100.00	0.00	100.00	0.00
1	280.47	0.15	176.35	0.26
3	203.55	0.21	337.83	0.30
6	279.28	0.23	378.37	0.34
24	409.46	0.19	186.48	0.18

U.D. Unidades densitométricas.
E.S. Error estándar.

TABLA VI. DENSITOMETRIA DE ALBUMINA.

DIETA	Caseína 18%		Caseína 6%		Caseína 50%	
TIEMPO (hrs)	X UD (%)	E.S	X UD (%)	E.S	X UD (%)	E.S
1	100.00	0.80	100.00	0.45	100.00	0.00
3	98.90	0.44	50.25	0.48	198.96	0.88
6	87.08	0.64	48.70	0.60	185.56	0.98
12	112.70	0.83	115.54	0.54	129.89	0.36
24	99.41	0.86	14.00	0.16	121.64	0.22

DIETA	Caseína 6% P.L		Caseína 50% P.L	
TIEMPO (hrs)	X U.D. (%)	E.S	X U.D. (%)	E.S
0	100.00	0.00	100.00	0.00
1	169.41	1.00	94.11	0.18
3	275.30	1.12	71.65	0.20
6	107.05	0.50	93.58	0.40
24	78.23	0.45	104.81	0.35

U.D. Unidades densitométricas.
E.S. Error estándar.

TABLA VII. EFECTO DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO PROTEICO EN EL CRECIMIENTO DE LAS RATAS.

TRATAMIENTO I Y II.

TRATAMIENTO	DIA No.	PESO X \pm ES (g)
ADAPTACION Caseína al 18% "ad libitum"	01	80.82 \pm 1.68
	02	84.37 \pm 1.73
PRETRATAMIENTO Caseína al 18% por periodos de 7 horas	03	88.02 \pm 1.76
	04	79.82 \pm 1.31
	05	80.27 \pm 1.06
	06	80.94 \pm 0.95
	07	83.09 \pm 0.95

TRATAMIENTO III

TRATAMIENTO	DIA No.	PESO X \pm ES (g)
ADAPTACION 1 Caseína al 18% "ad libitum"	01	90.74 \pm 1.04
	02	93.20 \pm 0.87
	03	96.58 \pm 0.18
ADAPTACION 2 Caseína al 50% "ad libitum" " " " "	04	97.39 \pm 3.10
	05	107.30 \pm 0.97
	06	114.30 \pm 1.10
	07	121.16 \pm 1.37
	08	126.40 \pm 1.81
	09	132.67 \pm 2.23
	10	140.12 \pm 1.87
PRETRATAMIENTO Caseína al 50% por periodos de 7 horas	11	146.71 \pm 2.03
	12	133.00 \pm 1.80
	13	139.00 \pm 1.30
	14	142.04 \pm 1.67
	15	148.60 \pm 1.95
	16	154.38 \pm 2.00

TABLA VIII. EFECTO DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO PROTEICO EN LA INGESTA DE ALIMENTO.

TRATAMIENTO I y II.

TRATAMIENTO	DIA No.	ALIMENTO X ± ES (g)
ADAPTACION	01	9.90 ± 0.41
Caseína al 18% "ad libitum"	02	11.08 ± 0.14
PRETRATAMIENTO	03	1.89 ± 0.12
Caseína al 18%	04	5.01 ± 0.37
por períodos	05	5.20 ± 0.50
de	06	7.23 ± 0.82
7 horas	07	7.50 ± 0.15

TRATAMIENTO III

TRATAMIENTO	DIA No.	ALIMENTO X ± ES (g)
ADAPTACION 1	01	10.13 ± 0.41
Caseína al 18% "ad libitum"	02	9.91 ± 0.32
	03	11.32 ± 0.32
Caseína al 50% "ad libitum"	04	11.00 ± 0.21
	05	10.98 ± 0.42
"	06	11.44 ± 0.32
"	07	11.45 ± 0.46
"	08	11.77 ± 0.53
"	09	13.12 ± 0.25
PRETRATAMIENTO	10	13.22 ± 0.53
Caseína	11	1.67 ± 0.10
al 50%	12	9.65 ± 0.36
por períodos	13	11.91 ± 0.47
de	14	12.17 ± 0.67
7	15	12.54 ± 0.42
horas	16	13.12 ± 0.65

TABLA IX. EFECTO DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO PROTEICO EN LA INGESTA RELATIVA.

TRATAMIENTO I y II. Gramos de alimento consumido (Tabla VIII) sobre el peso diario de las ratas (Tabla VII).

TRATAMIENTO	DIA No.	INGESTA RELATIVA (g)
ADAPTACION	01	0.1224
Caseína al 18% "ad libitum"	02	0.1313
PRETRATAMIENTO	03	0.0210
Caseína al 18%	04	0.0627
por	05	0.0647
períodos	06	0.0890
de 7 horas.	07	0.0900

TRATAMIENTO III.

TRATAMIENTO	DIA No.	INGESTA RELATIVA (g).
ADAPTACION 1	01	0.1116
Caseína al 18%	02	0.1063
"Ad libitum"	03	0.1117
ADAPTACION 2	04	0.1129
Caseína al 50%	05	0.1023
"ad libitum"	06	0.1008
"	07	0.0945
"	08	0.0930
"	09	0.0980
"	10	0.0940
PRETRATAMIENTO	11	0.0110
Caseína	12	0.0720
al 50%	13	0.0850
por	14	0.0850
períodos	15	0.0840
de 7 horas.	16	0.0850

RESULTADOS Y DISCUSION.

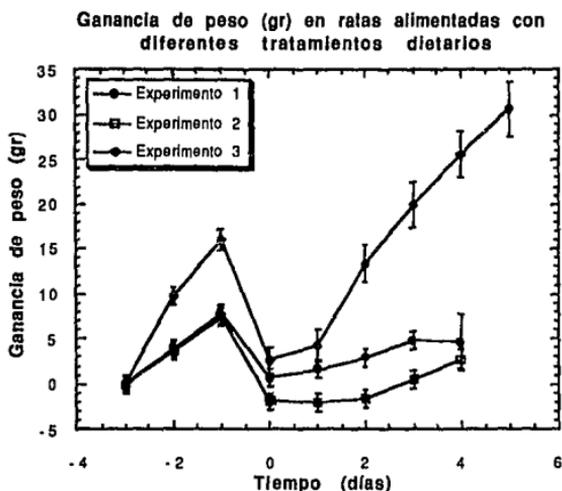
Con las nuevas herramientas que brinda la biología molecular, es posible entender ahora a qué nivel ocurre, en algunos casos la regulación de la expresión génica de algunas enzimas o proteínas importantes que controlan el metabolismo intermedio. En el caso de las vías de degradación de aminoácidos se conocen algunos aspectos, sin embargo, faltan aún muchos detalles de su metabolismo por conocer. En el presente trabajo estudiamos cómo ocurre la adaptación de la regulación de la expresión génica de las enzimas claves para la degradación de la fenilalanina y la tirosina, fenilalanina hidroxilasa y tirosina aminotransferasa en ratas a las cuales se alimentaron con dietas con diferente contenido proteico en forma de caseína.

Las repuestas obtenidas se compararon con la de la enzima clave para la gluconeogénesis, la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, y con el gen de la proteína albúmina. En los presentes experimentos las ratas fueron primero adaptadas a comer dieta con caseína, la cual tiene una textura diferente a la dieta Chow en pellets; posteriormente en los experimentos 1 y 2 los grupos de ratas fueron alimentadas ad libitum con dieta cuyo porcentaje era del 18%, mientras que en el experimento 3 era del 50%. Después de los varios días de adaptación a la dieta (Ver sección de Materiales y Métodos), las ratas adaptadas a la dieta al 18% tuvieron una ganancia de peso de aproximadamente 7.0 gramos en dos días

(FIGURA No.1), mientras que aquellas con una dieta al 50%, tuvieron una ganancia de peso de 16.0 gramos en el mismo período de tiempo. A pesar de la diferencia en la ganancia de peso en los grupos, la cantidad de dieta expresada en gramos fue muy similar, los grupos tratados con dieta al 18% ingerían en promedio por día entre 10.0-11.0 gramos de dieta, mientras que aquéllos alimentados con 50% de proteína ingerían alrededor de 12.5 gramos por día (FIGURA No.2).

Para poder conocer el efecto de la dieta sobre la expresión de los genes antes mencionados, se sincronizaron las ratas en su alimentación, restringiéndoles el acceso al alimento por un período de 7 horas, el cual iniciaba a las 9.00 a.m y terminaba a las 16.00 p.m. Como era de esperarse puesto que los animales no sabían que el alimento se les iba a retirar pronto, en los tres grupos tuvieron el primer día un descenso de peso considerable, siendo de 7.0 a 9.0 gramos en aquellas alimentadas con una dieta al 18% y de 14.0 gramos en el grupo de las ratas alimentadas con una dieta al 50% (FIGURA No.1), esta disminución de peso concordó con una reducción en los tres grupos de la cantidad de dieta que consumieron (alrededor de uno a dos gramos en el día (FIGURA No.2). Sin embargo el grupo de ratas alimentadas con una dieta al 50% de proteína comenzaron a crecer con la misma velocidad que tenían después de recibir durante dos días la dieta por períodos restringidos (FIGURA No.1), lo cual indica que a pesar de que la

Figura 1



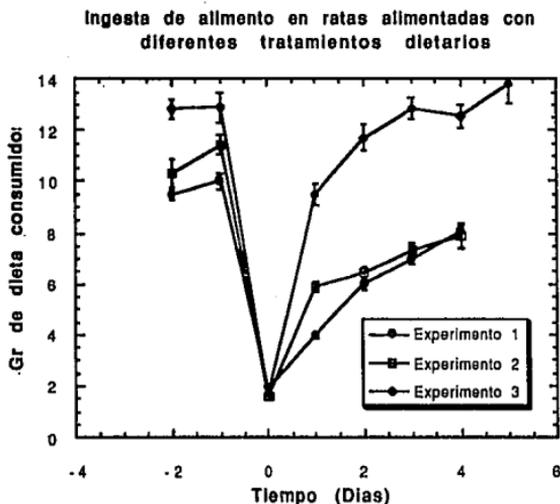
El tiempo 0 indica el día del cambio de dieta ad libitum a dieta administrada por períodos de 7 hr/día

Experimento 1 y 2: caseína al 18% ad libitum en el período de adaptación y caseína al 18% por períodos de 7 hrs en el pretratamiento.

Experimento 3: caseína al 50% ad libitum en el período de adaptación y caseína al 50% por períodos de 7 hrs en el pretratamiento.

Cada punto del experimento 1 y 2 representa el promedio \pm E.S. de 18 ratas; cada punto del experimento 3 representa el promedio \pm E.S. de 30 ratas (Ver sección de materiales y métodos).

Figura 2



El tiempo 0 indica el día del cambio de dieta ad libitum a dieta administrada por períodos de 7 hr/día.

Experimento 1 y 2: caseína al 18% ad libitum en el período de adaptación y caseína al 18% por períodos de 7 hrs en el pretratamiento.

Experimento 3: caseína al 50% ad libitum en el período de adaptación y caseína al 50% por períodos de 7 hrs en el pretratamiento.

Cada punto del experimento 1 y 2 representa el promedio \pm E.S. de 18 ratas; cada punto del experimento 3 representa el promedio \pm E.S. de 30 ratas (Ver sección de materiales y métodos).

cantidad en gramos no alcanzaba la ingesta que tenían los animales cuando se alimentaban ad libitum (FIGURA No.2), el exceso de aminoácidos permitía un desarrollo normal de éstos, mientras que en los animales alimentados con una dieta al 18% requerían de al menos 4 días de adaptación a la dieta administrada por tiempo restringido para seguir una pendiente de crecimiento similar a la que tenían cuando la dieta se les daba ad libitum (FIGURA No.1).

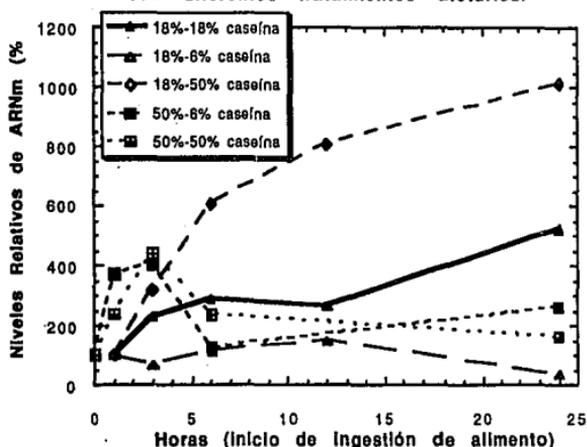
Después de que los animales ya se habían acondicionado a alimentarse de manera sincronizada, se procedió a estudiar cuál era el efecto de la dieta sobre las concentraciones de ARNm específicos de las enzimas en estudio. Para estudiar esta adaptación como se menciona en la sección de materiales y métodos, en el experimento No.1, en el que el día del experimento se les siguió administrando dieta al 18% de caseína, se decapitaron 3 ratas al tiempo 0, es decir antes de la administración de la dieta, y posteriormente se decapitaron grupos de 3 ratas después de recibir su dieta por 1, 3, 6, 12 y 24 horas respectivamente. En el experimento No.2, en el cual se les había administrado la dieta al 18% de caseína por períodos restringidos, el día del experimento se les dió a la mitad del grupo total de ratas una dieta al 6% de caseína y a la otra mitad una dieta al 50% de caseína, siendo la finalidad de este experimento el estudiar animales adaptados a una dieta "normal",

cómo responden en la expresión de los genes en estudio cuando súbitamente se administra una dieta con muy bajo o muy alto contenido proteico. Al igual que en el experimento No.1 las ratas fueron decapitadas a los mismos tiempos. Finalmente en el experimento No.3, el propósito era observar cómo responden animales previamente entrenados a consumir dietas con un alto contenido proteico (50%), y súbitamente administrarles una dieta con el mismo contenido proteico o una dieta muy baja en su concentración de proteína.

En la FIGURA No.3 se muestran los niveles relativos del ARNm para la enzima tirosina aminotransferasa con los diferentes tratamientos dietarios. Como puede observarse en aquellos animales alimentados con una dieta de caseína al 18% tuvieron un aumento en su concentración 1 hora después de haber iniciado la administración de la dieta, dicho incremento se mantuvo relativamente constante después de 12 horas, fluctuando de 1.29 a 1.91 veces más la concentración de su ARNm específico, sin embargo a las 24 horas mostró un pico máximo con un aumento de 4.2 veces los niveles basales del ARNm de la tirosina aminotransferasa. El aumento en las concentraciones del ARNm puede ser debido al cambio adaptativo que sufrieron los animales al recibir su alimento durante el día y no durante la noche. Como es bien conocido las ratas acostumbran a comer su alimento durante la noche, se han realizado estudios que muestran que más

Figura 3

Niveles relativos de ARNm de la enzima Tirosina Aminotransferasa en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.



Las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 18 o 50% de caseína la cual les fue administrada por un periodo de 7 hrs (9 a.m. a 16 p.m.), y el día del experimento las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 6, 18 o 50% de caseína de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Cada punto representa el promedio de los niveles relativos de ARNm del hígado de 3 ratas y la barras el error estándar.

FIGURA No. 4 Northern Blot de la enzima TAT con tratamiento de caseína al 16%. Experimento control.

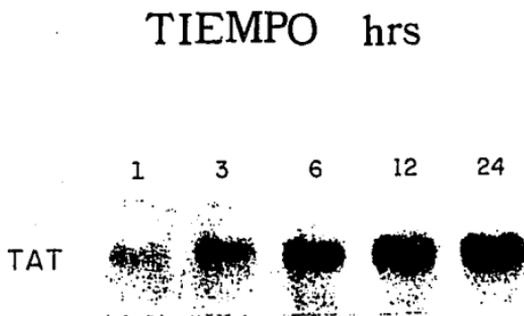
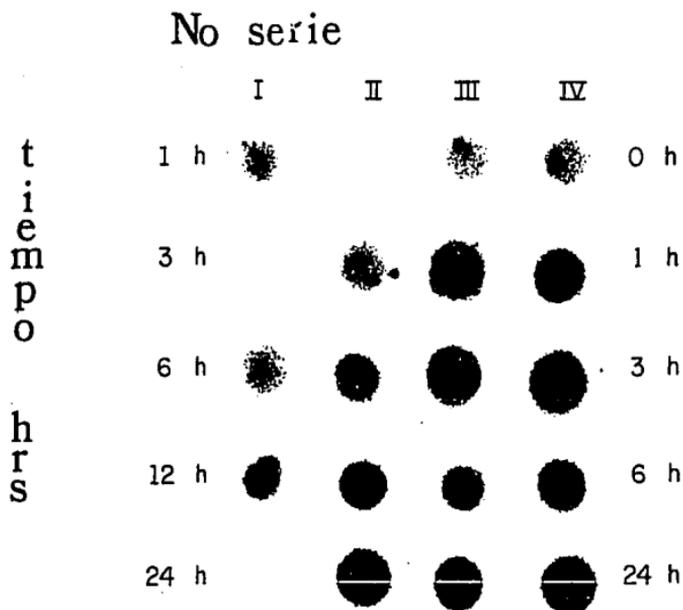


FIGURA No.6 Dot Blot de la enzima TAT bajo los diferentes
tratamientos dietarios.



Serie I Tratamiento con caseína al 6% (18%-6%).
 Serie II Tratamiento con caseína al 50% (18%-50%)
 Serie III Tratamiento con caseína al 6% P.L. (50%-6%)
 Serie IV Tratamiento con caseína al 50% P.L. (50%-50%)

del 95% del consumo total de alimento, la rata lo realiza durante la noche. La actividad de la enzima TAT muestra un ritmo circadiano, mostrando su pico alrededor de la medianoche. Debido al revertimiento que se realizó con su ciclo alimenticio, se podría considerar que el pico de actividad de TAT de las 24 horas, correspondería al pico de actividad de esta enzima de las 12 horas observado en ratas con un ritmo de alimentación sin cambio en su patrón.

Interesantemente cuando una rata se adapta a consumir una dieta con un contenido de 18% de proteína, y el día del experimento se le administra una dieta con bajo contenido proteico (6% caseína), la capacidad que tiene la rata para oxidar el excedente de aminoácidos es muy alta, y no requiere sintetizar más maquinaria enzimática para lograrlo. En este caso se observó, que hubo una disminución en los niveles del ARNm de la TAT. Sin embargo, cuando la rata estaba adaptada a consumir una dieta al 18% de caseína, y el día del experimento se exponen estos animales a una dieta con alto contenido proteico (50%), su capacidad para degradar este exceso se ve rebasada, por lo que requeriría una mayor cantidad de enzima para degradar este excedente, y en el experimento se observó (FIGURA No.3) que ya a la tercera hora después de haber recibido el alimento existía un aumento de 3.2 veces más de ARNm de TAT que al inicio de su alimentación. Este incremento fue progresando de manera que a las

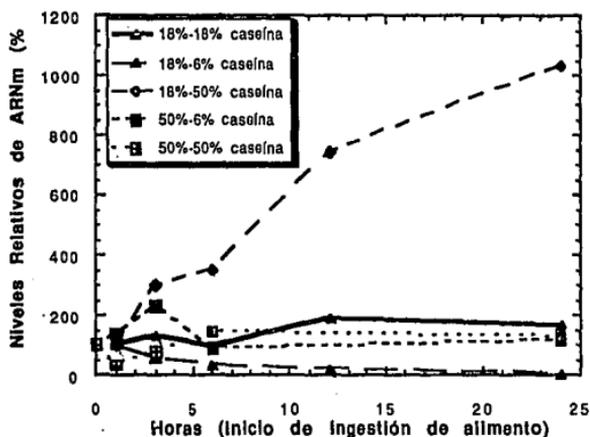
6 horas había niveles mayores de 6 veces de ARNm de esta enzima, a las 12 horas 8 veces más, y a las 24 horas 10 veces más los niveles basales, lo que indica que estos animales aumentaron la síntesis de esta enzima para poder degradar el exceso de proteína ingerida.

Por otro lado aquellos animales adaptados a consumir dietas con un contenido de 6% de caseína, su capacidad para hacer frente a ingestas menores de proteína es muy alta, y se observó claramente que estos animales normalizaron rápidamente los niveles de ARNm de TAT cuando se alimentaron el día del experimento con dietas que contenían 6% o incluso 50% de caseína. Estos resultados indican que el nivel de expresión del gen de TAT está fuertemente controlado por el estado adaptativo al que ha sido sometido el animal.

Para el caso de la enzima fenilalanina hidroxilasa, cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta al 18% de proteína a diferencia de la enzima TAT no se observó la presencia de ningún ritmo circadiano y prácticamente los valores estuvieron muy cercanos al valor inicial, existiendo una variación en los niveles de su ARNm específico de 0.3-0.9 veces más su valor inicial (FIGURA No.6). Nuevamente se mostró para esta enzima que los grupos de animales que fueron alimentados con una dieta que contenía 18% o 50% de caseína, y el día del experimento se

Figura 6

Niveles relativos de ARNm de la enzima
Fenilalanina Hidroxilasa en hígado de ratas
alimentadas con diferentes tratamientos dietarios



Las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 18 o 50% de caseína la cual les fue administrada por un periodo de 7 hrs (9 a.m. a 16 p.m.), y el día del experimento las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 6, 18 o 50% de caseína de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Cada punto representa el promedio de los niveles relativos de ARNm del hígado de 3 ratas y la barras el error estándar.

FIGURA No.7 Northern blot de la enzima PAH con tratamiento de caseína al 18% Experimento control.

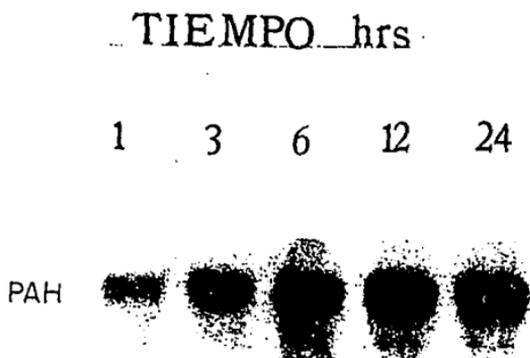
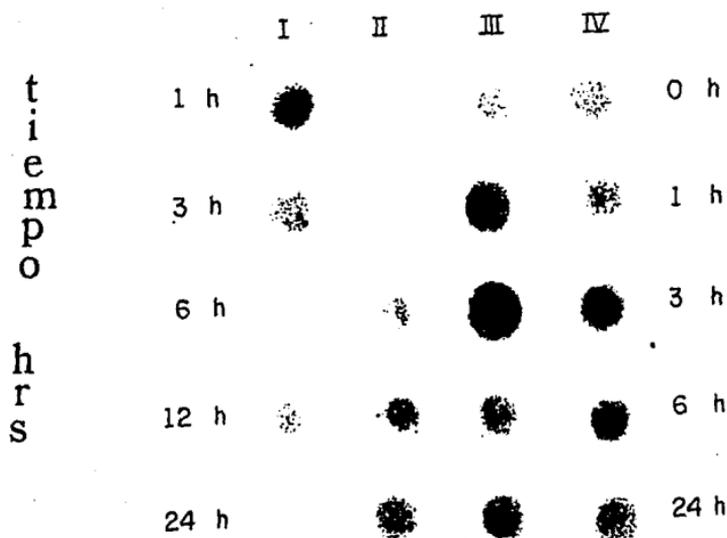


FIGURA No.8 Dot blot de la enzima PAH bajo los diferentes tratamientos dietarios.

No. SERIE



Serie I Tratamiento con caseína al 6% (18%-6%)
 Serie II Tratamiento con caseína al 50% (18%-50%)
 Serie III Tratamiento con caseína al 6% P.L. (50%-6%)
 Serie IV Tratamiento con caseína al 50% P.L. (50%-50%)

les daba una dieta con un contenido proteico menor o igual (6% o 50%) respectivamente, sus niveles de ARNm específico fueron controlados para retornar a niveles basales.

Sin embargo, cuando un grupo de ratas fue adaptado a consumir una dieta al 18% de caseína y se le administró el día del experimento una dieta con 50% de caseína los niveles de ARNm de la enzima PAH, incrementaron de manera similar a los ARNm de la TAT, siendo tres veces más altos a las 3 horas, 3.5 veces a las 6 horas, 7.4 veces a las 12 horas y 10 veces más altos a las 24 horas. Estos resultados vuelven a reforzar el hecho de que las enzimas degradadoras de aminoácidos sufren una rápida adaptación cuando el organismo se expone súbitamente a elevadas concentraciones de proteína en la dieta.

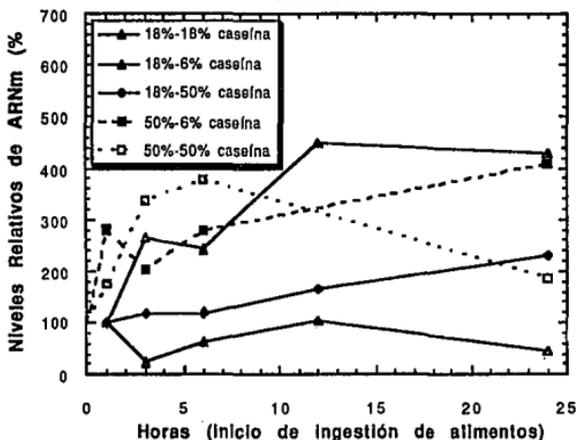
Estos resultados concuerdan con estudios que se han realizado con estas y otras enzimas degradadoras que se han estudiado. Se ha observado que en dietas con un elevado contenido proteico, enzimas como la tirosina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, serina dehidratasa e histidasa, las cuales están involucradas en la degradación de sus respectivos aminoácidos, su actividad se ve estimulada por la ingestión de dietas con un alto contenido de proteína. Es importante enfatizar que el propósito de estas enzimas es el de oxidar todo el exceso de aminoácidos de manera que se vuelva a

normalizar el patrón de aminoácidos en sangre y evitar así la toxicidad por aminoácidos. En el momento en que existe un gran aumento de aminoácidos en la sangre, algunos órganos tales como el cerebro o el corazón protegen de ese exceso limitando el acceso de éstos al espacio intracelular por medio de limitaciones a través del transporte de aminoácidos.

Es importante el considerar que aquellas proteínas que tienen una regulación muy rápida en su expresión, están relacionadas con una vida media muy corta ($t_{1/2}$). Se han descrito proteínas que tienen una vida media de minutos, hasta otras que tienen una vida media de meses. En el caso de las $t_{1/2}$ de algunas enzimas degradadoras que se conocen están en el intervalo de 1-2 horas como es el caso de la TAT, hasta 2-3 días como en el caso de la histidasa; estos tiempos permiten observar cambios rápidos en la expresión de los genes de estas enzimas. El nivel al cual se regula la expresión de estos genes es aún campo de estudio, las posibilidades para interpretar el aumento en la concentración de los ARNm de estos genes puede ser debido a que exista un aumento en la transcripción de éstos, o a una disminución en la velocidad de degradación de sus ARNm. Los presentes resultados no nos permiten elegir entre cualquiera de estas dos posibilidades, sin embargo estudios con serina deshidratasa indican que la regulación ocurren a nivel transcripcional, lo que podría ser el

Figura 9

Niveles relativos de ARNm de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa en hígado de ratas alimentadas con diferentes tratamientos dietarios.



Las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 18 o 50% de caseína la cual les fue administrada por un periodo de 7 hrs (9 a.m. a 16 p.m.), y el día del experimento las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 6, 18 o 50% de caseína de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Cada punto representa el promedio de los niveles relativos de ARNm del hígado de 3 ratas y la barras el error estándar.

FIGURA No.10 Northern Blot de la enzima PEPCK con tratamiento con caseína al 18%. Experimento control.

TIEMPO hrs.
1 3 6 12 24

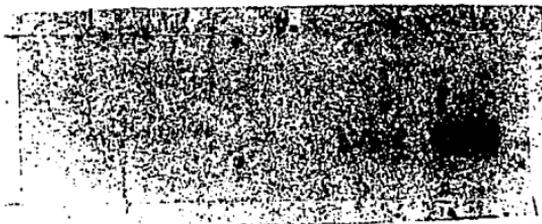
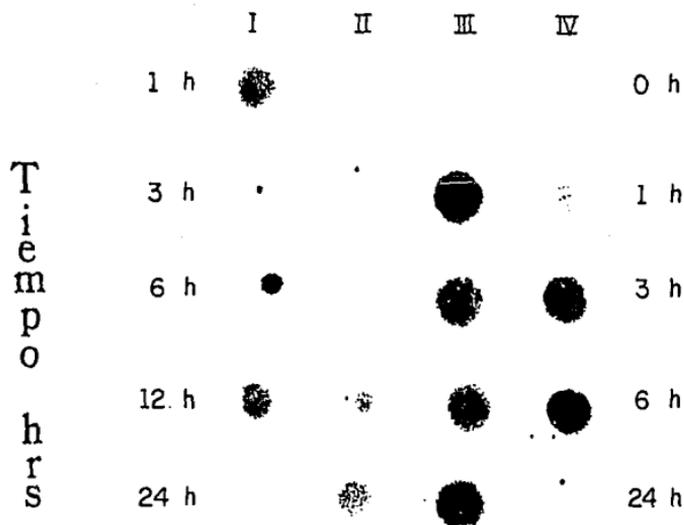


FIGURA No.11 Dot blot de la enzima PEPCK bajo diferentes tratamientos dietarios.

No. serie



Serie I Tratamiento con caseína al 6% (18%-6%).

Serie II Tratamiento con caseína al 50% (18%-50%)

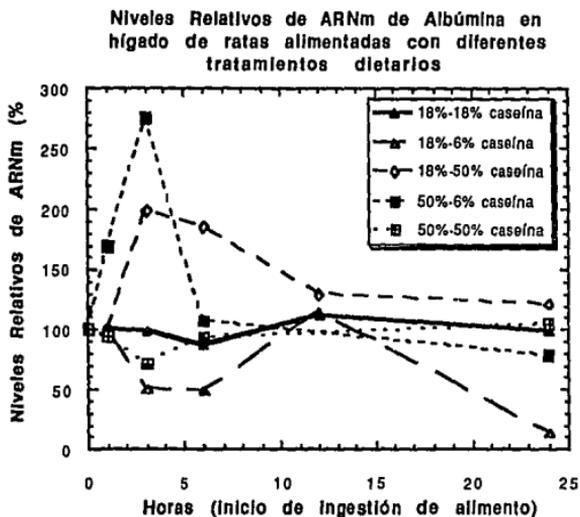
Serie III Tratamiento con caseína al 6% P.L. (50%-6%)

Serie IV Tratamiento con caseína al 50% P.L. (50%-50%)

mecanismo a través del cual estas enzimas se regulen. Sin embargo, es necesario realizar estudios de velocidad de transcripción haciendo uso de ensayos "run off", con lo que se determinaría si el aumento de los ARNm de TAT y PAH se deben a un aumento en la transcripción.

En el caso de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (PEPCK), la cual es fundamental en la vía de la formación de la glucosa endógena (gluconeogénesis), y la que en estudios en ratas con dietas que contienen muy bajos niveles de hidratos de carbono, o durante inanición, o con glucagon, se ha observado un aumento en su actividad. Interesantemente, se ha reportado que esta enzima tienen una localización zonal en el hígado, encontrándose con una mayor abundancia en los hepatocitos periportales que en los perivenosos, lo cual no se ve alterado por ritmo de alimentación. En el presente trabajo se observó que en aquellos animales que habían sido adaptados a ingerir dietas que contenían 18% de caseína, sus niveles hepáticos de ARNm de PEPCK fueron aumentando conforme transcurrió el período de ayuno, el cual se iniciaba a las 16:00 p.m y terminaba a las 9:00 a.m del siguiente día, sin embargo aquellos animales que habían sido adaptados a consumir dieta que contenía 50% de caseína y el día del experimento se les continuaba administrando la misma dieta tendieron a reducir las concentraciones de ARNm conforme se alargaba el período de ayuno (FIGURA No.9), lo cual puede

Figura 12



Las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 18 o 50% de caseína la cual les fue administrada por un periodo de 7 hrs (9 a.m. a 16 p.m.), y el día del experimento las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 6, 18 o 50% de caseína de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Cada punto representa el promedio de los niveles relativos de ARNm del hígado de 3 ratas y la barras el error estándar.

FIGURA No.13 Northern blot de Albúmina con caseína al 18%
Experimento control.

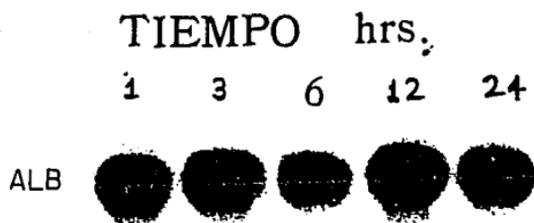
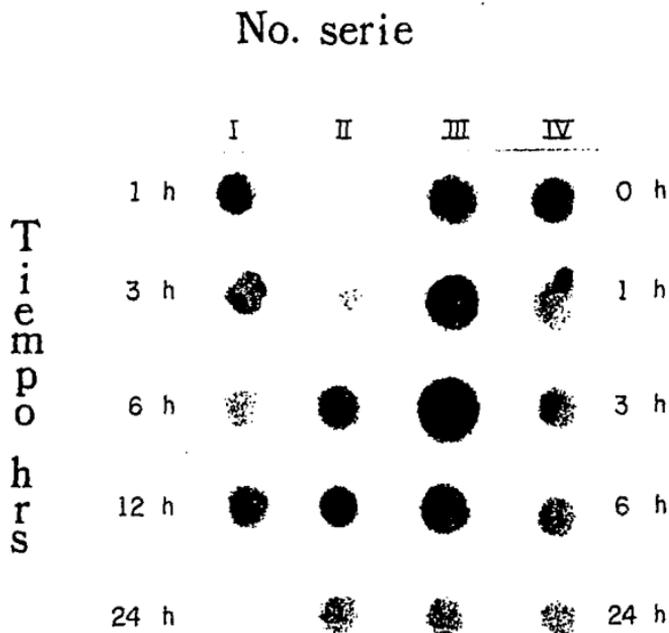
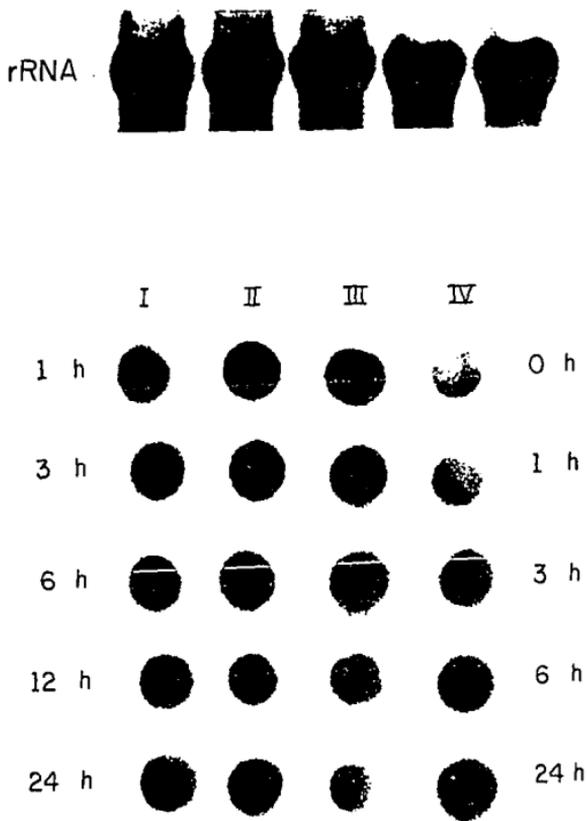


FIGURA No. 14 Dot blot de albúmina bajo diferentes tratamientos dietarios.



Serie I Tratamiento con caseína al 6% (18%-6%).
 Serie II Tratamiento con caseína al 50% (18%-50%)
 Serie III Tratamiento con caseína al 6% P.L. (50%-6%)
 Serie IV Tratamiento con caseína al 50% P.L. (50%-50%)

FIGURA No.15 Dot blot del ribosomal 28S.



explicarse a que debido al exceso que se ingiere de aminoácidos, éstos probablemente proveen la energía requerida y por lo tanto el organismo no requiere entrar en un proceso de gluconeogénesis muy extenso, caso opuesto a lo que ocurre cuando la ingesta de proteína es menor.

En el caso de la expresión del gen de la albúmina en los cinco tratamientos dietarios se observó un aumento temporal de los niveles de ARNm en el grupo de ratas adaptadas a una dieta al 18% y el día del experimento expuestas a una al 5% de caseína, y en el grupo adaptado a una dieta al 50% de caseína y alimentado el día del experimento con una dieta al 6% de caseína, y su significancia es poco clara y requiere más investigación para explicar estos fenómenos, sin embargo, prácticamente los niveles de ARNm de albúmina permanecieron estables en las últimas 12 horas del día experimental (FIGURA No.12).

Es importante hacer notar que se realizaron Northern Blots hibridando con la sonda de ARN ribosomal (28S) y mostraron que no existen variaciones en las concentraciones de ARNm en las membranas de hibridación.

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES.

Los resultados encontrados indican que el nivel de la expresión del gen de la enzima TAT, está fuertemente controlado por el estado adaptativo previo.

Las enzimas degradadoras de aminoácidos sufren una rápida adaptación cuando el organismo se expone súbitamente a concentraciones de proteína diferente a la "normal". Su actividad se ve estimulada por la ingestión de dietas con un alto contenido de proteína.

De manera general, estos experimentos confirman los hallazgos iniciales en que se observaron que las ratas alimentadas con dietas que contienen elevadas cantidades de proteína presentan altas actividades de las enzimas degradadoras de aminoácidos, y muestran que, la cantidad de proteína, así como la frecuencia y cantidad neta de alimento, y los períodos de ayuno afectan de una manera directa o indirecta la regulación de la expresión de los genes de estas enzimas, probablemente a nivel transcripcional. Esta interrelación tan importante que existe entre el medio ambiente como es la dieta y la información genética, se manifiesta de una manera muy importante a través de la homeostasis, y refiriéndose específicamente al metabolismo de aminoácidos las alteraciones en el genotipo de un organismo se reflejaran en el fenotipo, el cual resulta ser principalmente el

patrón y los niveles de aminoácidos en plasma, siendo las adaptaciones realizadas en el organismo cuando se ingieren dietas con bajos o elevados niveles de proteína (aminoácidos) necesarias para mantener un patrón y nivel de aminoácidos "normal".

Este estudio provee las bases para analizar en futuros estudios cuáles son los mecanismos que producen la regulación de la expresión de los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos.

A N E X O.

ANEXO.

- Resultados de absorbancias.

EFECTO DE UNA DIETA AL 18% PROTEINA. Experimento control.

Se seleccionaron solamente dos hígados para analizarlos por cada grupo de ratas:

Grupo No.1 correspondiente a 1 hora se seleccionaron los hígados de las ratas 12 y 14.

Grupo No.2 (3 horas de tratamiento) ratas # 20, 22.

Grupo No.3 (6 horas de tratamiento) ratas # 05, 13.

Grupo No.4 (12 horas de tratamiento) ratas # 06, 10.

Grupo No.5 (24 horas de tratamiento) ratas # 11, 18.

Es importante mencionar que sólo aparecen 5 grupos de ratas porque el grupo correspondiente al tiempo 0 se eliminó.

Una vez que se realiza la extracción como indica el protocolo antes citado, se tienen que realizar las lecturas de absorbancia correspondientes para cada muestra.

Ya hechas estas lecturas por triplicado, se seleccionan las dos lecturas más parecidas, se les calcula el valor promedio y este será el valor a utilizar para hacer los cálculos posteriores.

Las lecturas obtenidas son :

TABLA I. Lecturas de absorbancia y cálculo de las concentraciones de ARN.

PROTEINA AL 18%

No. muestra	Tiempo (hrs).	Valor promedio de absorbancia a 260 nm.	Concentración en la muestra (μg de ARN/ μL)	Volumen necesario para tener 10 μg de ARN por μL .
1	1	0.5250	10.58	0.9451
2	1	0.3310	6.62	1.5100
3	3	0.4098	8.19	1.2200
4	3	0.2425	4.85	2.0600
5	6	0.4137	8.27	1.2086
6	6	0.3617	7.23	1.3825
7	12	0.3499	6.99	1.4287
8	12	0.4095	8.19	1.2200
9	24	0.1669	3.33	2.9958
10	24	0.2194	4.39	2.2780

Una vez que se tienen estos valores, se calcula la cantidad de μg de ARN que se tienen en cada muestra por μL de la misma con la siguiente operación:

$$(\text{Valor promedio de } A_{260}) (40 \mu\text{g ARN} / 1 \text{ unidad de } A) / 2 \mu\text{L}$$

EFFECTO DE UNA DIETA CON ALTO Y BAJO CONTENIDO PROTEICO
(6% y 50% Caseína)

Nuevamente se hizo la selección de las muestras a extraer, dos hígados por cada grupo de ratas:

Grupo No.1 correspondiente a 1 hora de tratamiento con proteína al 6% se seleccionaron las ratas # 03,16.

Grupo No.2 corresponde a 3 horas de tratamiento con proteína al 6% , ratas # 20,22.

Grupo No.3 correspondiente a 6 horas de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 10,06.

Grupo No.4 corresponde a 12 horas de tratamiento con proteína al 6% , ratas # 09,17.

Grupo No.5 corresponde a 24 horas de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 29,28.

Grupo No.6 corresponde a 1 hora de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 12,14.

Grupo No.7 corresponde a 3 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 05,13.

Grupo No.8 corresponde a 6 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 18,23.

Grupo No.9 corresponde a 12 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 01,08.

Grupo No.10 corresponde a 24 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 04,27.

TABLA II. Valores de las lecturas de absorbancia correspondientes a cada muestra, con sus respectivos valores de concentraciones y volúmenes.

PROTEINA AL 6%

No. muestra	Tiempo (hrs)	Valor promedio de absorbancia a 260 nm.	Concentración en la muestra (μg de ARN en un μL).	Volumen necesario de la muestra para tener 10 μg de ARN/ μL .
1	1	0.2702	5.40	1.8500
2	1	0.3214	6.42	0.9400
3	3	0.2404	4.80	2.0800
4	3	0.3113	6.22	1.6100
5	6	0.2330	4.51	1.0000
6	6	0.1790	3.58	2.9000
7	12	0.1586	3.17	2.9500
8	12	0.1691	3.38	2.9500
9	24	0.2317	4.63	2.2000
10	24	0.3463	3.12	4.0000

TABLA III. Lecturas de absorbancia y valores de las concentraciones necesarias de ARN.

PROTEINA AL 50%

No. muestra.	Tiempo (horas)	Valor promedio de absorbancia a 260 nm	Concentración de la muestra en μg de ARN/ μL	Volumen necesario para tener 10 μg de ARN/ μL .
11	1	0.1486	4.23	2.3600
12	1	0.2115	4.23	2.3600
13	3	0.4545	9.09	1.1000
14	3	0.1739	3.47	2.9500
15	6	0.1485	2.97	3.3500
16	6	0.3646	7.29	1.3700
17	12	0.1032	2.06	4.8400
18	12	0.2734	5.46	1.8200
19	24	0.1730	3.46	2.9000
20	24	0.0559	3.46	2.9000

EFFECTO DE UNA DIETA CON ALTO Y BAJO CONTENIDO PROTEICO.

PERIODO LARGO (Caseína al 50% y al 6%).

Las ratas seleccionadas en este experimento fueron las siguientes:

Grupo No.1 corresponde a 0 horas ya que éste es el grupo control, ratas # 24,16.

Grupo No.2 corresponde a 1 hora de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 35,22.

Grupo No.3 corresponde a 3 horas de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 06,21.

Grupo No.4 corresponde a 6 horas de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 25,31.

Grupo No.5 corresponde a 24 horas de tratamiento con proteína al 6%, ratas # 28,34.

Grupo No.6 corresponde a 1 hora de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 15,33.

Grupo No.7 corresponde a 3 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 11,18.

Grupo No.8 corresponde a 6 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 01,08.

Grupo No.9 corresponde a 24 horas de tratamiento con proteína al 50%, ratas # 04,19.

TABLA IV. Valor promedio de las lecturas de absorbancia y concentraciones de ARN.

PROTEINA AL 6%

No. muestra.	Tiempo (hrs).	Valor promedio de absorbancia a 260 nm.	Concentración μg de ARN/ μL .	Volumen necesario para tener 10 μg ARN/ μL .
21	0	0.1896	3.79	2.6371
22	0	0.1765	3.53	2.8328
23	1	0.2485	4.97	2.0100
24	1	0.1334	2.66	3.7400
25	3	0.3794	7.58	1.2000
26	3	0.3034	6.06	1.6479
27	6	0.2952	5.90	1.6930
28	6	0.2256	4.51	2.2150
29	24	0.1895	3.79	2.6370
30	24	0.1895	3.79	2.6370

TABLA V. Valores promedio de las lecturas de absorbancia y concentraciones de ARN.

PROTEINA AL 50%

No. muestra.	Tiempo (hrs).	Valor promedio de absorbancia a 260 nm.	Concentración de ARN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.	Volumen necesario para tener 10 μg de ARN/ μL .
C	0	0.1896	3.79	2.6371
C	0	0.1765	3.53	2.8328
31	1	0.3642	7.28	1.3726
32	1	0.2466	4.93	2.0222
33	3	0.1624	3.24	3.0770
34	3	0.1144	2.28	4.3700
35	6	0.1185	2.37	4.2190
36	6	0.2195	4.39	2.2779
37	24	0.2999	5.99	1.6672
38	24	0.2236	4.47	2.2360

R E F E R E N C I A S .

REFERENCIAS.

INTRODUCCION.

1.- Goodridge, A.G.

Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism.

Ann. Rev. Nutr. 1987, 7: 157-185

2.- Hanson, R.W., Hatzoglou, M., Macgrane, M.M., Wyn Shaw-Bons A., Rottman, F.M., Wagner, T.

Molecular Biology and Nutrition Research.

J. Nutr. 1989, 118: 957-964.

3.- Goodridge, A.G.

The new metabolism: molecular genetics in the analysis of metabolic regulation.

FASEB. J. 1990, 4:3099-3110.

4.- O. Greengard.

Enzymic diferentiation in mammalian liver.

Science. 1969, 163:891-895.

5.- O. Greengard.

Enzymic diferentiation in mammalian tissues. In essays in Biochemistry. (P.N. Campbell and F. Dickens). 1971, 7:159-205.

6.- Harper, A.E.

Symposium on amino acid metabolism in clinical medicine. Some recent developments in the study of amino acid metabolism.

Proc. Nutr. Soc. 1983, 42:437-449.

- 7.- Colombo, J.P., Cervantes, H., Kokorovic, M.
Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain.
Ann. Rev. Metab. 1992, 36:23-33.
- 8.- Harper, E. Alfred., N. J. Benevenga., R. M. Wohlbueter.
Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. Physiol. Rev. 50: 428-558, 1970.
- 9.- Stanbury, J. B., Wyngaarden. and D. S. Frederickson. The metabolic basis of inherited disease, 3er edition. New York. Mac Graw Hill Book, 1972.
- 10.- Bodwell, C. E., J. S. Adkins. D. T. Hopkins. Protein quality in humans. Wesport, Conn. Avi, 1981.
- 11.- Harper, A. E. Mc. Collum and directions in the evaluation of protein quality. J. Agric. Food Chem. 29:429-435, 1981.
- 12.- Harper, A. E. Influence of dietary and plasma amino acids patterns on brain amino acid concentrations. Proceedings, Conference on Commonalities in substance abuse and habitual behavior, Washington D.C. NAS/NRC, 39-59, 1977.
- 13.- Miller, D. S., P.R. Payne. Problems in the prediction of protein values of diets. Caloric restriction. J. Nutr. 75:225-230, 1961.
- 14.- Harper, A. E. Control mechanism in amino acids metabolism. In: The control of Metabolism, J. D. Sink, editor. University Park, PA: The Pennsylvania State University Press,

Chap. 4, 49-71, 1974.

- 15.- Harper, A. E. Amino acids requirements and plasma amino acids. In: Protein Nutrition, H. Brown, editor. Springfield: C. C. Thomas, 130-179, 1974.
- 16.- Freedland, R. A., B. Spezi. Control of enzyme activity: nutritional factors. In: Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems. University park press, 103-140, 1971.
- 17.- Tews, J. K., Y-W. L. Kim., Harper, A. E. Induction on threonine imbalance by dispensable amino acids: relation to competition for amino acids transport into brain. J. Nutr 109:304-315, 1979.
- 18.- Rogers, Q. R. The nutritional and metabolic effects of amino acids imbalances: In: Protein Metabolism and Nutrition, D. J. A. Colem K. N. Boorman, P. J., Buttery, D. Lewis, R. J. Neale editors. London: Butterworths, 1976.
- 19.- Brookes, I. M., F. N. Owens., U. S. Garrigus. Influence of amino acids level in the diet upon amino acid oxidation by the rat. J. Nutrition. 102:27-36, 1972.
- 20.- Fernstrom, J. D. Effects of the diet on brain neurotransmitters. Metabolism 26:207-223, 1977.
- 21.- Flaim, K. E., W. S. Liao, D. E. Peavy, J. M. Taylor., L. S. Jefferson. The role of amino acids in the regulation of protein synthesis in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 257:2932-2946, 1982.
- 22.- Harper, A. E., Benevenga, N. J., Wohlhueter, R. N. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids.

- Physiol. Rev. 50:428-556, 1970.
- 23.- Peters, J. C., Harper, A. E. Adaptations to rats to diets containing different levels of protein : effects in food intake, plasma and brain amino acids concentrations and brain neurotransmitters metabolism. J. Nutr. 115, 382-398, 1985.
 - 24.- Steele, R. D., Harper, A. E. Proteins and amino acids. 6a edition, International Life Sciences Institute Nutrition Foundation, Washington, D. C. 1990.
 - 25.- Anderson, G.H. Regulation of protein intake by plasma amino acids. In: advances in nutrition researchs, H. H. Draper editor. 1:145-166, 1977.
 - 26.- Anderson, H. L., Benevenga and A. E. Harper. Associations among food and protein intake, serine dehydratase, and plasma amino acids. Am. J. Physiol. 214:1008-1013.
 - 27.- Mc. Cance, R. A. Unconsidered mechanism responsible for maintining the stability of the internal enviroment. Can. Med. Assoc. J. 75:791-806, 1956.
 - 28.- Krebs, H. A. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorus animals. In: Advances in enzyme regulation, Vol 10, G. Weber, editor. Oxford: Pergamon Press, 397-420, 1972.
 - 29.- Tovar, A. R., Tews, J. K. Torres, Nimbe., Harper, A. E. Competition for transport of amino acids into rat heart: effect of competitors on protein synthesis and degradation. Metabolism. 1992.
 - 30.- Munro, H. N. A general survey of mechanism regulating

- protein metabolism in mammals. In: Mammalian Protein Metabolism, Vol IV. New York: Academic Press, 3-130, 1970.
- 31.- Stryer, Lubert. Bioquímica, 3era edición. Tomo II, 1991.
- 32.- Peters, J. C., Harper, A. E. Protein and energy consumption, plasma amino acids ratios, and brain neurotransmitter concentration. *Physiol. and Behavior* 27:287-298, 1981.
- 33.- Tews, J. K., A. M. Bradford., Harper, A. E. Induction on lysine imbalance in rats: relationships between tissue amino acids and diet. *J. Nutr.* 11:968-978, 1981.
- 34.- Kang-Lee, Y. A., Harper, A. E. Effect of histidine intake and hepatic histidase activity on the metabolism of histidine in vivo. *J. Nutr.* 107:1427-1443, 1977.
- 35.- Patterson, J. I., Harper, A. E. Effect of tryptophan intake on oxidation of [7a-¹⁴C]tryptophan and urinary excretion of N'-methylnicotinamide in the rat. *J. Nutr.* 112:776-781, 1982.
- 36.- Tews, J. K., S. S. Good. Transport of treonine and tryptophan by rat brain slices: relation to other amino acids and concentrations found in plasma. *J. Neurochem.* 31:581-589, 1978.
- 37.- Kang-Lee, Y. A., Harper, A. E. Threonine metabolism in vivo; Effect on threonine intake and prior induction of threonine dehydrase in rats. *J. Nutr.* 108:163-175, 1978.
- 38.- Jefferson, L. S., A. Korner. Influence on amino acids supply on ribosomes and protein synthesis of perfused rat liver. *Biochem. J.* 111:713-712, 1969.

- 39.- Peng, Y., J. K. Tews., Harper, A. E. Amino acid imbalance protein intake, and changes in rat brain and plasma amino acids. *Am. J. Physiol.* 222:314-321, 1972.
- 40.- Harper, A. E. Control mechanism in amino acids metabolism. The Pennsylvania State University Press.
- 41.- Fafournoux, Pierre., Remesy, Christian. fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. *Am. Physiol. Soc.* 1990.
- 42.- Waterlow, C. John. Observations on protein turnover. Genetics factors in nutrition, 1984. Academic Press.
- 43.- White, A. P., Handler, E. L. Smith, R. L. Hill., J. R. Lehman. Principles in Biochemistry, 6a. edition. New York: Mac Graw Hill Book Co., 1978.
- 44.- Lewin, Benjamin. Genes IV. Oxford University Press, 1990. 541-619.
- 45.- Bittner, R., Bohme, J., Didt, W. Developmental changes in the levels of hepatic enzymes and their relation to metabolic functions. Genetics factors in nutrition, 1984. Academic Press.
- 46.- Snyderman, E. Selma. Human Amino Acid Nutrition. Genetics factors in nutrition, 1984. Academic Press.
- 47.- Block, R. J. H. H. Mitchell. The correlation of the amino acids composition of proteins with their nutritive value. *Nutr. Abstr. Rev.* 16:249-278, 1946-47.
- 48.- Jefferson, L. S., J. B. Li., S. R. Rannels. Regulation by insulin of amino acid release and protein turnover in the

- perfused rat hemi-corpus, J. Biol. Chem. 252:1476-1483, 1977.
- 49.- Flaim, K. E., W. S. Liao, D. E. Peavy, J. M. Taylor., L. S. Jefferson. The role of amino acids in the regulation of protein synthesis in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 257:2932-2946, 1982.
- 50.- American academy of pediatrics, Committee on nutrition. Special diets for children with in born errors of amino acids metabolism. Pediatrics 57: 783-791, 1976.

TIROSINA AMINOTRANSFERASA.

- 51.- Groenewald, et al. 1984.
- 52.- Granner., Hargrove, J.L.
Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase.
- 53.- Yoshifumi Iwasaki, Carlos, Lamar., Kathleen, Donenberg.
- 54.- Kenney, F.T.
J. Biol. Chem. 1962, 237:1605-1610.
- 55.- Hargrove, J.L., Granner, D.K.
Biosynthesis and degradation of tyrosine aminotransferase.
In: The transaminases, 1982
- 56.- Yoshida, A., Noguchi, T., Taniaguchi, S., Mitani, Y., Ueda, U., Urabe, K., Adachi, T., Mashida, H.
Receptor dynamics and tyrosine aminotransferase induction during the course of chronic treatment of rat with glucocorticoid. Endocrinol. Japon. 1986, 33:769-775.
- 57.- A. Yuwiler., L. Wetterberg., E. Geller.

- Alterations in induction of tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase by glucose pretreatment.
- Biophys.B. Acta 1970, 208:428-433.
- 58.- Diesterhatt, M., Noguchi, T., Granner, D.K.
Eur. J. Biochem 1980, 108:357-365.
- 59.- Scherer, G., Schmid, W., Strange, C.M., Roewe, Kamp,W.,
Schutz, G.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983,
- 60.- Wicks, W. D., Kenney, F.T., Lee, K.L.
J. Biol. Chem. 1969, 244: 6008-6013.
- 61.- Wicks, W. D.
J. Biol. Chem. 1969, 253:4009-4015.
- 62.- Granner, D.K., Lee, A., Thompson, E.B.
J. Biol. Chem. 1977, 252:3891-3897.
- 63.- Snoeck, G. T., Van De Poll, K. W., Voorma, H. O., Van Wijk,
R.Eur. J. Biochem, 1981, 114:27-31.
- 64.- Granner, D.K.
Nature, 1976, 259:572-573
- 65.- Granner, D. K.
In: Glucocorticoid Hormone action, monographs in
endocrinology.1979, 12: 593-611.
- 66.- Holten, J. F., Kenney, F. T.
J. Biol. Chem. 1967, 242:4372-4377.
- 67.- Reel, J. R., Lee, K. L., Kenney, F. T.
J. Biol. Chem. 1970, 245: 5800-5805.
- 68.- Freedland, R.A., E.H. Avery. Studies in serine dehydrase. J.

- Biol. Chem. 1964, 239:3357-3364.
- 69.- Potter, V. R., R. A. Gebert, H. C. Pitot, C. Peraino, C. Lamar., Jr., S. Leshner, H. P. Morris. Systematic oscillations in metabolic activity in rat liver and hepatomas. I. Morris Hepatoma No. 7793. Cancer Res. 1966, 26:1547-1553.
- 70.- Szepesi, B., R. A. Freedland. Alterations in the activities of several rat liver enzymes at various times after initiation of a high protein regimen. J. Nutr. 1967, 93:301-308.
- 71.- Szepesi, B., R. A. Freedland. Alterations in the activities of several rat liver enzymes at various times after the feeding of high carbohydrates diets to rats previously adapted to high protein regimen. J. Nutr. 1968, 94:37-48.
- 72.- Szepesi, B., R. A. Freedland. Time course of changes in rat liver enzyme after initiation of high protein regimen. J. Nutr. 1968, 94:463-469.
- 73.- Watanabe, M., V. R. Potter, H. C. Pitot. Systematic oscillations in tyrosine transaminase and other metabolic functions in liver of normal and adrenalectomized rats on controlled feeding schedules. 1968, J. Nutr. 95:207-227.
- 74.- Potter, V. R., R. A. Gebert, H. C. Pitot, C. Peraino, C. Lamar. Jr. S. Leshner, H. P. Morris. Systematic oscillations in metabolic activity in rat liver

and hepatomas.

- 75.- Wurtman, R. J., J. Axelrod. Daily rhythmic changes in tyrosine transaminase activity of rat liver. Proc. Natl. Acad. USA. 1967, 57:1594-1600.
- 76.- Civen, M. R., Ulrich, B. M. Trimmer, C. B. Brown. Circadian rhythms of liver enzymes and their relationships to enzyme induction. Science, 1967, 157:1563-1567.
- 77.- Shambaugh, G. E., III, D. A. Warner, W. R. Beisel. Hormonal factors altering rhythmicity of tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminase in rat liver. Endocrinology, 1967, 81:811-819.
- 78.- Siegel, P. S., H. L. Stackey. The diurnal course of water and food intake in the normal, mature rat. J. Comp. Physiol. Psychol. 1947, 40:365-373.
- 79.- Robert D. Reynolds, Van, R. potter, Henry Pittot. Response of several hepatic adaptative enzymes to a shift from low to high protein diet in intact and adrenalectomized rats. J. Nutr. 1971, 101:797-802.
- 80.- Greengard, O.
In mechanism of hormon action, G. Litwack. Vol.I pp 3-85, New York, Academic Press.
- 81.- Wurtman, R. J. Life Sciences 1974, 15:827-847.
- 82.- Viola, Magni, M.P., Magni, F. In moderns trends in aging Research, 1986, 147:141-146. John Libbey Eurofext Ltd.
- 83.- Peraino, C. Lamar, Jr., Pitot, H. C. Adv. Enz. Reg. 1966, 4:199-217.

84.- Yanage, S., Campbell, H.S., Potter, V. R.

Diurnal variations in activity of four pyridoxal enzymes in rat liver during metabolic transition from high carbohydrate to high protein diets. Life Science, 1975. 17:1411-1422.

85.- Servillo, G., Della Fazia, M. A. Variation of tyrosine aminotransferase expression during the days in rats of different ages. Biochem. Biophys. Res. Com. 1991, 175:104-109.

FENILALANINA HIDROXILASA.

86.- Kaufmann, S. Advances in Neurochemistry (Agranoff, B. M. y Aprison M. H.) Vol 2, pp 1-132. Plenum Press, New York.

87.- Cotton, R. G. H., Grattan, P. J.
Eur. J. Biochem, 1975, 60:427-430.

88.- Woo, S. L. C., Gillam, S.S., Woolf, L. I. Biochem. J. 1974, 139: 741-749.

89.- Friedman, R. A., Kaufmann, S. Biochim. Biophys. Acta. 1973, 293:56-61

90.- Abita, J.P., Blandin-Savoja, F., Rey, F. Biochem. Int. 1983, 7:727-737.

91.- Donlon, J., Kaufmann, S. J. Biol. Chem. 1980, 255:2146-2152

92.- Milstein, S., Kaufmann, S. J. Biol. Chem. 1975, 250:4782-4794.

93.- Donlon, J., Kaufmann, S. J. Biol. Chem. 1980, 255:2146-2154.

- 94.- Shiman, R., Gray, D. W. J. Biol. Chem. 1980, 255:4793-4797.
- 95.-Shiman, R., Jefferson, L. S. J. Biol. Chem. 1982, 257:839-845.
- 96.-Hasegawa, H., Kaufmann, S. J. Biol. Chem. 1982, 257:3084-3092.
- 97.-Haley, C. J., Harper, A. E. Metabolism. 1982, 31:524-532.
- 98.-Shiman, R. J. Biol. Chem. 1980, 255:10029-10036.

FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXYCINASA.

- 99.- Krebs, H. A. Bull Johns Hopkins 1954, 95:19-23.
- 100- Earl, Shrago., Henry, A. Lardy., Robert, C., Nordlie., David, O. Foster. Metabolic and hormonal control of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in rat liver. J. Biol. Chem. 1963, 238: 3188-3192.
- 101.- S. J. Pilkins., Claus, T. H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure-function relationships of sustrate cycle enzymes. Ann. Rev. Nutr. 1991, 11:465-515.
- 102.- Beale, E. G., Chrapkiewicz, N. B., Scoble, H. A., Metz, R. J., Quick, D. P., et al. Rat hepatic cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Structures of the protein, messenger RNA and gene. J. Biol. Chem. 1985, 260:10748-10760.
- 103.- Yoo-Warren, H., Monahan, J. E., Short, J., Short, H., Bruzel, A. Isolation and characterization of gene coding

- for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase(GTP) from the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, 80:3656-3660.
- 104.- Lardy, H. A., Foster, D. O., Young, J. W., Shrago, E., Ray, P.D. Hormonal control participating in gluconeogenesis and lipogenesis. J. Cell. Comp. Physiol. 1965, 66:39-54.
- 105.- Hopgood, M. F., Ballard, F. J., Reshef, L., Hanson, R. W. Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver and adipose tissues. Biochem. J. 1973, 134:445-453.
- 106.- Tilghman, S. M., Hanson, R. W., Reshef, L., Hopgood, M. F., Ballard, F. J. Rapid loss of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1974, 74:1304-1308.
- 107.- Beale, E. G., Katzen, C. S., Granner, D. K. Regulation of rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase messenger ribonucleic acid activity by N⁶,O² dibutyryl adenosine 3' 5' phosphate.
- 108.-Kioussis, D., Reshef, L., Cohen, H., Tilghman, S. M., Iynedjian, P.B., et al. Alterations in translatable messenger RNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver cytosol during deinduction. J. Biol. Chem. 1978, 253:4327-4332.
- 109.- Iynedjian, P. B., Hanson, R. W. Increase in level of functional messenger RNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase during induction by cyclic adenosine 3' 5'

monophosphate.

- 110.-Beale, E. G., Andreone, T., Koch, S., Granner, M., Granner, T. Insulin and glucagon regulate cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase RNAm in rat liver. *Diabetes*, 1984, 33:328-332.
- 112.- Andreone, T. L., Beale, E. G., Bar, R. S., Granner, D. K., Insulin decreases phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA activity by receptor-mediated process. *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 35-38.
- 113.- Gunn, J. M., Tilghman, S. M., Hanson, R. W., Reshef, L., Ballard, F. J., Effects of cyclic adenosine monophosphate, dexamethasone and insulin on phosphoenolpyruvate carboxykinase synthesis in Reuber H35 hepatoma cells. *Biochemistry*, 1975, 14:2350-2357.
- 114.- Gunn, J. M., Hanson, R. W., Meyuhos, O., Reshef, L., Ballard, F. J. Glucocorticoids on the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) in the rat. *Biochem. J.* 1975, 150:195-203.
- 115.- Sasaki, K., Cripe, T. P., Koch, S. R., Andreone, T. L., Petersen, D. D. et al. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin. *J. Biol. Chem.* 1984, 259:15242-15251.
- 116.- Salavert, A., Iynedjian, P. B. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase synthesis in rat liver

- cells. Rapid induction of specific mRNA by glucagon or cyclic AMP and permissive effect of dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 1982, 257:13404-13412.
- 117.- Y. Iynedjian, P. B., Salavert, A. Effects of glucagon, dexamethasone and triiodothyronine on phosphoenolpyruvate carboxykinase synthesis and RNAm level in rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* 1984, 145:489-497.
- 118.- Muller, M. J., Thomsen, A., Sibrowsky, W., Sitz, H. J., 3'5'3' triiodothyronine-induced synthesis of rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Endocrinology*, 1982, 111:1469-1475.
- 119.- Hoppner, W., Sussmuth, W., Seitz, H. J., Effect of thyroid state on cyclic AMP-mediated induction of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem. J.* 1985, 226:67-73.
- 120.- Loose, D. S., Cameron, D. K., Short, H. P., Hanson, R. W., Thyroid hormone regulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. *Biochemistry.* 1985, 24:4509-4512.
- 121.- Beale, E. G., Hartley, J. L., Granner, D. K. N^6, O^2 dibutyryl cyclic AMP and glucose regulate the amount of messenger RNA coding for hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 1982, 257: 2022-2028.
- 122.- Yoo-Warren, H., Cimbala, M. A., Felz, K., Monahan, J. E., Leis, J. P., Hanson, R. W. Identification of DNA clone to

- phosphoenolpyruvate carboxykinase from rat cytosol.
Alterations in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA
levels detectable by hybridization. J. Biol. Chem. 1981,
256:10224-10227.
- 123.- Yoo-Warren, H., Monahan, J. E., Short, J., Short, H.,
Bruzel, A. Isolation and characterization of the gene
coding for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase from
the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 1982, 79:5137-5141.
- 124.- Lamers, W. H., Hanson, R. W., Meisner, H. M. cAMP
stimulates transcription of the gene for cytosolic
phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982, 79:5137-5141.
- 125.- Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K., Beale, E.
Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate
carboxykinase gene by insulin. Nature, 1983, 305:549-551.
- 126.- Chrapkiewicz, N. B., Beale, E. G., Granner, D. K.
Induction of the messenger ribonucleic acid coding for
phosphoenolpyruvate carboxykinase in H4-II-E cells.
Evidence for a nuclear effect of cyclic AMP. J. Biol.
Chem. 1982, 257:14428-14432.
- 127.- Cladaras, C., Cottam, G. L. Turnover of liver pyruvate
kinase. Arch. Biochem. Biophys. 1980, 200:426-433.
- 128.- Short, J. M., Wynshaw-Bons, A., Short, H. M., Hanson, R. W.
Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase
promoter-regulatory region II. Identification of cAMP and
glucocorticoids regulatory domains. J. Biol. Chem. 1986.

261:9721-9726.

- 129.- Wynshaw-Bons, A., Lugo, T. G., Short, J. M., Fournier, R. E. K., Hanson, R. W. Identification of cAMP regulatory region in the gene for rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. Use of chimeric genes transfected into hepatoma cells. J. Biol. Chem. 1984, 259:12161-12169.
- 130.- Wynshaw-Bons, A., Lugo, T. G., Short, J. M., Loose, D. S. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter-regulatory region I. Multiple hormone regulatory elements and the effects of enhancer. J. Biol. Chem. 1986. 261:9714-9720.
- 131.- Fleig, W. E., Noether-Fleig G., Roeben, H., Ditschuneit, H. Hormonal regulation of key gluconeogenic enzymes and glucose release in cultured hepatocytes: effects of dexamethasone and gastrointestinal hormones on glucagon action. Arch. Biochem. Biophys. 1984, 229:368-378.
- 132.- Gunn, J. M., Hanson, R. W., Meyunas, O., Reshef, L., Ballard, F. J., Glucocorticoids and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the rat. Biochem. J. 1975, 150:195-203.
- 133.- Probst, I., Jungermann, K. The glucagon-insulin antagonism and glucagon-dexamethasone synergism in the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase in cultured rat hepatocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1983, 364:1739-1746.
- 134.- Wimmer, M. Effects of starvation and refeeding a high

- carbohydrate diet on the intra-acinar distribution pattern of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in the liver of male and female rats. *Histochemistry*, 1989b, 92:331-336.
- 135.- Crozier, G., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Girard, J., Peret, J. Metabolic effects induced by long-term feeding of medium chain triglycerides in the rat. *Mrtabolism*, 1987, 36:807-814.
- 136.- Peret, J., Foustock, S., Chanez, M., Bois-Joyeux, B., Robinson, J. L. Hepatic metabolites and amino acids levels during adaptation of rats to high protein, carbohydrate free diet. *J. Nutr.* 1981a 11:1704-1710.
- 137.- Bois-joyeux, B., Chanez, M., Azzout, B., Peret, J. Comparison between starvation and consumption of a high protein diet: plasma insulin and glucagon and hepatic activities of gluconeogenic enzymes during the first 24 hours. *Diabet. Metab.* 1986, 12:21-27.
- 138.- Reiser, M., Merting, J., Hoppner, W., Sietz, H. J. Zonalisierung des phosphoenolpyruvat carboxykinase in der rattenleber wahren der fruhen postnatalen entwicklung. Poster GASL annual Meeting, 1989, 20:21.1 Dusseldorf.
- 139.- Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Peret, J. Changes in rat hepatic fructose 2,6 biphosphate and 6 phosphofructo-2 kinase/fructose 2,6, biphosphate activity during three days of consumption of a high protein diet starvation. *Diabete Metab.* 1987, 13:543-548.

- 140.- Wimmer, M., Luttringer, Ch., Colombi, M. Changes in the acinar activity patterns of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of male and female rats upon feeding a high protein diet and high fat diet. *Histochemistry*, 1990, 93:257-262.
- 141.- Zigmond, M.J., W. J. Shoemaker, F. Lann, R. J. Wurtman. Hepatic tyrosine transaminase rhythm: Interaction of enviromental lighting, food consumption an dietary protein content. *J. Nutr.* 1969, 98::71-84.
- 142.- Foster, D.O., P. D. Ray, H. A. lardy. A paradoxical effect of L-tryptophan on the phosphoenol pyruvate carboxicinase of rat liver. *Biochem.* 1966, 5:563-571.
- 143.- Scriver, C. R., Clow, L. L. *Ann. Rev. Genet.* 1980, 14:179-202.
- 144.- Kwok, C. M., Ledley, F. D., G. Dilella, A., Robson, J. H. *Biochemistry*, 1985, 24:556-561.
- 145.- Wang, Y., L. DeMayo, J., M. Hahn, T., Finegold, M. J. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:15105-15110.
- 146.- Lidsky, S. A., Lia, Law., M. Morse, G. H., Kao, Fa-ten., Rabin, M., Ruddle, H. F., Woo, C. L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985, 82:6221-6225.
- 147.- Di Lella, G. A., Kwok, C. M., Ledley, D. F., Marvit, J., Woo, C. L. S. *Biochemistry*, 1986, 85:744-749.

MATERIALES Y METODOS.

- 148.- Chomczynski, P. Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162:156-159.
- 149.- Thomas, P. S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 5201-5205.
- 150.- Alwine, J. C., D. J. Kemp., G. R. Stark. Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzylxymethyl-paper and hibridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 5350-5359.
- 151.- Bresser, T., D. Gilliespie. Quantitative binding of covalently closed circular DNA to nitrocellulose in NaI. *Anal. Biochem.* 1983, 129:357-364.
- 152.- Summers, J. Physical map of polyoma viral DNA fragments produced by a cleavage with a restriction enzyme from *Haemophylus aegyptius* endonuclease R Hae III. *J. Virol* 1975; 15: 946-953.
- 153.- Kafatos, F. C., C. W. Jones., A. Efstratiadis. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acid Research.* 1979, 7:1541-1549.
- 154.- White, B. A., F. C. Bancroft. Cytoplasmic dot hybridization. Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. *J. Biol. Chem.* 1982, 257:8569-8574.