

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION INNSZ
DIVISION DE FISIOLOGIA DE LA NUTRICION

203

REGULACION HORMONAL DE LA EXPRESION
GENICA DE LA HISTIDASA Y DE LA
AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE
CADENA RAMIFICADA EN TEJIDOS DE RATA.

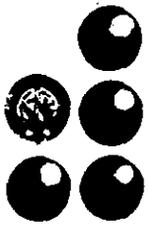
T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)**

P R E S E N T A

LIC. NUTR. GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS

TUTOR ACADEMICO: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO



INNSZ

MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

262789



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Nutriología Molecular de División de Nutrición del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la asesoría del Dr. Armando R. Tovar Palacio y la coasesoría de la Dra. Nimbe Torres y Torres y la Dra. Soledad De Santiago Martínez.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 3313 - M9308.

La beca para la realización de los estudios de maestría en ciencias biomédicas fue otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (D.G.A.P.A.) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A DIOS, gracias por permitirme seguir, por estar conmigo siempre en todo momento tanto de dicha como de tristeza, porque en ti he encontrado paz y apoyo cuando lo necesito:

**Sobre la arena de la playa
caminaba con el Señor....**

**En el firmamento se dibujaban
escenas de mi vida y en la arena
dos juegos de pisadas: uno era el mío,
el otro del Señor.**

**Cuando miré hacia atrás para ver
las huellas, noté que varias veces
a lo largo del camino de mi vida
había solamente un juego de pisadas
y esto había sucedido en los tiempos
más dolorosos y tristes de mi vida.**

Pregunté al Señor:

**Señor, me dijiste que cuando decidiera
seguirte, caminarías siempre a mi lado,
pero he notado que en los momentos
más difíciles hay solamente un par
de pisadas**

**Por qué cuando más te necesitaba
me abandonaste?**

El Señor me contestó:

**Hijo,
Te quiero y nunca, nunca te abandonaría;
cuando veas solamente un par de pisadas
es que yo te llevaba en mis brazos.**

A mis padres, el Ing. Gabriel Alemán Cortés y la Sra. Ma. del Carmen Escondrillas Serrano, por soportar todas mis locuras (una de las cuales ha sido esto), por apoyarme, por quererme....

A mis hermanos, Rafael Alemán y Ana Perla Mayoral porque aún estando lejos, siempre se encuentran conmigo brindándome apoyo, amistad y cariño.

A mi sobrino, Ian Carlo, simplemente por existir, por ser una pequeña parte de mi misma

A Alejandro Jiménez Orozco, por tu amistad, por compartir conmigo el sufrimiento, la tortura y las alegrías de las clases, por tus consejos y por la magia de tus cuentos, por tu siempre viva imaginación, por "EXCITABILIDAD CELULAR"!!!!... pero sobre todo, por todo este amor que ha ido creciendo día a día TE AMO.

Al Dr. Armando Tovar Palacio y la M.C. Nimbe Torres y Torres, por su paciencia, sus conocimientos, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, enseñándome la magia de la Biología Molecular. GRACIAS.

A la Dra. Soledad De Santiago Martínez, por siempre estar conmigo cuando te necesito, por ser mi amiga y mi maestra, por ser siempre un ejemplo a seguir, por ser lo que algún día espero ser, y este es el primer paso. TE QUIERO MUCHO.

A el Q.F.B. Euclides Avila Chávez, por tu amistad, tus conocimientos, tu apoyo, tu alegría, tus consejos y sobretodo por torturarme con tu canto y tu música.... Eres padrisimo!!!!

A Laura, Lariza, Gabriel y las dos Grises, por su siempre ayuda, por enseñarme tantas cosas, tanto en el trabajo como sobre la amistad. GRACIAS.

A Eviux, porque sin tu apoyo y ayuda, esto no sería posible. Gracias por siempre ayudarme en todo, por los momentos de "chisme" en la oficina, pero muy especialmente, gracias por la "brujería"....

A los Sres. Juan Antonio y Ma. Dolores Alba, por su apoyo incondicional en todos estos años: Mil Gracias!!!!

A la familia Mayoral Varela, porque a pesar de tener tan poco tiempo conociéndolos, me han enseñado el valor de Dios, del cariño y de la amistad.....

Al M.V.Z. Octavio Villanueva, por siempre apoyarme en el manejo de mis ratitas, sin las cuales esta tesis no hubiera podido llevarse a cabo.

A mis queridos amigos, Gaby, Lorena, Luis Miguel, Laura, Juan Ramón, Alejandra, Isneyda, Norma, Lety, las chicas "Ibero" y Gregorio porque un poquito de ustedes está aquí, por sus consejos y apoyo, en fin.... por soportarme en todos mis momentos a lo largo de tantos y tantos años. Los quiero mucho!!!

Agradezco muy especialmente a:

**Dr. Héctor Bourges Rodríguez
Dra. Rebeca Franco y Bourland
Dr. Felipe Vadillo Ortega
Dra. Martha Zentella de Piña**

por tomarse el tiempo de revisar la presente tesis y por sus atinados comentarios.

INDICE

	página
Indice	i
Indice de Figuras	iii
Resumen	v
1. Introducción	
1.1. Revisión de la Literatura	
1.1.1. Metabolismo de los aminoácidos	1
1.1.2. Efecto de la proteína dietaria sobre el metabolismo de aminoácidos y su relación con las hormonas ..	5
1.1.3. Características de la histidasa y la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada	9
1.1.4. Regulación de la expresión génica por nutrimentos y hormonas.....	13
1.1.5. Regulación hormonal de la expresión génica de enzimas degradadoras de aminoácidos	14
1.2. Planteamiento del problema	18
2. Hipótesis	19
3. Objetivos	20
4. Metodos	
4.1. Diseño del experimento	21
4.2. Material y metodos	22
4.2.1. Hidrocortisona	22
4.2.2. Glucagon	23
4.2.3. Efecto de una dieta alta en hidratos de carbono sobre la regulación de la histidasa	24
Procesamiento de tejidos	25
Preparación de sobrenadantes para los ensayos enzimáticos	26
Determinación enzimática de la histidasa	27
Determinación enzimática de la TAACR	28

	página
Obtención y purificación del cetoácido [1- ¹⁴ C]-CIC.....	29
Medición de la concentración de histidasa	30
Medición de la concentración de ARNm específicos de la histidasa y de la TAACR _m por Northern Blot	31
Preparación de la sonda de la HAL y la TAACR	32
Marcaje de la sonda de DNAC con α- ³² P dCTP	32
5. Análisis estadístico	33
6. Resultados	
6.1. Regulación de la expresión génica de la HAL por hidrocortisona y glucagon	
6.1.1. Ganancia de peso de las ratas	34
6.1.2. Actividad enzimática	36
6.1.3. Concentración de la histidasa	39
6.1.4. Concentración de ARNm específico de HAL	40
6.2. Regulación de la expresión génica de la TAACR por hidrocortisona y glucagon	
6.2.1. Ganancia de peso de los animales	42
6.2.2. Actividad enzimática	42
6.2.3. Concentración de ARNm específicos	44
6.3. Efecto de una dieta alta en proteína sobre la expresión de la HAL	
6.3.1. Ganancia de peso de los animales	48
6.3.2. Actividad enzimática de HAL	51
6.3.3. Concentración de HAL	52
6.3.4. Concentración de ARNm específicos	54
7. Discusión	56
8. Conclusiones	64
9. Bibliografía	65

INDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Principales sistemas involucrados en la regulación del metabolismo de aminoácidos	2
FIGURA 2. Metabolismo proteínico de los mamíferos	3
FIGURA 3. Vías metabólicas y transporte de aminoácidos a diferentes tejidos	4
FIGURA 4. Respuesta del metabolismo de aminoácidos a la ingesta de proteínas	5
FIGURA 5. Mecanismo de acción de hormonas peptídicas.....	7
FIGURA 6. Mecanismo de acción de hormonas esteroideas	8
FIGURA 7. Reacción catalizada por la histidasa	10
FIGURA 8. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada ..	12
FIGURA 9. Ganancia de peso de ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona	35
FIGURA 10. Ganancia de peso de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon	36
FIGURA 11. Actividad de la HAL en ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona	37
FIGURA 12. Actividad enzimática de la HAL en hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon	38
FIGURA 13. Concentración de la HAL en hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con hidrocortisona ó glucagon.....	39
FIGURA 14. Concentración de RNAm de HAL de hígado de ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona	40
FIGURA 15. Concentración de RNAm de la HAL de hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon	41
FIGURA 16. Actividad de la TAACR en tejidos de ratas alimentadas con 10% y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona ..	43
FIGURA 17. Actividad de la TAACR en tejidos de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon	44
FIGURA 18. Concentración de RNAm de TAACR de tejidos de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con hidrocortisona	45
FIGURA 19. Concentración de RNAm de TAACR de tejidos de ratas alimentadas con 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona	46

FIGURA 20. Concentración de RNAm de la TAACR en tejidos de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con Glucagon	47
FIGURA 21. Ganancia de peso de las ratas alimentadas con 80% de caseína y un cambio agudo a una dieta con 0% de caseína y tratadas con hormonas	49
FIGURA 22. Ganancia de peso de las ratas alimentadas con 80% de caseína y un cambio crónico a una dieta con 0% de caseína y tratadas con hormonas	50
FIGURA 23. Actividad de la HAL en hígados de ratas alimentadas con 80% de caseína y un cambio agudo y un cambio crónico a una dieta con 0% de caseína y tratadas con hormonas	51
FIGURA 24. Concentración de HAL en hígados de ratas alimentadas con 80% de caseína y un cambio agudo y uno crónico a una dieta con 0% de caseína y tratadas con hormonas	53
FIGURA 25. Concentración de RNAm de HAL en hígados de ratas alimentadas con 80% de caseína y un cambio agudo y crónico a una dieta con 0% de caseína y tratadas con hormonas	55

RESUMEN

La expresion de algunos genes puede ser regulada directamente por un nutrimento o indirectamente por un cambio hormonal producido por el nutrimento. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de las hormonas (hidrocortisona y glucagon) sobre la actividad y las concentraciones de protefna y de ARNm de dos enzimas degradadoras de aminoácidos, una hepática (HAL) y una extrahepática (TAACR). Diseño: Se estudiaron 99 ratas macho Wistar con un peso de 80-100 g que se dividieron en 13 grupos: Grupo HC-10%: ratas alimentadas *ad libitum* con una dieta baja en protefna (10% casefna) a las que se les inyectaron dos dosis diarias de 1 mg de hidrocortisona/100 g de peso durante 7 días. Grupo HC-18%: ratas alimentadas *ad libitum* con una dieta con un contenido adecuado de protefna (18% de casefna) y tratadas de la misma forma que el grupo anterior. Los grupos testigo (Testigo-10 y 18%) fueron ratas alimentadas exclusivamente con la dieta correspondiente e inyectadas con 100 μ l/100g de peso de propilenglicol (vehículo de la HC). Grupo G-10%: Ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 10% de casefna, a las que se les administraron 3 dosis diarias de 0.2 mg de glucagon/100 g de peso durante 4 días. El grupo testigo recibio 3 dosis diarias de NaCl 0.9%. Para evaluar el efecto de una dieta alta en hidratos de carbono sobre la regulacion de la HAL, los animales fueron alimentados con una dieta alta en protefna (80% de casefna) durante 9 o 16 días (Grupos 80%), para después cambiarles dicha dieta por una sin protefna y alta en hidratos de carbono por 1 o por 8 días (Grupos 0% y 0%C). En el último día de ser alimentadas con la dieta sin protefna se les administraron 4 dosis de hidrocortisona o de glucagon (Grupos 0%-H, 0%C-H, 0%-G y 0%C-G). Métodos: Se decapitaron las ratas a las 3, 6 y 12 horas posteriores a la última dosis de las hormonas y se obtuvieron muestras de hígado para la determinacion enzimática, Western y Northern blot de la HAL y de riñon, músculo esquelético y corazon para la actividad enzimática y concentracion de ARNm de la TAACR. Resultados: La inyeccion de glucagon o hidrocortisona a ratas alimentadas con una dieta baja en protefna (10% de casefna) aumento la actividad de la HAL, así como la cantidad de HAL y la concentracion de su ARNm. La hidrocortisona aumento la actividad y la concentracion de ARNm de la HAL en 100%, y 150% en la cantidad de enzima. No hubo diferencia significativa entre las 3, 6 y 12 horas después de la última administracion de hormona. El grupo HC-18% incremento en 44% la actividad de la HAL al compararlo con su respectivo grupo testigo. El glucagon indujo la concentracion de ARNm 6 veces, disminuyendo 60% después de 6 horas y 83% a las 12 horas después de la última dosis de glucagon. La cantidad de enzima y la actividad de la HAL aumento 3 veces después de 3 horas de la última inyeccion y disminuyo 43% después de 12 horas. La induccion de la expresion de la HAL por una dieta alta en protefna fue reprimida por una dieta alta en hidratos de carbono, sin protefna. La

administración de glucagón o de hidrocortisona no cambió el efecto de la dieta alta en hidratos de carbono. En cuanto a la TAACR, no se observó ningún efecto de glucagón o hidrocortisona en la actividad o concentración de ARNm de la misma. Conclusiones: Estos resultados indican que 1) la regulación de la expresión génica por glucagón e hidrocortisona es específica de tejido y de enzima. 2) el glucagón y la hidrocortisona incrementa la expresión del gen de la HAL a nivel pretraduccional, mientras que estas hormonas no tuvieron efecto sobre la TAACR, 3) el máximo efecto del glucagón sobre la HAL ocurre a las 3 horas después de aplicada la última dosis de hormona, mientras que con la administración de hidrocortisona no se observan diferencias en cuanto a tiempo de inducción y 4) una dieta alta en hidratos de carbono administrada durante 8 días después de una dieta con un alto contenido de proteína se observa un decremento considerable tanto en la actividad enzimática como en la concentración de HAL y de su ARNm.

1.INTRODUCCION:

1.1. Revisión de la literatura:

1.1.1. METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS:

Los organismos adultos generalmente se mantienen en un estado estable. La entrada constante de nutrimentos, el intercambio constante de energía y productos de deshecho permiten a los organismos adultos mantener una composición constante. Cuando el estado estable es perturbado por cambios en las circunstancias externas, como pueden ser cambios en las condiciones dietarias del individuo, los flujos de nutrimentos se alteran temporalmente y a través de rutas metabólicas individuales desencadenan mecanismos regulatorios que son intrínsecos para cada ruta. El efecto completo de estos ajustes es regresar al organismo al estado estable, es decir, lograr la homeostasis (1). La homeostasis del ambiente interno de los mamíferos se logra mediante una serie de mecanismos de retroalimentación entre varios tejidos (2).

Los principales sistemas responsables para el mantenimiento de la proteína corporal y homeostasis de los aminoácidos son la síntesis y la degradación de proteínas, la oxidación y la síntesis de aminoácidos en el caso de los aminoácidos dispensables. Los cambios en la velocidad de estos sistemas permiten un ajuste en el balance de nitrógeno, que puede permanecer en equilibrio o deteriorarse a un balance negativo dependiendo del grado en el cambio en la ingestión de proteína. La oxidación de aminoácidos se modifica rápidamente en respuesta a una ingestión de aminoácidos alterada; el cambio en la disponibilidad de sustratos parece ser determinante al menos inicialmente. Las enzimas degradadoras de aminoácidos también se ven afectadas, con alteraciones en su actividad específica. El efecto neto de estos factores es la conservación de aminoácidos y nitrógeno cuando la ingestión de proteínas es baja y, contrariamente, un incremento en la eliminación de nitrógeno cuando la ingestión es abundante. FIGURA 1. (2, 3).

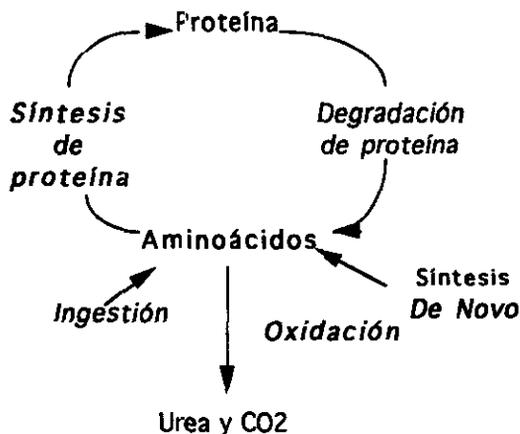


FIGURA 1. Principales sistemas involucrados en la regulación del metabolismo de aminoácidos (3)

Los aminoácidos están sujetos a una serie de reacciones metabólicas indicadas en la FIGURA 2. Aunque representan una serie compleja de pasos encadenados, se pueden agrupar estas reacciones en tres vías:

1. Parte de la poza de aminoácidos libres se incorpora a las proteínas tisulares. Debido al catabolismo de esas proteínas tales aminoácidos vuelven a la poza de aminoácidos libres después de un período de tiempo para ser así utilizados.

2. Parte de los aminoácidos libres experimentan reacciones catabólicas. Ello conduce a la pérdida del esqueleto carbonado en forma de CO_2 o queda disponible como glucogeno y grasa, mientras que el nitrógeno es eliminado en forma de urea.

3. Algunos aminoácidos libres se utilizan para la síntesis de nuevos compuestos de nitrógeno, tales como bases puricas, creatina y adrenalina. La degradación consecutiva de estos productos generalmente no va seguida del retorno de los compuestos finales a la poza de aminoácidos. Por otro lado, los aminoácidos dispensables se forman en el organismo usando grupos amino derivados de otros aminoácidos (4).

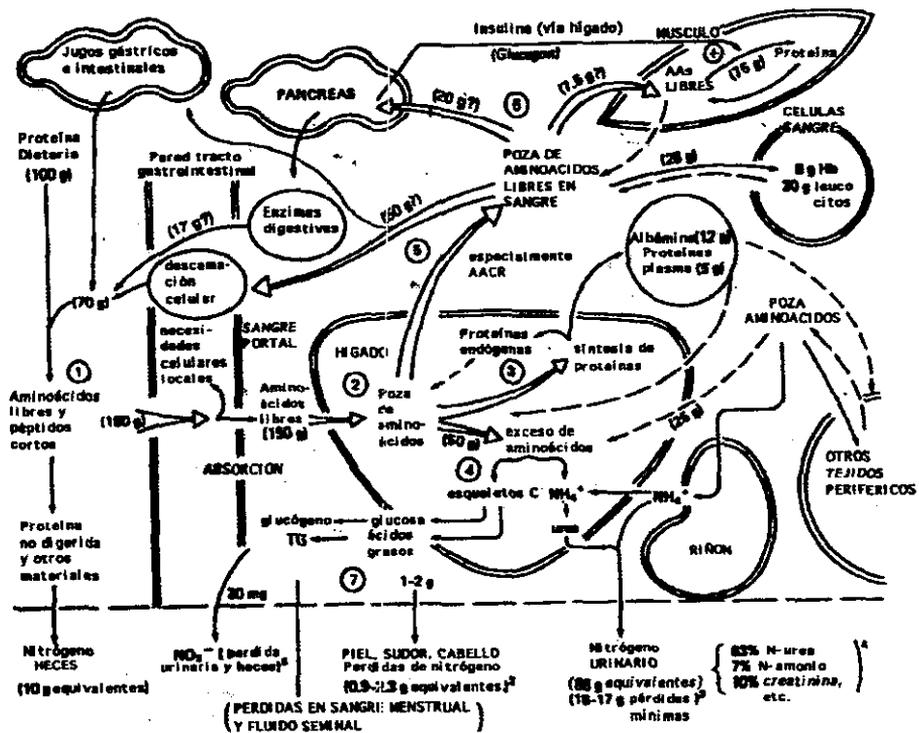


FIGURA 2. *Metabolismo proteico de los mamíferos . 1. Absorción de aminoácidos libres después de la digestión, 2. Captura de aminoácidos dietarios por el hígado, 3. Síntesis de proteínas hepáticas y plasmáticas, 4. catabolismo del exceso de aminoácidos, 5. distribución de a.a. al resto del cuerpo, 6. captura de aminoácidos por el músculo, páncreas y células epiteliales, 7. excreción del Nitrógeno de aminoácidos por diferentes vías (5).*

Se han identificado las diferentes vías metabólicas y el transporte de aminoácidos entre los diferentes tejidos del organismo (5, 6). Es notable la participación cooperativa de diferentes órganos como el intestino, hígado, riñón y músculo esquelético en determinar el destino de los aminoácidos libres que entran al organismo de fuentes tanto exógenas como endógenas. FIGURA 3.

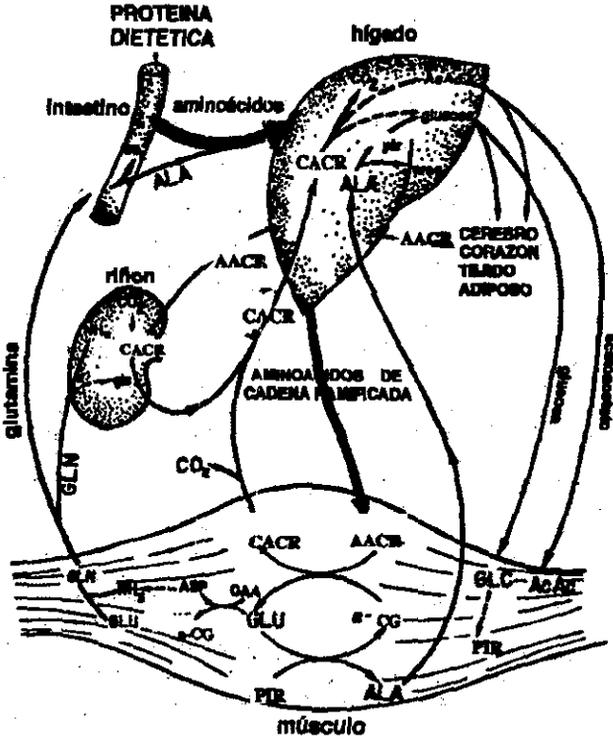


FIGURA 3. Vías metabólicas y transporte de aminoácidos a diferentes tejidos (5, 6). ALA= alanina, CACR= Cetóácidos de cadena ramificada, pir= piruvato, AACR= Aminoácidos de cadena ramificada, GLC= Glucosa, AcAc= acetoacetato, ASP= aspartato, OAA= oxaloacetato, α-CG= α-cetoglutarato.

Todos los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis son dependientes de los ajustes que se llevan a cabo en el sistema endocrino y de cambios en la actividad enzimática (2).

1.1.2. EFECTO DE LA PROTEINA DIETARIA SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOACIDOS Y SU RELACION CON LAS HORMONAS:

La FIGURA 4 muestra la respuesta del metabolismo de aminoácidos a la ingestión de diferentes concentraciones de proteína de la dieta tanto en animales como en el ser humano (3, 6-10).

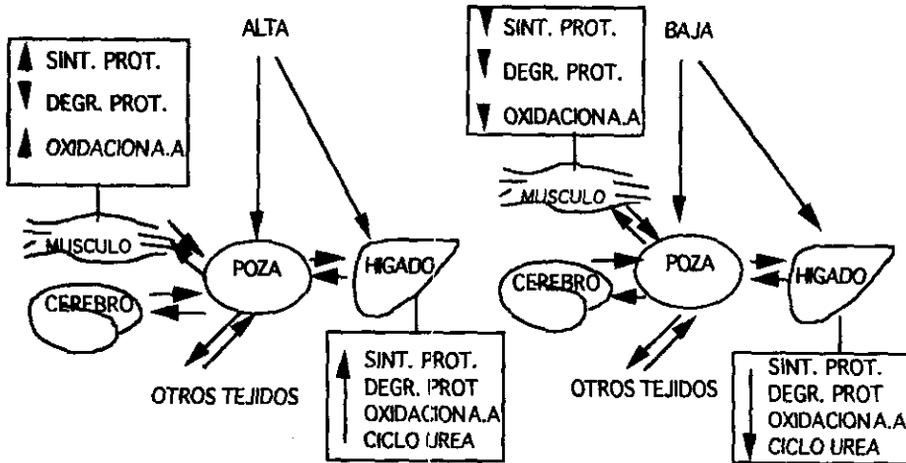


FIGURA 4. Respuesta del metabolismo de aminoácidos a la ingestión de proteínas .

La poza metabólica de los aminoácidos, considerada como la concentración de sustratos circulantes disponibles para su captación y utilización tisular, puede verse afectada por varios factores como es la oxidación de aminoácidos que juega un papel importante en respuesta a modificaciones en la ingestión de proteínas (11). Otro factor determinante es la disponibilidad de aminoácidos ya que las enzimas involucradas en su oxidación también se ven afectadas, presentando modificaciones en su actividad o en su concentración como respuesta a cambios en la concentración de proteínas o

aminoácidos de la dieta. Cuando la concentración de proteínas de la dieta está alterado, se afecta la disponibilidad de aminoácidos para las diferentes partes del cuerpo, variando el aporte de aminoácidos a los diferentes tejidos u órganos. Así, la mayoría de los aminoácidos indispensables sufren una intensa oxidación en el hígado, mientras que en otros tejidos es muy baja. La oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, valina y leucina) ocurre en tejidos extrahepáticos y principalmente en el músculo esquelético (4, 12), siendo la leucina el mejor sustrato para dicha oxidación en el músculo esquelético (13). Esto se debe a que el músculo constituye el 43% de la masa corporal mientras que el hígado representa sólo el 3%, el riñón el 1% y el cerebro el 1%.

La actividad de algunas enzimas involucradas en la oxidación de los aminoácidos se incrementa en respuesta a la ingestión elevada de proteínas, tal es el caso de las enzimas degradadoras de aminoácidos del hígado, incluyendo algunas aminotransferasas (5, 14). Las modificaciones en la actividad de estas enzimas a corto plazo pueden explicarse en base a la disponibilidad de sustrato, es decir, cambios en la concentración tisular de los aminoácidos que resultan en cambios paralelos en su oxidación (6, 15). Por otra parte, existe un mecanismo a largo plazo que incluye cambios en la expresión de genes que regulan la actividad de varias enzimas degradadoras de aminoácidos.

Este cambio en la expresión génica de estas enzimas puede ser regulado por un cambio hormonal causado por la ingestión de diferentes concentraciones de proteína. Los cambios hormonales tienen un papel esencial en la adaptación del individuo a la ingestión de proteínas y de energía (16).

Se ha demostrado que la concentración de algunas hormonas en el plasma de la rata (17), así como del ser humano (18) están influenciadas por la dieta. Conforme se eleva la concentración de proteína de la dieta, se eleva la concentración plasmática de T4, insulina, glucagón y corticoesterona, mientras disminuyen las de T3, norpinefrina y epinefrina (18). La ingestión de dietas inadecuadas produce cambios adaptativos en la estructura, función y composición enzimática de los tejidos para permitir la supervivencia más larga posible del organismo. Las hormonas median muchos de estos cambios enzimáticos; sin embargo algunos cambios son efecto directo de los nutrientes por sí mismos. Además de afectar la velocidad de secreción de las hormonas, cambiar la concentración de sustratos en el plasma pueden inducir efectos indirectos en el metabolismo, por ejemplo, el glucagón y la hormona del crecimiento, que se secretan en respuesta a la hipoglucemia, no sólo estimulan reacciones para regresar la concentración de glucosa sanguínea a la normalidad, sino también estimulan

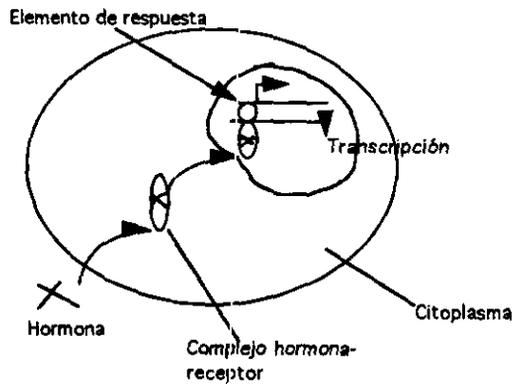


FIGURA 6. Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.

Los glucocorticoides, la insulina y el AMPc determinan la dirección del metabolismo de la glucosa en organismos superiores. Los glucocorticoides y el AMPc inhiben la oxidación de glucosa y promueven el catabolismo en tejidos periféricos, mientras que la insulina actúa en dirección metabólica contraria. En el hígado, los glucocorticoides y el AMPc estimulan la conversión de aminoácidos y triosas a glucosa, mientras que la insulina se contrapone a este efecto (22).

EFFECTO DE LOS CORTICOESTEROIDES: Cuando un animal se encuentra bajo estrés, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina que estimula a la pituitaria anterior para liberar corticotropina a la sangre; la corticotropina estimula la corteza adrenal para producir las hormonas corticoesteroides, que incluyen al cortisol, corticosterona y aldosterona. Diversos estudios han mostrado la acción catabólica de los glucocorticoides (23, 24), así como la inhibición de la síntesis de proteínas (25-28), un aumento en la movilización de aminoácidos (29) y estimulación en la gluconeogénesis hepática acompañado de un incremento de las enzimas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos (30, 31). Se han informado concentraciones elevadas o disminuidas de aminoácidos circulantes tanto en animales como en humanos después de la administración de glucocorticoides (32-35). Estas diferencias parecen estar relacionadas con el tiempo: la elevación inicial inducida por los glucocorticoides es consistente con el incremento en la movilización de aminoácidos de los tejidos periféricos. Posteriormente, disminuye la liberación de aminoácidos del músculo (36, 37).

EFFECTO DEL GLUCAGON: Por otro lado, la hormona peptídica glucagon es secretada por las células alfa de los Islotes de Langerhans del páncreas en condiciones de estrés, ansiedad (38), o en respuesta a ciertas condiciones dietarias, como el ayuno (39), especialmente como reguladora de la glucosa sanguínea en casos de hipoglicemia (40, 41). El glucagon estimula la gluconeogénesis, la producción de urea, la oxidación de aminoácidos y la cetogénesis, efectos que son antagónicos con aquellos producidos por la insulina (42, 43). El papel catabólico del glucagon en el metabolismo de las proteínas y los aminoácidos se ha estudiado ampliamente. Diversos investigadores han demostrado que tras una carga de aminoácidos se estimula la secreción de esta hormona, la cual disminuye la concentración de los aminoácidos gluconeogénicos, aumentando la de glucosa mediante un incremento en el transporte de esta última, en especial hacia el hígado, en donde aumenta su degradación (44-46). Se ha demostrado mediante medición de diferencias arteriovenosas que después de una dosis de glucagon el músculo esquelético de conejos en ayuno libera aminoácidos, lo que se refleja posteriormente en un incremento en la concentración de glucosa en la sangre arterial, y en una disminución en la de los aminoácidos (47). Así, después de disminuir el glucogeno hepático, disminuye la concentración de aminoácidos gluconeogénicos en la sangre, y posteriormente se liberan aminoácidos del músculo. Esto muestra la relación que tiene el hígado con el músculo esquelético para el mantenimiento de la glucosa en condiciones extremas (48, 49).

1.1.3. CARACTERISTICAS DE LA HISTIDASA Y LA AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA:

HISTIDASA: La histidasa (histidina-amonio liasa (HAL): EC 4.3.1.3.) cataliza la desaminación irreversible no oxidativa de histidina para formar ácido urocánico. FIGURA 7 (50).

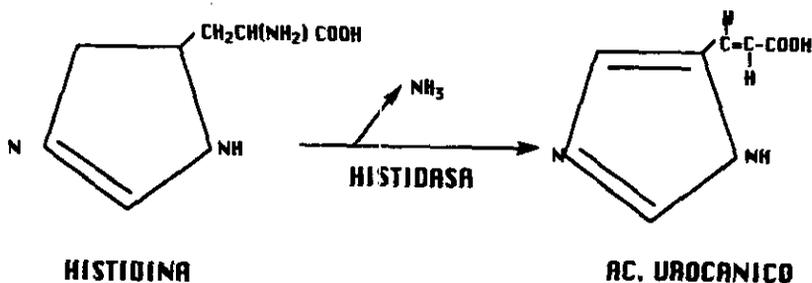


FIGURA 7. Reacción catalizada por la Histidasa. (50)

En mamíferos, la histidasa está localizada principalmente en el hígado, aunque también se ha registrado actividad en la epidermis (51). La enzima de ambos tejidos tiene la misma K_m y son inmunológicamente iguales, aunque tienen un patrón durante el desarrollo muy diferente. Mientras en el hígado va aumentando la concentración de la enzima, en la piel va disminuyendo conforme se va madurando hasta llegar al estado adulto (51). La deficiencia de la histidasa produce histidinemia, que resulta de la ausencia hereditaria de la enzima (52). En la histidinemia, la deficiencia de la histidasa produce la disminución del contenido de ácido urocánico en la piel, cuya función parece ser la de proteger al individuo de los rayos U.V, lo que llevaría a los pacientes a una mayor riesgo en el cáncer de la piel (53). En pacientes con histidinemia, la histidina es transaminada por una ruta alternativa en el hígado, para formar derivados de imidazol, cuyos metabolitos son encontrados en la orina. A pesar de esto, en la mayor parte de los casos conocidos de histidinemia, se ha observado un desarrollo normal del sujeto, y en muy pocos pacientes ha habido daño al sistema nervioso central. No hay evidencia de que la histidinemia sea perjudicial para el crecimiento, salud o desarrollo intelectual, por lo que la enfermedad se considera como "benigna" (54).

La histidasa tiene un peso molecular de aproximadamente 200 kDa, y está formada por 3 subunidades idénticas de aproximadamente 72 kDa cada una. La enzima tiene un pH óptimo de 8.5. Los valores de K_m para la L-histidina es de 2.0 mM a pH fisiológico (52), y la K_m de la histidasa de hígado de rata es de 3 mM (55).

Recientemente, el gen de la histidasa humana se asignó al cromosoma 12(q22-12q24.1) (56), y su ADNc también ha sido identificado (57, 58). El gen humano tiene

aproximadamente 25 kb y consiste de 21 exones. Su región promotora contiene secuencias homologas a sitios de unión de varios factores de transcripción específicos de hígado, que responden a glucocorticoides, así como sitios que responden a AMPc. El ADNc de la histidasa de rata (59) tiene 2.2 kb con un marco de lectura abierta (ORF) de 1971 pb que codifica para un polipéptido de 657 aminoácidos con una masa molecular deducida de 72,165 Da. La histidasa de rata tiene una homología de 41 y 43% con las histidasas de *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis* respectivamente y una homología de alrededor de 90% entre el ADNc de la histidasa humana y la de murino (58).

AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA (TAACR): La TAACR (EC 2.6.1.42.) cataliza la primera reacción reversible involucrada en la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) leucina, isoleucina y valina (60). Las rutas catabólicas de los tres AACR tienen características comunes entre sí, como la de compartir algunas de las mismas enzimas degradadoras. El primer paso en su degradación es una transaminación reversible catalizada por la TAACR que origina la formación de los correspondientes cetoácidos de cadena ramificada (CACR) (cetoisocaproato, cetometilvalerato y cetoisovalerato). Los cetoácidos formados sufren una descarboxilación oxidativa irreversible por medio de la deshidrogenasa de los cetóácidos de cadena ramificada (DCCR), cuyos productos son derivados de acil CoA menos un carbón, el cual es eliminado en forma de CO₂. Posteriormente las rutas siguen pasos enzimáticos específicos para cada acil derivado de CoA, y finalmente se generan productos que pueden entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El resto de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada ocurre por una serie de reacciones analogas a aquellas para la oxidación de ácidos grasos en el cual los productos finales del catabolismo de la leucina son acetoacetato y acetyl CoA, de la isoleucina es acetyl CoA y succinil CoA, y de la valina, succinil CoA (61). FIGURA 8 (62, 63).

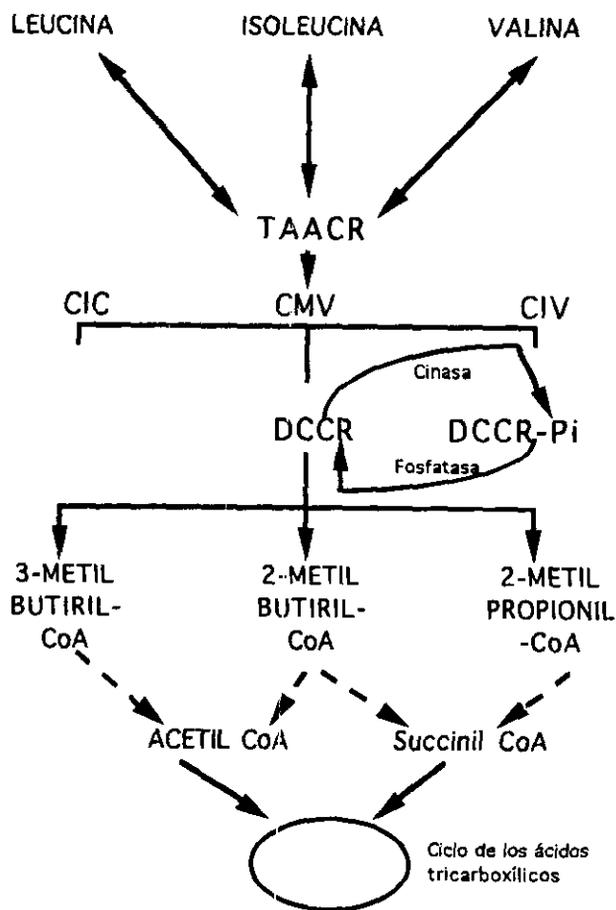


FIGURA 8. *Metabolismo de los Aminoácidos de Cadena Ramificada (62, 63). TAACR= Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada., DCCR= Deshidrogenasa de cetóácidos de cadena ramificada, CIC= a cetoisocaproato, CIV= a-cetoisovalerato, CMV= a-cetometil valerato.*

La TAACR es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal y acepta a los tres aminoácidos de cadena ramificada como sustratos [60], siendo el amino aceptor fisiológico, el α -cetoglutarato (63). La mayor actividad de la enzima se ha encontrado en el estómago, el páncreas y la glándula mamaria lactante, le siguen el corazón, el riñón y el músculo esquelético, y casi no la hay en hígado [62, 63-65]. Esta enzima tiene 2 formas: una citosólica (TAACRc) y una mitocondrial (TAACRm): La TAACRm es la forma más distribuida de esta enzima en tejidos de rata. La TAACRc se encuentra predominantemente en cerebro, ovario y placenta. Se ha reportado que en mamíferos estas dos formas enzimáticas representan isoenzimas separadas, debido a que son codificadas por dos genes de la TAACR independientes (63-66).

Los aminoácidos de cadena ramificada tienen efectos regulatorios únicos; la leucina estimula la secreción de insulina y se sabe que participa en la regulación de la síntesis y degradación de proteína (61). También se sabe que los aminoácidos de cadena ramificada que se acumulan en la sangre pueden competir con otros aminoácidos en su entrada al cerebro y por lo tanto influyen en las concentraciones de aminoácidos y de neurotransmisores, particularmente de serotonina, en el cerebro (61).

Ambas isoenzimas de la TAACR han sido purificadas (mitocondrial, 41 kDa y citosólica, 47 kDa) y sus ADNc han sido clonados recientemente (67-69) mostrando una secuencia de aproximadamente 410 aminoácidos, teniendo gran homología con las secuencias de ratón y de la levadura (69).

De manera diferente a las enzimas degradadoras del resto de los aminoácidos, la actividad de la TAACR no se eleva de manera tan notable al consumir una dieta alta en proteína, lo que indica que los mecanismos de regulación de esta enzima son diferentes a los del resto de las enzimas hepáticas degradadoras de aminoácidos (61, 70-73).

1.1.4. REGULACION DE LA EXPRESION GENICA POR NUTRIMENTOS Y HORMONAS:

En una ruta metabólica, el flujo unidireccional de un paso enzimático puede regularse controlando la cantidad de una enzima o su eficiencia catalítica, así como por la concentración de sustrato. La cantidad de enzima se controla regulando su síntesis y degradación (o ambos). El estado de nutrición y las hormonas regulan la síntesis de diferentes enzimas y, a su vez, la síntesis enzimática está controlada por la cantidad del ARNm o la eficiencia con la que éste es traducido (74-76).

Los nutrimentos, así como las hormonas también controlan la expresión de los genes (77, 78). Este control se da por una compleja red regulatoria en los que factores de

transcripción especializados llevan la señal a los genes blanco específicos. Muchos de estos factores de transcripción son proteínas de unión al ADN que se unen a las regiones regulatorias del ADN localizadas en *cis* en los genes blanco (79, 80). En los últimos años se ha identificado que componentes dietarios tales como los ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, glucosa, fructosa, minerales específicos como el hierro, y vitaminas liposolubles como el ácido retinoico intervienen en la expresión de ciertos genes. Los blancos de estos nutrimentos incluyen: a las proteínas nucleares y a los elementos que actúan en *cis* que regulan la transcripción; también a los eventos como el proceso de rompimiento-empalme y proteínas específicas que modifican la estabilidad del ARN y la velocidad de traducción del ARNm (81-85).

Se sabe que las enzimas degradadoras de aminoácidos son especialmente sensibles a cambios en la dieta, incrementando su actividad con una dieta alta en proteína y disminuyéndola con una dieta alta en hidratos de carbono y por lo tanto, baja en proteína. La concentración de proteína requerida para inducir cambios en las enzimas degradadoras de aminoácidos es variable de acuerdo con la enzima (86). Sin embargo, el efecto de la proteína dietaria y por lo tanto de los aminoácidos en la ruta de la expresión génica, en comparación con otros nutrimentos, ha sido poco estudiada.

Los nutrimentos pueden, de manera directa o indirecta, regular la vía de expresión de genes que codifican para diferentes enzimas. Los nutrimentos pueden actuar directamente o generar un estado hormonal específico en el organismo, y regular así la expresión de algunos genes (87).

1.1.7. REGULACION HORMONAL DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE AMINOACIDOS:

Los glucocorticoides participan, junto con la insulina y el AMP_c, en una compleja serie de reacciones que determinan la dirección del metabolismo de la glucosa en los organismos superiores (22). La administración de cortisona incrementa la excreción de nitrógeno por la pérdida de proteína del carcas, mientras que aumenta el contenido de proteínas del hígado y otras visceras. Los aminoácidos liberados como resultado del catabolismo de la proteína periférica son transportados al hígado, donde pueden ser utilizados en la síntesis de nueva proteína. Además se observa un aumento en el contenido de ácidos nucleicos del hígado, principalmente de ARN. Las respuestas a la cortisona y a la ingestión de proteína son similares, en cuanto a que ambas llevan a un incremento en la proteína hepática y de ARN. La administración de cortisona

aumenta la concentración de aminoácidos libres en el músculo, reduciendo la capacidad del músculo de concentrar aminoácidos, lo que parece ser el resultado de la inhibición de la síntesis de proteína (88). En general, la mayor parte de los efectos por la administración de corticoesteroides in vivo se deben a la administración continua de concentraciones relativamente altas de hormona durante varios días, especialmente en enzimas de la gluconeogénesis, como las aminotransferasas. La respuesta de estas enzimas a los glucocorticoides también muestra considerable variación en actividad dependiendo de la edad y de la condición fisiológica del animal al tiempo de la estimulación ambiental (16).

La tirosina aminotransferasa y la serina deshidratasa son dos enzimas degradadoras de aminoácidos ampliamente estudiadas. En fetos de rata se ha observado incremento hasta de 500% en la actividad de la serina deshidratasa (SDH) después de la administración de glucagon (89). La administración de glucagon o AMPc incrementó en 40 veces la incorporación de Leucina H³ a la misma enzima, mientras que la administración de cortisol no cambió la actividad enzimática de la SDH (90). Peraino mostró incremento en la actividad de la SDH por la administración de cortisona, y dependientes del regimen dietario previo al tratamiento (91, 92). Tambien Pitot y cols. mostraron que la inducción de la SDH por la dieta o por glucagon, cortisona o AMPc ocurre a nivel de la transcripción del gen y está regulada por elementos *cis* localizados en la región 5' (93-95). El gen de la SDH tiene diversos sitios que responden a glucocorticoides (GRE) lo que explica el incremento en la transcripción por la administración de glucocorticoides (96). Así mismo, Della Fazia y cols. mostraron que tras hepatectomía parcial tanto la expresión de SDH como la de Tirosina Aminotransferasa (TAT) aumentan, probablemente a consecuencia del incremento en las hormonas, particularmente glucagon y glucocorticoides (97). La TAT aumenta su actividad y la concentración de su ARNm desde 20% hasta 1200% dependiendo de la etapa fisiológica estudiada cuando se administra glucagon, AMPc o hidrocortisona (16, 98-105). En cultivos de células hepáticas, se mostró que la hidrocortisona (106), así como el glucagon y la dexametasona (107) actúan a nivel transcripcional en la síntesis de TAT. Muchos estudios han mostrado que la regulación de TAT también se debe a que el gen tiene diversos elementos de respuesta a glucocorticoides y a AMPc en su región reguladora antes del sitio de inicio de la transcripción (5') (108-115) En un estudio realizado por Onoagbe, se mostró que tanto el AMPc como el glucagon actúan a nivel pretraduccional en embriones de pollo *in ovo*, y que el AMPc actúa como segundo mensajero en el proceso de embriogénesis del pollo (116, 117).

En cuanto a la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR), se ha demostrado que la inyección de ratas con hidrocortisona incrementa 2 veces la actividad en la fracción del sobrenadante del hígado, mientras que la fracción mitocondrial permaneció constante, y en el riñón no se observó ninguna diferencia (13). Shirai e Ichihara (118) no observaron ningún cambio en la actividad de la TAACR de riñón y músculo al administrar a las ratas dos dosis de glucagon. Por otro lado, Mimura (119) *et al* , demostraron que la inyección a ratas con 2 mg de hidrocortisona/100 g P.C. durante 7 días incrementó ligeramente la actividad de TAACR en hígado y músculo y en el riñón no hubo cambios.

También se ha informado el efecto de hormonas sobre la actividad enzimática de la histidasa (HAL). La administración de cortisol a ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 12 o 18% de caseína aumenta la actividad enzimática de la HAL tanto en ratas testigo como en ratas adrenalectomizadas (120). Feigelson (121) observó que al administrar hidrocortisona a ratas macho jóvenes la actividad de la histidasa hepática aumenta, no así en machos maduros. En ratas hembra jóvenes la actividad aumenta mientras que en las maduras la hidrocortisona no cambió la actividad de la histidasa. En este estudio, la administración de actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de ARN, inhibió la estimulación por glucocorticoides, e igualmente la administración de cicloheximida y etionina, inhibidores de la síntesis proteica, también bloquearon la actividad de la histidasa que había sido inducida por el acetato de hidrocortisona. Otro estudio (122) ha demostrado que la administración de cortisol incrementa la actividad de la histidasa en 152% en comparación con ratas testigo. Morris *et al* (123) demostraron que en otra enzima del metabolismo de la histidina (Histidina-Piruvato Aminotransferasa) incrementa dos veces su actividad citosólica por efecto de la hidrocortisona, pero no hay efecto en su actividad mitocondrial en ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 12% de caseína. Lee y Harper (124) demostraron que la actividad de la HAL en ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 12% de caseína aumenta 3 veces al inyectárseles subcutáneamente 3 dosis diarias de glucagon durante 10 días; ellos mismos demostraron que en ratas alimentadas con una dieta libre de proteína y tratadas con glucagon ó AMPc hay un incremento del 75% en la actividad de la HAL (125). Por otro lado, Feigelson (121) observó que la actividad de HAL en ratas macho tratadas con glucagon se incrementaba 2 veces tanto en jóvenes como en maduras, mientras que en el caso de las hembras únicamente se incrementó la actividad en las jóvenes. Otros estudios mostraron que la administración de glucagon ó AMPc a ratas macho estimula la actividad de la HAL, así como la concentración de proteína en

167% y 122%, respectivamente. También observaron que el glucagon y el AMPc aumentan la síntesis de la enzima, al medir la incorporación de [1-¹⁴C]-Leucina en la histidasa después de la administración de las hormonas (122, 126). Morris y colaboradores (123) observaron que la actividad de la Histidina-Piruvato Aminotransferasa mitocondrial en ratas tratadas con glucagon y AMPc, aumenta 70 y 48 veces, respectivamente, mientras que la citosólica sólo aumenta 16 y 9 veces, respectivamente.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se conoce que el consumo de dietas con un alto contenido de proteína incrementan tanto la actividad, la concentración de enzima HAL y de su ARNm (127). Por otro lado, se ha establecido que este incremento está asociado al consumo total de proteína dietaria y no exclusivamente a la concentración de histidina (127). Esto hace pensar que la regulación de la expresión del gen de la histidasa está mediada por hormonas y no por el sustrato específico de la HAL. Cuando se consumen dietas con un elevado contenido de proteína se produce un aumento en la concentración de glucagon circulante en plasma, así como de glucocorticoides (17, 18). Por lo tanto es lógico pensar que la expresión génica de la histidasa esté regulada por la presencia de estas dos hormonas, o de alguna de ellas, por lo que el administrarles dichas hormonas a ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas permitirá establecer si el glucagon o la hidrocortisona median la expresión del gen de la HAL.

La histidina es un aminoácido gluconeogénico debido a que al final de su catabolismo se produce glutamato (62). Se conoce que otras enzimas denominadas gluconeogénicas reprimen su actividad cuando hay presencia de glucosa (90-92, 95, 124, 128-130). Esto lleva a la posibilidad de establecer si una dieta con un elevado contenido de hidratos de carbono es capaz de reprimir la inducción del gen de la histidasa.

Por otro lado, la TAACR es una enzima cuya expresión se comporta de manera diferente a la de la HAL: Dietas altas en proteína no producen cambios en la actividad de esta enzima (131). Por lo que se podría esperar que su expresión no se viera afectada por el glucagon o la hidrocortisona.

2. HIPOTESIS:

La administración de hidrocortisona produce un incremento en la actividad enzimática, cantidad de enzima y en la concentración de ARNm específico de la histidasa, mientras que esto no sucede con la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada en ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 10% de caseína.

El cambio de una dieta alta en proteína, baja en hidratos de carbono a una dieta alta en hidratos de carbono-sin proteína produce un efecto inhibitorio de las hormonas hidrocortisona y glucagon y por lo tanto disminuye la actividad enzimática de la histidasa, así como la concentración de enzima y de ARNm específico de la misma.

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Establecer si la actividad enzimática, la cantidad de enzima y las concentraciones de ARNm específicos de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada en ratas están reguladas por la hidrocortisona y por glucagon.

Establecer la interacción existente entre la relación proteína-hidratos de carbono en la dieta y el efecto de la hidrocortisona y el glucagon en la actividad enzimática de la histidasa y en la concentración de los ARNm específicos de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada en tejidos de rata.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer si la administración de hidrocortisona o glucagon estimula la actividad enzimática de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada en tejidos de ratas.

2. Establecer si la administración de hidrocortisona o glucagon está asociada con un incremento en la cantidad de enzima medida por Western blot y con un aumento en la concentración de los ARNm específicos de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada en tejidos de ratas.

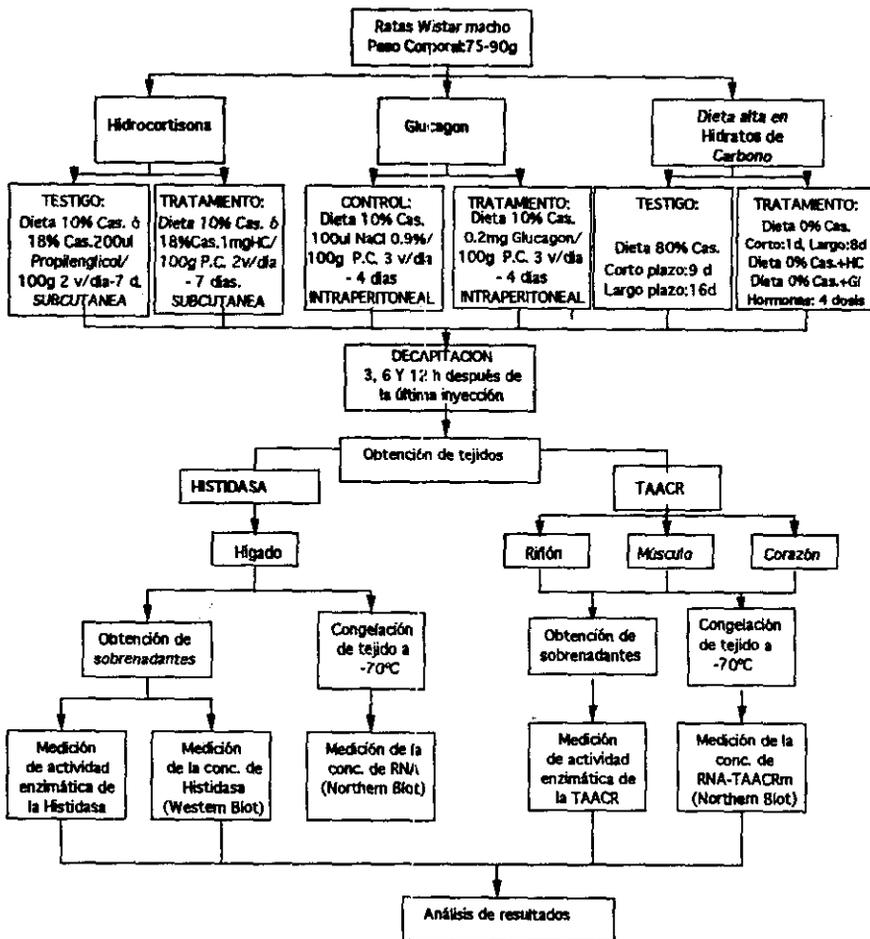
3. Establecer la curva de tiempo de la inducción de la actividad enzimática y de la concentración de los ARNm específicos de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada después de la administración de hidrocortisona o glucagon.

4. Establecer si la regulación de la expresión génica de la histidasa y de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada por hidrocortisona o por glucagon es específica de enzima y de tejido.

5. Establecer el efecto de la hidrocortisona y de glucagon en ratas alimentadas con una dieta alta en hidratos de carbono sobre la actividad enzimática y la regulación de la expresión del ARNm específico de la histidasa.

4. METODOS:

4.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO:



4.2. MATERIAL Y METODOS:

4.2.1. EFECTO DE LA HIDROCORTISONA:

ANIMALES:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 75-90g obtenidas del Bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, las cuales fueron mantenidas en las siguientes condiciones: ciclo de luz-obscuridad de 12 hs (obscuridad 1900 a 0700 h, luz 0700 a 1900 h), a temperatura constante de 21° C y alimentadas con una dieta en polvo. Durante el estudio los animales dispusieron de agua y alimento a libre demanda. Las ratas fueron colocadas en jaulas individuales y pesadas diariamente durante la duración del estudio.

DIETAS:

Las dietas se administraron en forma seca y contenían, en g/100g de peso, caseína libre de vitaminas, 10 ó 13; mezcla de vitaminas, 0.5; aceite de maíz, 5; mezcla de minerales, 5; sacarosa, 39.5 ó 35.8; almidón de maíz, 39.5 ó 35.8; colina 0.2. A la dieta baja en proteínas (10% de caseína) se le agregaron metionina 0.2 y , treonina 0.4 para mejorar la calidad de la proteína utilizada..

TRATAMIENTOS:

Se utilizaron 48 ratas que fueron distribuidas en 2 diferentes grupos experimentales y sus 2 respectivos grupos testigo. Los grupos fueron los siguientes:

Grupo HC-10%: 12 ratas alimentadas *ad libitum* por 14 días con la dieta baja en proteína (10% de caseína), se les inyectaron dos dosis subcutáneas diarias de 1 mg de hidrocortisona/ 100 g de peso corporal durante 7 días (90, 120, 122).

Grupo testigo HC-10%: 12 ratas alimentadas de la misma manera que su grupo experimental (Grupo HC-10%), pero se les administraron 100 µl /100 g de peso corporal de propilenglicol, por ser el vehículo de administración de la hidrocortisona.

Grupo HC-18%: 12 ratas alimentadas *ad libitum* por 14 días con dieta con contenido de proteína adecuado (18% de caseína) a las que se les administraron las mismas dosis de hidrocortisona a la descrita por el grupo HC-10%.

Grupo testigo HC-18%: 12 ratas alimentadas de la misma manera que su grupo experimental (HC-18%) con el mismo tratamiento que el descrito para el grupo control HC-10%.

El día programado para el sacrificio, las ratas fueron decapitadas a diferentes tiempos después de la última inyección de la hormona: 4 ratas fueron sacrificadas a las 3 horas (t3), 4 ratas a las 6 horas (t6), y 4 ratas a las 12 horas (t12) después de la última dosis de hormona.

4.2.2. EFECTO DE GLUCAGON:

ANIMALES: Las características de los animales fueron las mismas que las descritas para los grupos tratados con hidrocortisona (apartado 4.2.1.)

DIETAS: Las ratas fueron adaptadas a consumir la dieta en forma seca durante 5 días antes de iniciar el experimento. La dieta tenía un contenido de proteína de 10% (caseína). La dieta contenía en g/100g de peso lo siguiente: Caseína 10; mezcla de vitaminas, 0.5; aceite de maíz, 5; mezcla mineral, 5; sacarosa, 39.5; almidón de maíz, 39.5; metionina, 0.2 y treonina, 0.4.

TRATAMIENTOS:

Se distribuyeron aleatoriamente 24 ratas en un grupo experimental y su respectivo grupo testigo de la siguiente manera:

Grupo G-10%: 12 ratas alimentadas *ad libitum* durante 14 días con una dieta con un bajo contenido de proteína (10% de caseína) inyectadas intraperitonealmente con tres dosis diarias de 0.2 mg/100 g P.C. de glucagon durante 4 días (90, 122, 124, 125, 129).

Grupo testigo G-10%: 12 ratas alimentadas de la misma manera que G-10%, pero inyectadas con 3 dosis intraperitoneales diarias de 100 μ l/100 g P.C.de NaCl 0.9% durante 4 días.

El día programado para ello, las ratas fueron decapitadas a diferentes tiempos después de la última inyección de la hormona: 4 ratas fueron decapitadas 3 horas después de la última dosis, 4 ratas a las 6 horas y 4 ratas a las 12 horas.

4.2.3. EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN HIDRATOS DE CARBONO SOBRE LA REGULACION DE LA HISTIDASA:

ANIMALES: Las características de los animales fueron las mismas que las descritas en el apartado 4.2.1.

DIETAS: Las ratas fueron adaptadas a la dieta en polvo durante 9 días antes de iniciar el experimento. La dieta contenía inicialmente 80% de caseína, para después cambiarla a la dieta con contenido de 0% de caseína. La dieta contenía en g/100g de peso lo siguiente: Caseína, 80 ó 0; respectivamente; mezcla de vitaminas, 0.5; aceite de maíz, 5; mezcla mineral, 5; sacarosa, 4.8 ó 44.5 respectivamente; almidón de maíz, 4.8 ó 44.5 respectivamente, y metionina, 0.2 y treonina, 0.4 para la dieta con 0% de caseína.

TRATAMIENTOS:

Se distribuyeron 27 ratas alimentadas con una dieta alta en proteína (80% de caseína) durante 9 días de la siguiente manera:

TRATAMIENTO A CORTO PLAZO:

- 3 ratas permanecieron con la dieta al 80% de caseína. (Grupo 80%)
- 3 ratas alimentadas con una dieta sin proteína (0% de caseína) durante 24 hs, previamente alimentadas con 80% de caseína (Grupo 0%)

- 3 ratas alimentadas con una dieta con 0% de caseína y previamente alimentadas con una dieta con 80% de caseína, inyectadas con 4 dosis de 1mg/100 g P.C. de hidrocortisona (Grupo 0%-H) el último día de dieta.
- 3 ratas alimentadas con una dieta con 0% de caseína, previamente alimentadas con 80% de caseína, inyectadas con 4 dosis de 0.2 mg/100 g P.C. de glucagon (Grupo 0%-G) el último día.

TRATAMIENTO A LARGO PLAZO:

- 3 ratas alimentadas con una dieta con 80% de caseína durante 16 días (Grupo 80%C)
- 3 ratas alimentadas con una dieta sin proteína (0% de caseína) durante 8 días, previamente alimentadas con una dieta al 80% de caseína durante 8 días (Grupo 0%C)
- 3 ratas alimentadas con una dieta sin proteína (0% de caseína) durante 8 días, previamente alimentadas con una dieta al 80% de caseína, inyectadas con 4 dosis de 1mg/100 g P.C. de hidrocortisona (Grupo 0%C-H) el último día.
- 3 ratas alimentadas con una dieta sin proteína (0% de caseína) durante 8 días, previamente alimentadas con una dieta al 80% de caseína, inyectadas con 4 dosis de 0.2 mg/100 g P.C. de glucagon (Grupo 0%C-G) el último día.

El día programado para ello, las ratas fueron decapitadas 3 horas después de la última dosis de las hormonas por ser el tiempo en el que se encontró mayor actividad en la histidasa tras realizar la experimentación correspondiente a las ratas de los apartados 4.2.1. y 4.2.2.

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS:

De todas las ratas se obtuvieron los siguientes tejidos:

- a) Hígado: Para medir de la actividad enzimática de la histidasa (HAL).
- b) Riñón, corazón y músculo esquelético: Para medir la actividad enzimática de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR).

De cada tejido se tomaron 0.2 g por duplicado y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para la extracción posterior de ARN total. El resto de los tejidos se lavaron en NaCl 0.9% para eliminar el exceso de sangre y se conservaron en hielo para preparar los sobrenadantes para la posterior medición de la actividad enzimática de ambas enzimas.

PREPARACION DE SOBRENADANTES PARA LOS ENSAYOS ENZIMATICOS:

HISTIDASA:

HIGADO: El hígado se homogenizó en amortiguador de MgCl_2 14mM y KCl 0.6 mM en Tris-HCl 10 mM , pH 7.4 en relación 1:4 (P/V), con un homogenizador Polytron Kinematica modelo PT-2000. Posteriormente se centrifugó a $105\ 000 \times g$, durante 60 minutos en tubos de policarbonato de 10.4 ml (16 x 76 mm) en una ultracentrifuga Beckman XL-90 utilizando el rotor Ty65.

AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA:

RIÑONES: Los riñones se limpiaron y se cortaron para despojarlos de la médula. Posteriormente, se homogenizaron con un homogenizador Potter en una solución inhibidora/MSE que contenía (para 100 ml): 200 μl de EDTA 0.5M, 200 μl de EGTA 0.5M, 5000 μl de Benzamidina 0.1M, 1000 μl de DTT 0.5M, 500 μl de DIFP 200 mM, 1000 ml de Leupeptina 1mg/ml, 1000 μl de Tritón X-100 y 91.1 ml de MSE, en relación 1:4 (P/V) . El homogenado se centrifugó a $45\ 350 \times g$ durante 60 minutos en tubos de policarbonato de 18 x 98 mm en una centrifuga Beckman J2-MC utizando el rotor JA-20.1. El sobrenadante resultante se utilizó para medir la actividad de la TAACR.

CORAZON Y MUSCULO ESQUELETICO: El corazón y el músculo se homogenizaron con Polytron Kinematica modelo PT-2000 a la mínima velocidad por 5-10 seg., en la misma solución que los riñones.

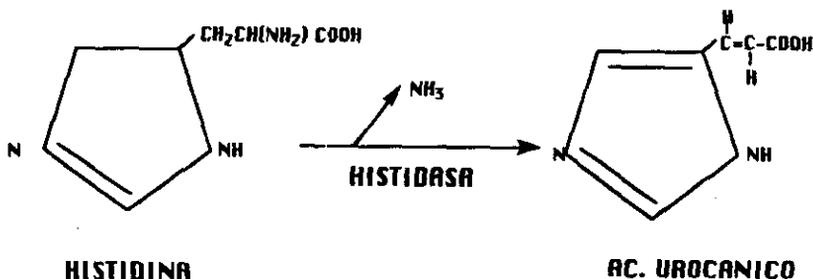
Todos los sobrenadantes fueron guardados a -80°C para su posterior análisis de actividad enzimática y de concentración de protefna.

MEDICIONES ENZIMATICAS:

ACTIVIDAD DE LA HISTIDASA, HISTIDINA-AMONIO LIASA (E.C.

4.3.1.3., HAL): (132)

Reacción:



Fundamento: Para la medición de la actividad enzimática de la HAL se utilizó un ensayo espectrofotométrico basado en la aparición de ácido urocánico utilizando como sustrato la L-histidina (132).

El cambio en la absorbancia se midió a 277 nm en intervalos de 30 segundos durante 10 minutos con un espectrofotómetro Beckman (mod. DU 640).

DEFINICION DE UNIDAD Y ACTIVIDAD ESPECIFICA: Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima capaz de transformar 1mmol de sustrato en producto (ácido urocánico) por minuto a 25°C. La actividad específica se expresa en unidades por minuto por mg de proteína. La concentración de proteína se midió por el método de Biuret utilizando como patrón albúmina de suero bovino (133).

Para los cálculos de actividad enzimática de la histidasa se utilizó el coeficiente de extinción molar de $18\ 600\ M^{-1}$ (a 277 nm) para el ácido urocánico, de tal manera que:

$$A = \epsilon b C$$

$$C = A / \epsilon (l)$$

Donde: A= Absorbancia, ϵ = coeficiente de extinción molar, b= dimensión de la celda y C=concentración (en moles/l).

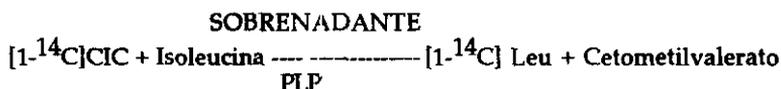
$$C = [(1/18\ 600) \times 3] 1000$$

Donde 3= volumen total del ensayo y 1000= conversión de moles a mmoles
Por lo tanto, el factor para la obtención de mmoles/ min de ácido urocánico

Por lo que: Actividad enzimática de HAL = Cambios en la Absorbancia x 161.3 (mmolas de ácido urocánico/min).

ACTIVIDAD DE LA AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA: (67)

Reacción:



Fundamento: La reacción se basa en la formación de leucina a partir del $[1-^{14}\text{C}]$ CIC utilizando como aminodonador a la Isoleucina en presencia de la enzima que se encuentra en el sobrenadante.

La medición de la actividad de la TAACR se hizo por duplicado.

La reacción se llevó a cabo en un tubo de ensaye de 12 x 75 mm que contaba con un brazo lateral (tubos T) conectado a un vial de líquido de centelleo, el cual contenía 1 ml de la mezcla de metilcelosolve + 2-aminoetanol (2:1) que sirvió como trampa para capturar el $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante la reacción. Cada tubo se colocó dentro de otro vial que contenía agua y todo esto se colocó en una base en un baño a 37°C. La actividad se midió a 37°C en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.8 que contenía CHAPS al 0.4%, fosfato de piridoxal 2.5 mM, DTT 5mM, agua desionizada y sobrenadante de los tejidos a determinar. La reacción se inició al añadir 50 μl de la mezcla Isoleucina/ $[1-^{14}\text{C}]$ CIC (Isoleucina 12 mM y $[1-^{14}\text{C}]$ cetoisocaproíco 1 mM). Se paró la reacción con acetato de sodio 2M pH 3.4. Los tubos T se agitaron en un agitador orbital a 105 rpm durante 90 minutos. Se tomó una alícuota y se colocó en un vial que contenía líquido de centelleo. Finalmente, se procedió a contar la radioactividad en un contador líquido de centelleo Wallac 1411.

DEFINICION DE UNIDAD Y ACTIVIDAD ESPECIFICA: La unidad se define como 1 nmol de leucina formada por minuto a 37°C. La actividad específica se expresa en nmol de $[1-^{14}\text{C}]$ leucina por minuto por mg de proteína. La medición de proteínas se realizó por el método de Biuret utilizando como patrón la albúmina de suero bovino (133).

OBTENCION Y PURIFICACION DEL CETOACIDO [1-¹⁴C] α -CETOISOCAPROICO:

El cetoácido de cadena ramificada utilizado en la medición de la actividad enzimática de la TAACR se obtuvo a partir de [1-¹⁴C] Leucina por el metodo descrito por Rudiger *et al* (134).

MEDICION DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA POR WESTERN BLOT: (135)

Para medir la concentración de la enzima primero se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas en base a su peso molecular, y posteriormente se electrotransfirió a una membrana de PVDF y se estableció la presencia de la enzima por medio de anticuerpos anti-histidasa (anti-HAL) según el método descrito por Maniatis (135) y Walker (136).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE): La electroforesis se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes (con SDS, β -mercaptoetanol y calentamiento a ebullición de las muestras durante 4 minutos) con el objeto de romper todas las interacciones no covalentes en la proteína nativa y reducir los puentes disulfuro. La cantidad de proteína que se aplicó en los geles fue de 100 μ g por pozo, en solución amortiguadora de la muestra (Tris-SDS-glicerol- β -mercaptoetanol), usando azul de bromofenol al 0.5% como marcador del frente de corrida. En el mismo gel se depositaron marcadores de bajo peso molecular (Low Molecular Weight Markers, Bio Rad Laboratories, USA) en amortiguador de la muestra. Los marcadores de bajo peso molecular son las siguientes proteínas: Fosforilasa B (97.2 kD), albúmina de suero bovino (BSA, 66.2 kD), aldolasa (39.2 kD), triosa fosfato isomerasa (26.6 kD), inhibidor de tripsina (21.5 kD) y lisozima (14.4 kD).

MEDICION DE LA CONCENTRACION DE HISTIDASA:

TRANSFERENCIA DEL GEL A LA MEMBRANA: Después de la electroforesis de 20 µg de la proteína pura y de los sobrenadantes de hígado de rata obtenidos anteriormente, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm de poro (Bio Rad Laboratories, USA) en una cámara vertical para transferencia (Hoefer mod. TE 50X) con una solución de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% como amortiguador de transferencia. Esta transferencia se realizó con un voltaje de 100 V y una corriente de 1.5 A, durante 2 horas a temperatura ambiente, con recirculación de agua y agitación magnética constante. Para verificar la eficiencia de la transferencia se tiñó el gel con azul de Coomassie para asegurarse que no hubiera bandas de proteínas.

WESTERN BLOT: Después de la transferencia de las proteínas, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche descremada "Svelty" (Nestlé-México) al 10% en PBS-Tween durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante, con el objeto de bloquear los sitios libres de la membrana en los cuales no se unieron las proteínas.

Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween, 3 minutos por lavado, con agitación constante. La membrana de nitrocelulosa se colocó en una bolsa de plástico (Kapak/Scotchpak) y se selló con calor después de la adición del antisuero anti-HAL obtenido en conejo (137, 138) en una dilución 1:50 en PBS-Tween, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 en PBS-Tween del conjugado anti-IgG de conejo obtenido en cabra marcado con peroxidasa de rábano (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.). La membrana se lavó 5 veces con PBS-Tween como se describió anteriormente. Para revelar el sitio donde ocurrió la reacción antígeno-anticuerpo entre la proteína (histidasa) y los anticuerpos presentes en el suero obtenido del conejo inmunizado, la membrana de nitrocelulosa se puso en una solución reveladora de la peroxidasa (4-cloro-1-naftol y H₂O₂), hasta la aparición de las bandas (5-10 minutos). La reacción enzimática de la peroxidasa se detuvo colocando la membrana de nitrocelulosa en un recipiente con agua desionizada durante 10 minutos. La membrana se secó a temperatura ambiente y se guardó en una bolsa de plástico para su conservación.

MEDICION DE LA CONCENTRACION DE ARNm ESPECÍFICOS DE LA HISTIDASA (ARNm-HAL) Y DE LA AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA MITOCONDRIAL (ARNm-TAACRm) POR NORTHERN BLOT:

La extracción del ARN total se realizó utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi (139).

Se trataron 200 mg de tejido congelado a -80°C con solución desnaturalizante (Tiocinato de Guanidina, citrato de sodio, sarcosil, 2-mercaptoetanol), acetato de sodio 2 M pH 4 y agua saturada con fenol. Después se continuó la extracción con una solución alcohol isoamílico-cloroformo (1:49). Se centrifugó por 20 minutos a 9000 rpm a 4°C (centrifuga J2-MC rotor JA 20) y el ARN se precipitó agregando isopropanol al 100%. Las muestras se incubaron por 30 minutos a -20°C y se volvieron a centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C . El botón de ARN se disolvió con solución desnaturalizante y se precipitó con isopropanol al 100% por 30 minutos a -20°C . Nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C , se resuspendió el botón de ARN en 1 ml de etanol al 75%, se incubó de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente para disolver los residuos de guanidina que contaminan el botón. Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. El botón de ARN se disolvió en 300 μl de agua tratada con DEPC. Para la obtención de un ARN más puro se procedió a hacer lo siguiente:

a) Se hizo una extracción con fenol cloroformo y se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm en frío.

b) Se tomó el sobrenadante y se agregó un volumen igual de alcohol isoamílico cloroformo (49:1) y se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm por 10 minutos.

c) Se tomó el sobrenadante y se agregaron acetato de amonio ó sodio 3M pH 6 más etanol absoluto y se dejó toda la noche a -20°C .

Al día siguiente, el ARN se centrifugó en frío durante 20 minutos a 14000 rpm. Se deshechó el sobrenadante y se agregó etanol al 70%. Se centrifugó en frío 10 minutos y el pellet se resuspendió en agua DEPC. La muestra se midió en el espectrofotometro en un barrido del espectro entre 230 y 300 nm, y se obtuvo su relación de absorbancia a 200 y 280 nm.

PREPARACION DE LA SONDA DE LA HAL Y LA TAACR: (148)

Para obtener las sondas correspondientes fue necesario tener células competentes y los ADN_c contenidos en el plásmido p-Bluescript (pHAL y pTAACR). Se transformaron las células competentes con el pHAL o pTAACR; las células transformadas se cultivaron en medio Luria que contenía ampicilina, posteriormente una de las colonias aisladas se resembró en medio líquido de Luria, y se aislaron los plásmidos por método de lisis alcalina.

PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES (E.Coli XL-1 Blue con CaCl₂): Se requirió cultivar las células de E. Coli a una fase Log, para después concentrarlas por centrifugación y resuspenderlas en una solución de CaCl₂: La exposición a los iones calcio ocasiona que las células se hinchen y puedan capturar más fácilmente el ADN_c contenido en un plásmido después de un choque térmico (148).

DIGESTION DEL PLASMIDO BLUESCRIPT KS(-) QUE CONTIENE EL ADN_c DE HAL O DE TAACR CON ENZIMAS DE RESTRICCION: La enzima de restricción adecuada para HAL fue Eco-R1, produciéndose 3 fragmentos al cortarla: 3.0 kb (plásmido), 1.95 kb (de -10 a + 1930 de pHAL) y 240 bp (de + 1938 a + 2182). El fragmento que se utilizó como sonda fue el de 1.95 kb ya que no tiene cola de poliA (para evitar hibridación con cualquier ARN). En cuanto a la TAACR, las enzimas de restricción adecuadas fueron Pst-1 y Eco-R1 y se obtuvieron 2 fragmentos al cortarla: Uno de 900 pb y el otro de 2700 pb, siendo el de 900 pb el que se utilizó como sonda.

MARCAJE DE LA SONDA DE ADN_c CON α -³²P dCTP: Las sondas utilizadas se marcaron radioactivamente con ³²P por la técnica de iniciadores al azar utilizando el kit de Amersham, "REDIPRIME", la cual consiste en alinear oligonucleótidos al azar con la sonda (³²P -CTP), la cual se desnaturaliza 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 nucleótido (149).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los valores de las actividades enzimáticas se expresan como promedios \pm error estándar de la media (SEM). El manejo de los datos se realizó utilizando el programa Statview versión 5.1 de Macintosh, y se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, y cuando la hubo, las diferencias entre tratamiento de grupos se probaron con la prueba PLSD de Fisher. El nivel de significancia fue de: $p < 0.05$.

6. RESULTADOS:

6.1. REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LA HISTIDASA (HAL) POR HIDROCORTISONA Y GLUCAGON:

6.1.1. GANANCIA DE PESO .

EFECTO DE LA HIDROCORTISONA.

La FIGURA 9 muestra los cambios en la ganancia de peso de los grupos de ratas alimentadas con 10% y 18% de caseína y de los grupos tratados con hidrocortisona. El peso corporal inicial (g) de las ratas del grupo HC-10% fue de 81.9 ± 0.764 y el de su grupo testigo fue de 83.27 ± 0.868 , y para el grupo HC-18% el peso corporal inicial fue de 78.37 ± 1.202 y el de su grupo testigo fue de 77.48 ± 1.56 . El peso corporal (g) de las ratas al final de los tratamientos fue de: 134.79 ± 2.08 para el grupo HC-10% y de 138.77 ± 4.58 para su grupo testigo, de 131.67 ± 2.72 para el grupo HC-18% y de su grupo testigo fue de 151.34 ± 3.56 . No se encontraron diferencias significativas en el peso inicial entre los grupos, pero el peso corporal fue significativamente menor para el grupo HC-18% al compararse con su testigo al final del tratamiento. La ganancia de peso total fue de 52.9 g para el grupo HC-10% y de 55.5 g para su grupo testigo; para el grupo HC-18% fue de 53.3 g y de su grupo testigo fue de 68.1. La ganancia de peso por día fue de 3.77, 3.96, 3.81 y 4.86 g para los grupos HC-10%, testigo-HC-10%, HC-18% y testigo HC-18%, respectivamente.

La velocidad de ganancia de peso total fue de 4.36 g/ día para el grupo testigo-10%, de 4.15 g/d para el grupo HC-10%, de 5.69 g/d para el grupo testigo 18% y de 3.8 g/d para el grupo HC-18%.

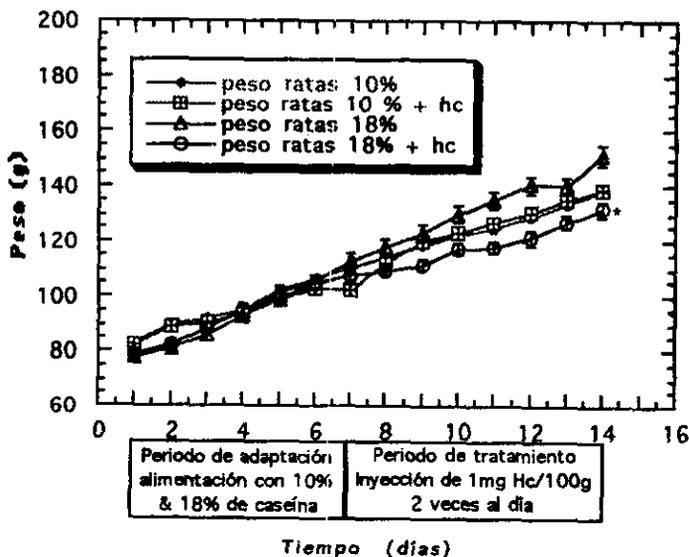


FIGURA 9. Ganancia de peso de ratas alimentados con 10 y 18% de caseína y tratados con hidrocortisona. * $p < 0.05$ al compararse con su respectivo grupo testigo (18%).

EFECTO DEL GLUCAGON.

El peso corporal inicial (g) de los animales inyectados con glucagon fue de 79.18 ± 1.066 y el de su grupo testigo fue de 82.66 ± 1.205 . El peso corporal al final del tratamiento fue de 107.64 ± 2.12 para G-10% y el de su grupo testigo de 113.65 ± 2.13 , no habiendo diferencia estadística significativa entre los grupos. La ganancia de peso total fue de 28.46g y de 30.99 g para el grupo alimentado con 10% de caseína y para el inyectado con glucagon, respectivamente. La velocidad de ganancia de peso total fue de 3.75 g/d para el grupo testigo, y para el grupo G-10% de 3.97 g/d. FIGURA 10.

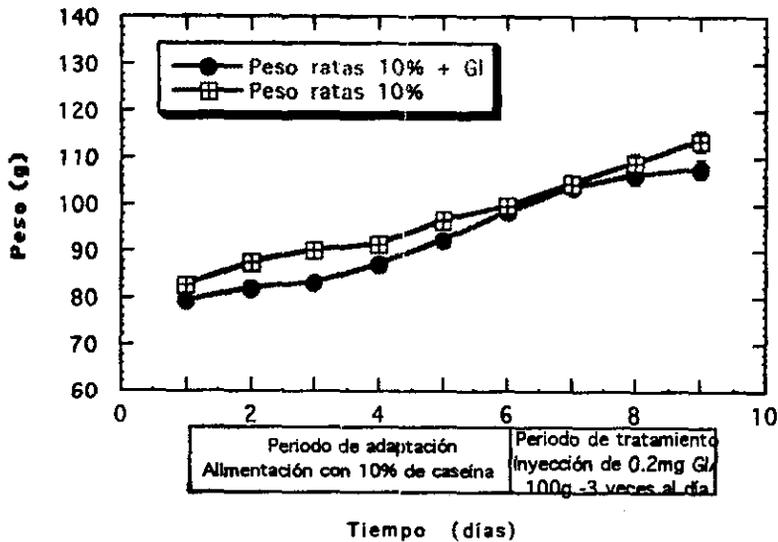


FIGURA 10. Ganancia de peso de las ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon.

6.1.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA.

Se midió la actividad de histidasa a las 3, 6 y 12 horas después de la administración de la última dosis de hidrocortisona. No se encontró diferencia significativa entre los diferentes tiempos, por lo que para los subsecuentes estudios se midió la actividad de histidasa después de 3 horas de la última inyección de hidrocortisona. Esta respuesta fue independiente del tipo de dieta consumida.

La actividad de la histidasa (HAL) del grupo de ratas alimentadas con 10% de caseína (C-10%) fue de 0.248 ± 0.022 nmolas/min/mg proteína, mientras que la actividad de histidasa para el grupo de 18% de caseína (C-18%) fue de 0.449 ± 0.106 nmolas/min/mg proteína, 81.5% mayor que el grupo alimentado con 10% de caseína, lo

que indica que al aumentar la ingestión de proteína aumenta la actividad de HAL.

El grupo de ratas alimentadas con 10% de caseína e inyectadas con hidrocortisona (HC-10%) presentó un aumento del 100% en la actividad de esta enzima con respecto al grupo C-10% ($p < 0.0001$). Sin embargo la actividad de HAL del grupo alimentado con una dieta al 18% e inyectado con hidrocortisona incrementó un 44% con respecto a su grupo testigo. Estos resultados y los descritos por Harper (130,150) indican que a mayor concentración de proteína ingerida en la dieta menor el efecto de la hormona, por lo que para poder observar el efecto de la hidrocortisona se debe alimentar a las ratas con una dieta baja en proteína.

Sin embargo se observó que la actividad de HAL en el grupo HC-18% fue 30% mayor que el grupo HC-10%. FIGURA 11.

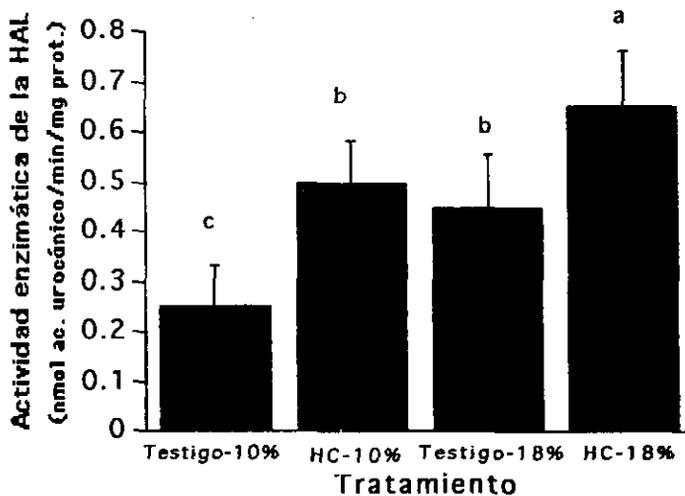


FIGURA 11. Actividad de la histidasa en ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas : b vs c y a vs c : $p < 0.0001$, a vs c: $p < 0.01$.

EFECTO DEL GLUCAGON.

La actividad enzimática de HAL del grupo testigo fue de 0.30 ± 0.022 U/min/mg de proteína, mientras que la actividad enzimática del grupo inyectado con glucagon (G-10%) después de 3 horas de la última dosis de hormona fue de 1.015 ± 0.064 U/min/mg de proteína, de 1.148 ± 0.071 U/min/mg de proteína después de 6 h de la última dosis de hormona y de 0.659 ± 0.092 después de 12 h de la última dosis de hormona. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) al compararse los tiempos 3 h y 6 h con el tiempo 12, pero no hubo diferencia al compararse el tiempo 3 h con el tiempo 6 h. El incremento en la actividad de HAL fue de 3.0, 3.2 y 1.6 veces en ratas inyectadas con glucagon (después de 3, 6 y 12 horas de la última inyección) comparado con el grupo testigo. FIGURA 12.

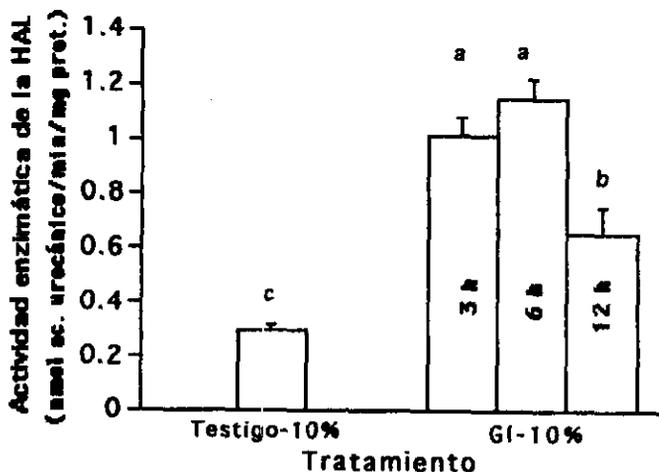


FIGURA 12.

Actividad enzimática de la histidasa en hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas : a vs c: $p < 0.05$, a vs b: $p < 0.05$, b vs c: $p < 0.05$.

6.1.3. CONCENTRACION RELATIVA DE LA HISTIDASA DE HIGADO EN RATAS ALIMENTADAS CON 10% DE CASEINA Y TRATADAS CON HIDROCORTISONA Y GLUCAGON:

Se midió la concentración relativa de la histidasa de hígado por Western Blot en las ratas alimentadas con una dieta con un contenido de 10% de caseína, ratas alimentadas con la misma dieta y tratadas con hidrocortisona ó con glucagon, sacrificadas a las 3 horas después de la última dosis de cualquiera de las hormonas. Se utilizaron las muestras correspondientes a este tiempo debido a que fue el tiempo de máxima inducción de la enzima por el glucagon. Se observó un incremento de un 1.5 veces en las ratas tratadas con hidrocortisona y de 4 veces en las ratas tratadas con glucagon, ambas comparadas con el grupo testigo (alimentadas exclusivamente con 10% de caseína). FIGURA 13.

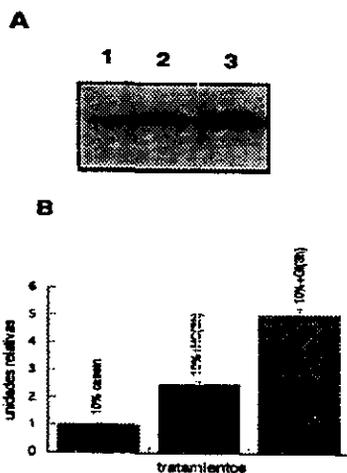


FIGURA 13. Concentración relativa de histidasa en sobrenadantes de hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con hidrocortisona ó glucagon. A) Análisis por Western Blot para la cuantificación de histidasa de ratas alimentadas con 10% de caseína (1), 3 horas después de la última inyección con hidrocortisona (2) y con glucagon (3). B) Medición en unidades relativas de la cuantificación de histidasa.

6.1.3. CONCENTRACION RELATIVA DE ARNm ESPECÍFICO PARA LA HAL

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA. La concentración del ARNm específico de la histidasa incrementó aproximadamente 120% tanto en el grupo HC-10% como en el grupo HC-18% con respecto a su grupo testigo. FIGURA 14.

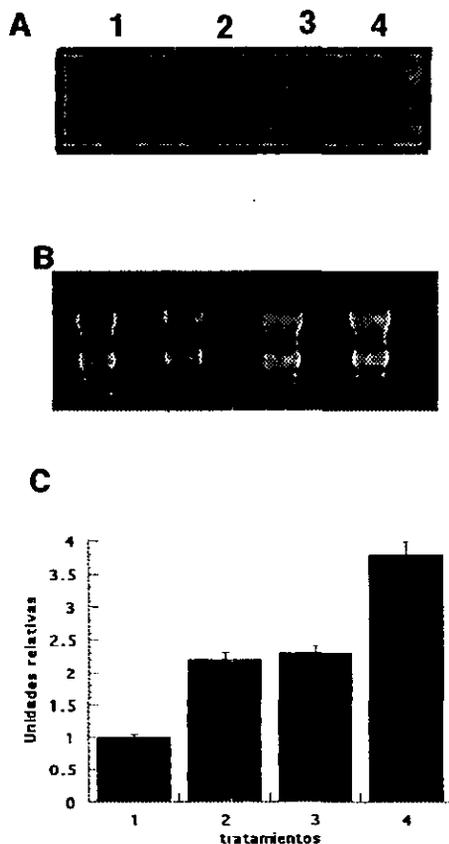


FIGURA 14. Concentración relativa de ARNm de la histidasa de hígado de ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona. A) Análisis por Northern Blot en ratas alimentadas con 10% de caseína (1), ratas alimentadas con 10% de caseína e inyectadas con hidrocortisona (2), ratas alimentadas con 18% de caseína (3) y ratas alimentadas con 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona (4). B) Gel de agarosa 8% teñido con Bromuro de Etidio. C) Cuantificación por densitometría de la concentración del ARNm de la histidasa en unidades relativas .

EFFECTO DEL GLUCAGON. La concentración relativa de ARNm de HAL se incrementó 6.2 veces 3 horas después de la última dosis de glucagon con respecto al grupo testigo, disminuyendo 60% después de 6 horas y 83% después de 12 horas con respecto al tiempo 3 h. En cuanto al tiempo 12 h no se observó diferencia estadística significativa al compararse con el grupo testigo. FIGURA 15.

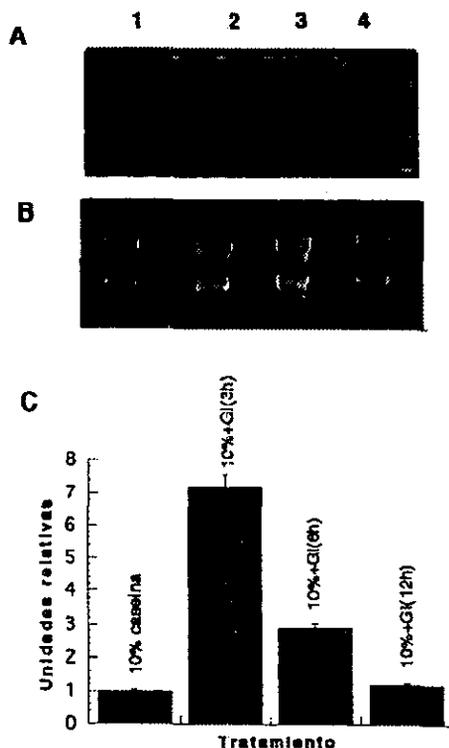


FIGURA 15. Concentración relativa de ARNm de la histidasa de hígados de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon. A) Análisis por Northern blot para la cuantificación de ARNm de la Histidasa en hígado de ratas alimentadas con 10% de caseína (1), 3 horas (2), 6 horas después (3) y 12 horas después de la última dosis de glucagon (4). B) Electroforesis del ARN total en gel de agarosa con formaldehído y teñido con bromuro de etidio. C) Concentración de ARNm de HAL expresado en unidades relativas.

6.2. REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LA AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA(TAACR) POR HIDROCORTISONA Y GLUCAGON.

6.2.1. GANANCIA DE PESO.

La ganancia de peso de estas ratas es la misma que la informada anteriormente en las figuras 9 y 10.

6.2.2. ACTIVIDAD ENZIMATICA.

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA. La actividad de TAACR fue significativamente mayor en el corazón y el riñón que en el músculo ($p < 0.05$). La actividad de TAACR del riñón en el grupo inyectado con hidrocortisona fue de 12.314 ± 0.397 nmol/min/mg de proteína, mientras que la del grupo testigo HC-10% fue de 12.097 ± 0.637 nmol/min/mg de proteína. La actividad de TAACR para el corazón fue de 11.668 ± 0.846 nmol/min/mg de proteína, mientras que la de su grupo testigo fue de 11.931 ± 0.751 nmol/min/mg de proteína. Para el músculo esquelético, la actividad específica fue de 9.284 ± 1.013 nmol/min/mg de proteína mientras que la actividad para el grupo testigo fue de 9.087 ± 0.810 nmol/min/mg de proteína. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas. FIGURA 16.

La actividad de TAACR en el riñón del grupo inyectado con hidrocortisona y alimentado con 18% de caseína fue de 13.103 ± 0.599 nmol/min/mg de proteína, la del grupo testigo HC-18% fue de 12.515 ± 0.881 nmol/min/mg de proteína. Para el músculo esquelético la actividad fue de 7.383 ± 1.101 nmol/min/mg de proteína y la del grupo testigo fue de 7.673 ± 0.744 nmol/min/mg de proteína. En cuanto a la actividad específica del corazón para el grupo HC-18% se observó de 12.733 ± 0.673 nmol/min/mg de proteína y la del grupo testigo de 13.023 ± 0.704 nmol/min/mg de proteína. No hubo diferencias significativas en la actividad de la TAACR en las ratas alimentadas con 10 o 18% de caseína. FIGURA 16.

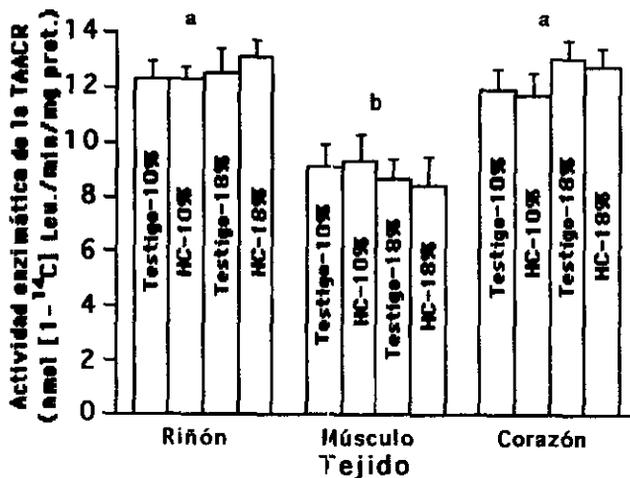


FIGURA 16. *Actividad de la Aminotransferasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada en tejidos de ratas alimentadas con 10 y 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas: a vs b: $p < 0.05$.*

EFECTO DEL GLUCAGON. Como se puede observar en la FIGURA 17 la actividad enzimática de la TAACR fue mayor en el corazón, seguida por el riñón y el músculo esquelético. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado con glucagon y su grupo testigo. La actividad de TAACR para el riñón de ratas inyectadas con glucagon (G-10%) fue de 8.157 ± 0.191 nmol/min/mg de proteína, para el grupo testigo fue de 9.047 ± 0.353 nmol/min/mg de proteína. Para el músculo esquelético fue de 9.318 ± 0.493 nmol/min/mg de proteína para el grupo G-10%, para el testigo fue de 8.114 ± 0.676 nmol/min/mg de proteína. En cuanto al corazón, la actividad específica para el grupo G-10% fue de 15.099 ± 1.782 nmol/min/mg de proteína, y para el grupo testigo fue de 17.044 ± 0.883 nmol/min/mg de proteína.

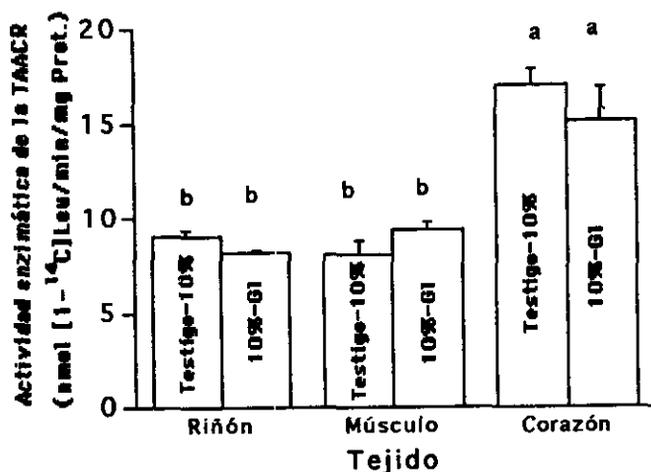


FIGURA 17. Actividad de la Aminotransferasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada en tejidos de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas: a vs b: $p < 0.05$.

6.2.3. CONCENTRACION RELATIVA DE ARNm ESPECIFICO DE LA TAACRm.

EFFECTO DE LA HIDROCORTISONA. El corazón presentó la mayor expresión del ARNm de la TAACRm. La concentración de ARNm en el riñón fue 10% menor que en el corazón, y el músculo presentó la menor expresión de TAACRm siendo 50% menor que el corazón. La concentración de ARNm de la TAACR mitocondrial no mostró diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las dietas estudiadas ó por la acción de hidrocortisona o glucagon. FIGURAS 18 Y 19.

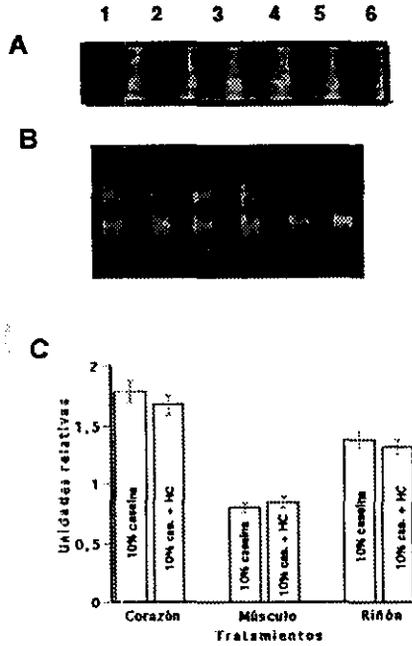


FIGURA 18. Concentración relativa de ARNm de la Aminotransferasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada en tejidos de ratas alimentadas con 10 % de caseína y tratadas con hidrocortisona. A) Análisis por Northern Blot de corazón de ratas alimentadas con 10% de caseína (1) y tratadas con hidrocortisona (2), de músculo de ratas con el mismo tratamiento dietario que (1) (3) y tratadas con hidrocortisona (4), y de riñón (5) y tratadas con hidrocortisona (6). B) Electroforesis en gel de agarosa con formaldehído y teñido con bromuro de etidio. C) Concentración de ARNm de la TAACR expresado en unidades relativas.

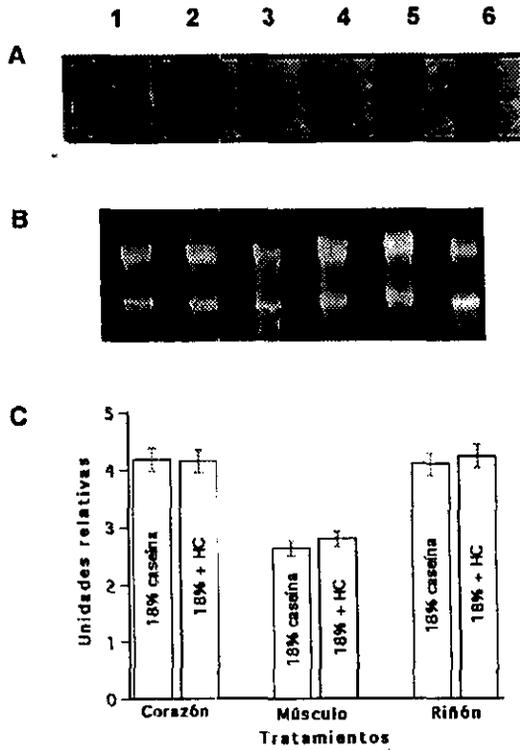


FIGURA 19.

Concentración relativa de ARNm de la Aminotransferasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada en tejidos de ratas alimentadas con 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona. A) Análisis por Northern Blot de corazón de ratas control (1), y tratadas con hidrocortisona (2), de músculo de ratas con control (3), e inyectadas con hidrocortisona (4), y de riñón control (5) e inyectadas con hidrocortisona (6). B) Electroforesis de ARN total en gel de agarosa con formaldehído y teñido con bromuro de etidio. C) Concentración de ARNm de la TAACRM expresado en unidades relativas.

EFFECTO DEL GLUCAGON. La concentración relativa de ARNm de TAACR mitocondrial fue similar entre el grupo G-10% y el grupo testigo para corazón, músculo y riñón, observándose una mayor concentración para el corazón, seguido por el riñón y el músculo. FIGURA 20.

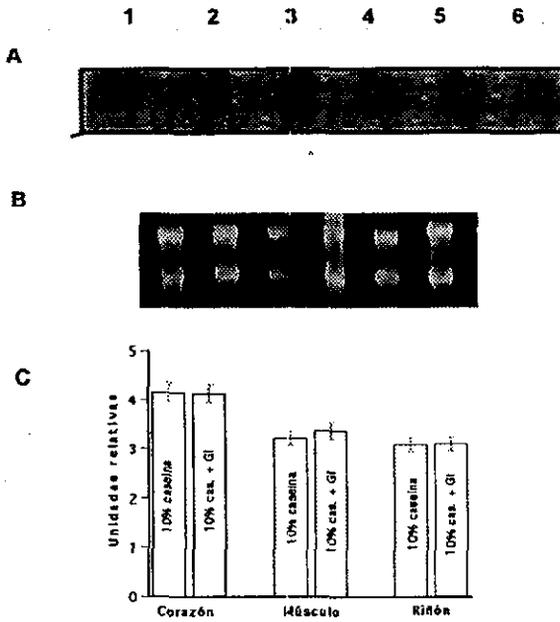


FIGURA 20. Concentración relativa de ARNm de la Aminotransferasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada en tejidos de ratas alimentadas con 10% de caseína y tratadas con glucagon. A) Análisis por Northern Blot de corazón de ratas alimentadas con 10% de caseína (1) y tratadas con glucagon (2), de músculo de ratas alimentadas con 10% de caseína (3) y tratadas con glucagon (4) y riñón con el mismo tratamiento dietario que 1 (5) y tratadas con glucagon (6). B) Electroforesis del ARN total en gel de agarosa con formaldehído y teñido con bromuro de etidio. C) Concentración de ARNm de la TAACR expresado en unidades relativas.

6.3. EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA EXPRESION DEL GEN DE LA HISTIDASA Y SU RELACION CON LA HIDROCORTISONA Y EL GLUCAGON:

6.3.1. GANANCIA DE PESO:

RESPUESTA A CORTO PLAZO.

Los pesos corporales iniciales (g) de las ratas fueron de 80.8 ± 0.58 , 83.00 ± 1.504 , 82.37 ± 1.746 y de 84.93 ± 2.583 para los grupos 80%, 0%, 0%-H y 0%-G, respectivamente. Después de 2 días del inicio del tratamiento, las ratas tuvieron un ligero decremento en su peso inicial debido al periodo de adaptación al alimento alto en proteína: La concentración plasmática de los aminoácidos de las ratas alimentadas con una dieta baja o normal en proteínas se incrementa notablemente durante el periodo de absorción cuando se les cambia la dieta a una con un alto contenido de proteína, particularmente en el primer día posterior al que el contenido de caseína en la dieta es incrementado. Este fenómeno se asocia con una depresión severa en el consumo de alimento.

Al final de 11 días de tratamiento los pesos corporales fueron: 111.73 ± 6.19 para el grupo 80%, 118 ± 3.48 para el grupo 0%, de 117.33 ± 4.02 para el grupo 0%-H y de 121.66 ± 7.125 para el grupo 0%-G.

Como se puede observar en la FIGURA 21, la ganancia de peso cambió 24 horas después del cambio de una dieta alta en proteína a una dieta alta en hidratos de carbono. La ganancia total de peso de estas ratas fue de 38.4, 42.0, 43.8 y 45.7 g respectivamente, mientras que la ganancia de peso por día fue de 5.5 g para el grupo 80%, de 6.0 g para el grupo 0%, de 6.3 g para 0%-H y de 6.5 g para 0%-G. No se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso entre ninguno de los grupos.

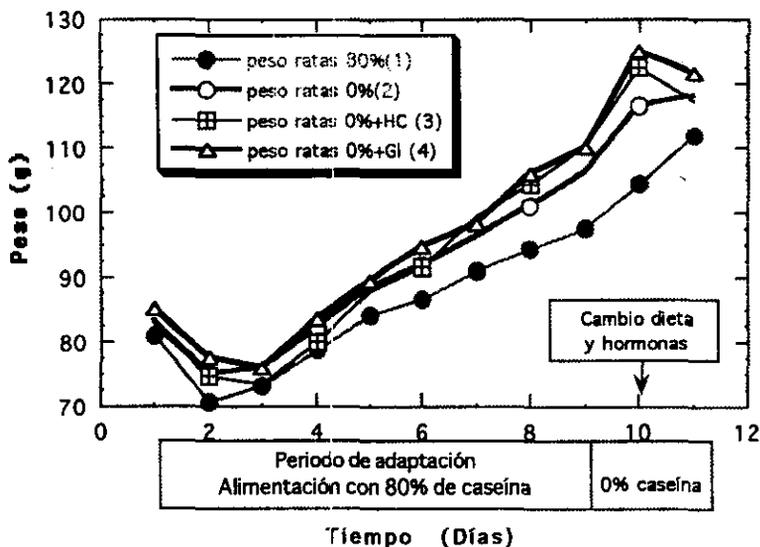


FIGURA 21. Ganancia de peso de las ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días (1), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y posteriormente con una dieta sin proteína por 1 día (2), de ratas con el mismo manejo dietario de (2) y tratadas con 4 dosis de hidrocortisona (3) o glucagon (4).

RESPUESTA A LARGO PLAZO.

Los pesos corporales iniciales (g) de las ratas fueron de 72.53 ± 3.24 , 77.53 ± 0.87 , 73.53 ± 2.52 , 80.8 ± 1.37 , para los grupos 80%C, 0%C, 0%C-H, 0%C-G, respectivamente, sufriendo el mismo ligero decremento descrito en las ratas de la fase aguda. Al final de los 8 días del cambio de la dieta, los pesos corporales registrados fueron: 161.27 ± 7.74 , 97.87 ± 4.62 , 91.3 ± 2.01 , 104.8 ± 0.85 , respectivamente, siendo la ganancia de peso por día de 5.5 g para el grupo 80%C, de 1.19 g para el grupo 80-0%C, de 0.98g para el grupo inyectado con hidrocortisona, 1.5g para el grupo inyectado con glucagon. Así mismo, la velocidad de crecimiento total para el grupo 80%C fue de 6.0 g/d, para el grupo 0%C fue de 1.03 g/d, siendo de 4.2 g/d antes del cambio de dieta, y de -1.34 g/d después del tratamiento, para el grupo 0%C-H, la velocidad de crecimiento total fue de 1.02 g/d, antes

del tratamiento fue de 4.2 g/d y después del mismo fue de -1.42 g/d. Finalmente, para el grupo 0%C-G, el crecimiento total fue de 1.55 g/d, siendo de 5.1 g/d antes del tratamiento y de -1.41 g/d después del cambio de la dieta. Sólo se encontró diferencia significativa de $p < 0.05$, entre el grupo alimentado con la dieta alta en proteína y los alimentados con la dieta sin proteína. La curva de crecimiento de estos animales se encuentra en la FIGURA 22.

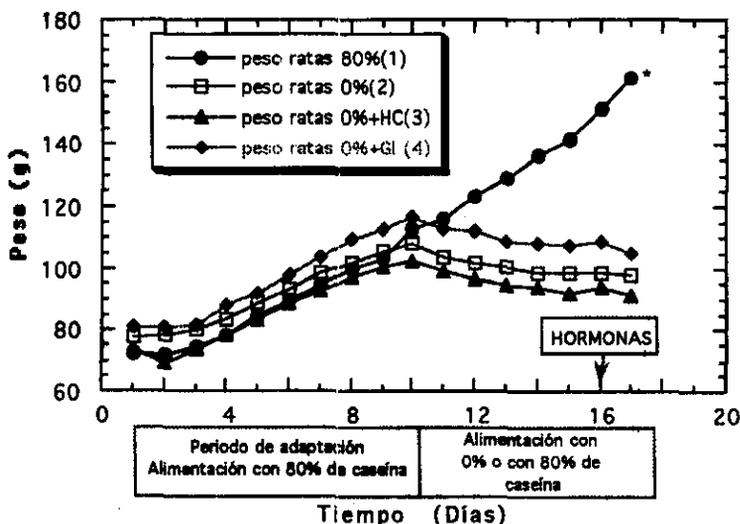


FIGURA 22. Ganancia de peso de las ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días (1), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y posteriormente con dieta sin proteína-alta en hidratos de carbono por 8 días (2), de ratas con el mismo manejo dietario de (2) y tratadas con 4 dosis de hidrocortisona (3) o glucagon (4). * $p < 0.05$ con respecto a los grupos 2, 3 y 4.

6.3.2 ACTIVIDAD DE LA HISTIDASA EN EL GRUPO 80-0%:

TRATAMIENTO A CORTO PLAZO: La actividad específica para el Grupo 80% fue de 1.386 ± 0.163 U/min/mg de proteína, para el Grupo 80-0% fue de 1.487 ± 0.315 U/min/mg de proteína, para el Grupo 80-0%-HC la actividad fue de 1.407 ± 0.213 U/min/mg de proteína, y para el Grupo 80-0%-G fue de 1.224 ± 0.104 U/min/mg de proteína. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. FIGURA 23.

TRATAMIENTO A LARGO PLAZO: La actividad específica para el Grupo 80% C fue de 1.543 ± 0.25 U/min/mg de proteína, para el grupo 80-0% C fue de 0.437 ± 0.093 U/min/mg proteína, para los grupos 80-0% C-H y 80-0% C-G fueron de 0.430 ± 0.014 y de 0.474 ± 0.022 U/min/mg de proteína, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo 80% C y los grupos 0% C, 0% C-H, 0% C-G, con un decremento de aproximadamente 68%. FIGURA 23.

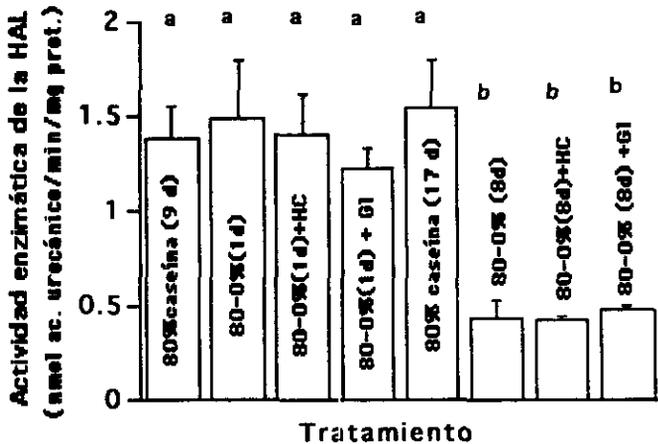


FIGURA 23. Actividad de la HAL en ratas alimentadas con 80% caseína y después de un cambio a una dieta libre de proteínas por uno u ocho días y tratadas con 4 dosis de hidrocortisona o glucagon. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas: a vs b: $p < 0.05$.

6.3.3. CONCENTRACION RELATIVA DE LA HISTIDASA PARA LOS GRUPOS 80-0% A CORTO Y LARGO PLAZO.

En la FIGURA 24 se muestra la concentración de la histidasa para estos grupos; el patrón observado para la actividad enzimática y para la concentración de ARNm corresponde con la concentración de enzima presente: Se observó disminución de 47% en la concentración de la enzima cuando la dieta se cambió de una alta en proteína (80% caseína) (carril 1) a una sin proteína por un día (carril 2), la administración de hidrocortisona, no alteró esta observación (carril 4). El tratamiento con glucagon incrementó la enzima en un 70% (carril 6) al compararse con el grupo que había sido alimentado con la dieta con 0% de caseína por un día (carril 2). Cuando la dieta sin proteína se dió por 8 días (carril 3), la concentración de la histidasa disminuyó 88% con respecto a las ratas alimentadas con la dieta alta en proteína (carril 1). Cuando se les administró hidrocortisona (carril 5) no hubo diferencia significativa con las que no recibieron hormona, alimentadas con 0% de caseína durante 8 días (carril 3). En las ratas alimentadas con 0% caseína durante 8 días y tratadas con glucagon (carril 7), se observó un incremento de 1.7 veces cuando se les comparó con las ratas alimentadas de la misma forma pero sin recibir la hormona (carril 3). La inducción por glucagon en el cambio de dieta por un día fue ligeramente mayor que en las ratas con el cambio por 8 días (carriles 6 y 7).

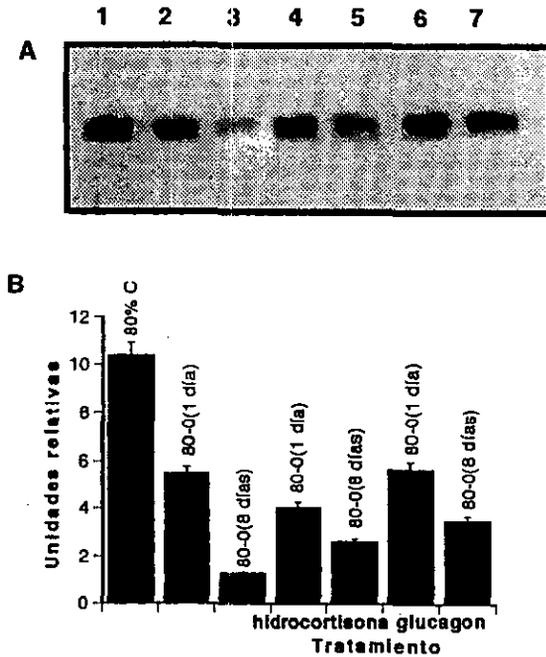


FIGURA 24. Concentración de la histidasa en los sobrenadantes de hígados de las ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días (1), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y posteriormente alimentadas con dieta sin proteína por 1 día (2), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y después con dieta sin proteína por 8 días (3), de ratas con el mismo manejo dietario que (2) y (3) y tratadas con 4 dosis de hidrocortisona (4 y 5) o glucagon (6 y 7). A) Análisis por Western Blot. B) Concentración de la HAL en unidades relativas.

6.3.4. CONCENTRACION RELATIVA DE ARNm DE LA HISTIDASA PARA LOS GRUPOS 80-0% TRATAMIENTOS A CORTO Y A LARGO PLAZO;

TRATAMIENTO A CORTO PLAZO: En la concentración de ARNm, se observó disminución de 66% entre el Grupo 80% y el 0%, entre el Grupo 0% y los Grupos 0%-HC y 0%-G no hubo diferencia significativa. FIGURA 25 (carriles 1, 2, 4, 6).

TRATAMIENTO A LARGO PLAZO: Con el cambio de una dieta con un contenido de 80% de caseína a una dieta sin proteína por 8 días, se observó disminución de 85% en la concentración de ARNm, el tratamiento con hidrocortisona no alteró esta observación, mientras que con el tratamiento con glucagon se observó un incremento de un 77%. FIGURA 25 (carriles 1, 3, 5, 7).

El incremento en la concentración de ARNm de la histidasa tratando a las ratas con glucagon después del cambio de la dieta alta en proteína a la dieta sin proteína por un día (fase aguda) fue 2.6 veces mayor que en las ratas tratadas con la misma hormona pero alimentadas con la dieta sin proteína durante 8 días después de alimentarlas con una dieta con un contenido de 80% de caseína por 9 días (FIGURA 25, carriles 6 y 7).

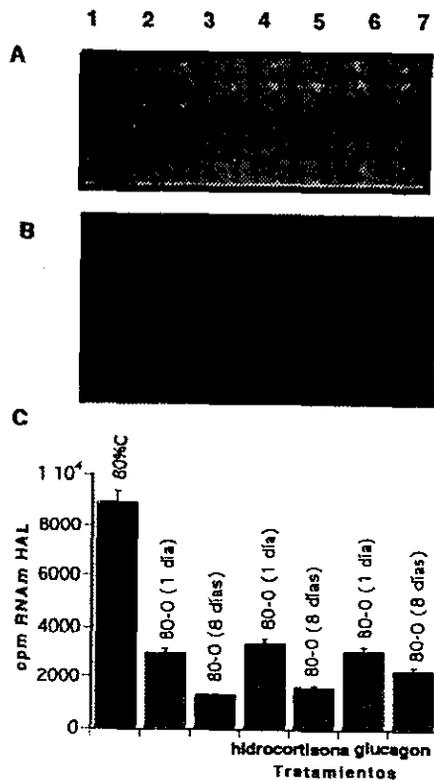


FIGURA 25.

Concentración relativa de ARNm de HAL para las ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días (1), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y posteriormente alimentadas con dieta sin proteína por 1 día (2), de ratas alimentadas con 80% de caseína por 8 días y después con dieta sin proteína por 8 días (3), de ratas con el mismo manejo dietario que (2) y (3) y tratadas con 4 dosis de hidrocortisona (4 y 5) o glucagon (6 y 7). A) Análisis por Northern Blot. B) Electroforesis de ARN total en gel de agarosa con formaldehído.. C) Expresión en cpm de la cuantificación del ARNm de la histidasa.

7. DISCUSION:

La regulación del nitrógeno corporal está controlada principalmente a través de dos mecanismos, la síntesis de proteínas, y la degradación de aminoácidos. Este último mecanismo es importante en la eliminación del exceso de aminoácidos, ya que estos pueden generar toxicidad (10). Las enzimas degradadoras de aminoácidos incluyendo a la histidasa y a la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada, son las encargadas de controlar el flujo de metabolitos a través de las correspondientes vías de degradación para cada aminoácido. La actividad de la mayoría de estas enzimas está regulada por hormonas, en especial el glucagón y los glucocorticoides. En el presente trabajo se demostró que no solo la actividad, sino que también la cantidad y la concentración del ARNm de la histidasa están controladas por el glucagón y la hidrocortisona.

Cuando se consumen dietas altas o bajas en su contenido de proteína, se producen cambios en la concentración de aminoácidos plasmáticos. Se ha demostrado que entre mayor sea el contenido de proteína de la dieta, es mayor el incremento de aminoácidos en plasma (4, 8, 140). Sin embargo el efecto a corto plazo del consumo de una dieta alta en proteína sobre la concentración de aminoácidos en plasma en ratas, es diferente a la concentración de aminoácidos que se observa en ratas que han sido adaptadas a consumir dietas altas en proteína por varios días. En este último grupo de animales las concentraciones de aminoácidos plasmáticos no se elevan tan significativamente como en animales que no han sido adaptados (141). Como se ha mencionado anteriormente, entre el proceso de no adaptación al de adaptación se requiere un período de varios días. Se ha demostrado que al ofrecerle a las ratas una dieta con un alto contenido proteínico, los animales inicialmente disminuyen su consumo de alimento en los primeros días. Este efecto, descrito inicialmente por Harper (8) se observó en el presente estudio en el grupo de ratas alimentado con la dieta que contenía 80% de caseína. Como se muestra en la Figura 21, las ratas alimentadas con 80% de caseína dejaron de comer los primeros días que fueron alimentadas con una dieta alta en proteína, para después reestablecer su patrón de crecimiento, lo que indica una alta capacidad de adaptación a un cambio en la dieta. Este comportamiento alimentario provoca varias preguntas como ¿Porqué las ratas dejan de consumir

estas dietas elevadas en proteínas y posteriormente las consumen sin restricción? ¿Cual es el propósito de dejar de consumir estas dietas? Existen varias respuestas a tales preguntas. Al consumir las ratas dietas con un elevado contenido de proteína, la concentración de aminoácidos se eleva en la sangre, y aunque los animales tienen una cierta capacidad de degradar el exceso de los mismos, esta no es suficiente para evitar toxicidad. Por lo tanto, existe uno o varios mecanismos de control de la ingestión de alimento, en especial en el cerebro, los cuales tienen la capacidad de sentir el exceso de aminoácidos presentes en la sangre. Se considera que estos mecanismos están mediados en parte por neurotransmisores, en especial la serotonina y la norepinefrina que pueden regular a nivel hipotalámico la ingestión alimentaria (142). La síntesis de estos neurotransmisores es dependiente de la concentración de sus aminoácidos precursores, el triptófano y la tirosina. A su vez, la concentración de dichos aminoácidos en el fluido extracelular del cerebro depende de la competencia que existe por el transporte de los mismos a través de la barrera hematoencefálica, en especial la concentración de aminoácidos neutros de cadena larga (143). Así, la competencia por la entrada de estos aminoácidos hacia el cerebro dependerá de su concentración en el plasma. Dietas elevadas en proteína producen una gran elevación de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina y valina, y estos pueden inhibir la entrada de los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina, teniendo como consecuencia una disminución en la síntesis de los neurotransmisores serotonina y norepinefrina. Esta disminución en la síntesis de dichos neurotransmisores se asocia con la disminución de la ingesta observada en los primeros días de consumo de una dieta elevada en proteína (144).

Con respecto a la pregunta ¿Cual es la finalidad de que los animales alimentados con una dieta elevada en proteína dejen de comer? Parte de su propósito se puede deducir de este estudio. Debido a que la capacidad de catabolizar aminoácidos está limitada cuando un animal se expone a una dieta alta en proteína, el organismo debe incrementar esta capacidad oxidativa, lo cual requiere de un lapso de varios días, para así poder normalizar sus concentraciones de aminoácidos en plasma, y evitar la competencia de su transporte a nivel de la barrera hematoencefálica (143, 145). El consumo elevado de proteínas además estimula el transporte de aminoácidos hacia el hígado, facilitando su catabolismo. En las ratas alimentadas con una dieta alta en proteína por varios días, la

capacidad degradativa de los aminoácidos aumenta, lo que permite incrementos restringidos en la concentración de los aminoácidos en plasma. En pocos días, el consumo de alimento se restaura.

Por otro lado, cuando a las ratas alimentadas con una dieta con 80% de caseína se les cambió la dieta a una alta en hidratos de carbono y sin proteína, se observó disminución en la velocidad de crecimiento desde el primer día del cambio y continuó disminuyendo. Estos resultados indican que el organismo es incapaz de conservar el exceso de proteína como reserva para continuar creciendo en ausencia de ella. Cuando los aminoácidos se consumen en cantidades por arriba de las requeridas para la síntesis de proteínas, hay una canalización eficiente hacia rutas oxidativas (3). Debido a que el exceso de aminoácidos no se almacena y a que el nitrógeno de estos aminoácidos después de su desaminación produce amonio, el cual es un ión tóxico cuando se encuentra en concentraciones elevadas en el organismo, su desecho resulta crítico en el organismo. El amonio producido se desecha en forma de urea, y la síntesis de este compuesto se lleva a cabo por medio del ciclo de la urea (3, 10). La actividad y la expresión génica de las enzimas del ciclo de la urea también se regula por cambios en la concentración de la proteína dietaria.

El tiempo requerido para aumentar la capacidad de catabolizar el excedente de aminoácidos depende en parte del tiempo para inducir los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos. Estudios previos han mostrado que la actividad de la histidasa se induce cuando las ratas son alimentadas con una dieta con un alto contenido de proteína, y que esta inducción se lleva a cabo a nivel pretraduccional (146). Sin embargo no se conocía si el efecto de los aminoácidos provenientes de la proteína dietaria actúan directamente sobre un gen específico o a través de un cambio hormonal provocado por la ingestión de proteínas. Para poder ver el efecto de una hormona sobre la actividad o expresión de una enzima, los animales deben ser alimentados con una dieta baja en proteína (10% de caseína), de manera que se pueda observar el efecto de las hormonas sin la interferencia de la inducción del gen por la proteína dietaria. En el presente trabajo se observó que la velocidad de crecimiento, ganancia de peso y consumo de alimento de las ratas no se vio afectado por el tratamiento hormonal, con respecto al grupo testigo. Las ratas alimentadas con la dieta con 10% de caseína y tratadas con hidrocortisona

incrementaron la actividad de HAL en un 100%, mientras que ratas alimentadas con la dieta con 18% de caseína y tratadas con hidrocortisona únicamente incrementaron la actividad de la HAL en un 44%.

Estos resultados indican que hormonas catabólicas como glucocorticoides y glucagon, no solo estimulan la actividad de la HAL, sino también producen una inducción del gen de la histidasa. Los resultados del presente trabajo se ven apoyados por estudios de otros investigadores que han mostrado en la rata un incremento de dos veces en la actividad de la HAL después de la administración de hidrocortisona, y un incremento de hasta 6 veces con glucagon (16, 89-92, 120, 122, 124, 126, 129). En este estudio, se encontró un incremento de 100% en la actividad de HAL con el tratamiento de hidrocortisona, y un incremento de aproximadamente 4 veces con glucagon. Bajo el tratamiento con hidrocortisona no observamos diferencias en la actividad o en la concentración de ARNm para HAL entre las diferentes horas de sacrificio, lo que demuestra que su efecto en la HAL es más largo (más de 12 horas), pero menor que con el glucagon, que mostró un mayor efecto a las 3 y a las 6 horas después de la última dosis de hormona para disminuir 12 horas después.

Con el objeto de conocer si estos incrementos en la actividad de la HAL bajo tratamientos hormonales era paralelo con la concentración de la enzima y con su ARNm específico, se midieron tanto la cantidad de enzima como la expresión del ARNm de la HAL. Los resultados indicaron que la regulación de la expresión del gen de la HAL por estas hormonas se lleva a cabo a nivel pretraduccional. Estos resultados se ven apoyados por el hecho de que la incorporación de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Leucina a la HAL es inhibida por Actinomicina D y cicloheximida (121). La concentración máxima del ARNm de HAL se encontró 3 horas después de la última dosis de glucagon con un incremento de 6 veces al compararse con el grupo testigo disminuyendo un 60% a las 6 horas y un 83% a las 12 horas; no hubo diferencia entre los tiempos de sacrificio en las ratas tratadas con hidrocortisona, obteniéndose un incremento del 100%, y un incremento de 150% en la concentración de la enzima. La concentración de la HAL después de 3 horas de la última dosis de glucagon se incrementó 3 veces y disminuyó 43% 12 horas después.

El mecanismo de acción de la hidrocortisona es a través de un receptor que media casi todas las acciones de los glucocorticoides a nivel transcripcional. El complejo receptor-glucocorticoide se une a sitios del ADN en el núcleo llamados Elementos de Respuesta a Glucocorticoides (GRE). La acción de los glucocorticoides es rápidamente reversible. Cuando las concentraciones de esteroides decaen, la hormona se disocia de su receptor, y el receptor se disocia del ADN, resultando en una disminución en la estimulación de la transcripción del gen en control. Aun así, la respuesta hormonal puede durar un tiempo prolongado debido a el aumento en la concentración de los ARNm y proteínas por efecto de los esteroides y a sus vidas medias (20).

Por otro lado, el glucagon interactúa con un receptor específico en la membrana celular, resultando en un complejo que induce a la proteína Gs y activa a la adenilato ciclasa, la cual produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) que sirve como segundo mensajero de la hormona (19). Se ha postulado que el AMPc se une a la subunidad regulatoria de la cinasa de proteínas A, lo que activa a esta enzima, la cual se transloca hacia el interior del núcleo en donde fosforila a la proteína que se enlaza al elemento de respuesta del AMPc (CREB), el cual es un factor transcripcional. Esta proteína CREB, la cual fosforilada esta en su forma activa se puede unir a los elementos de respuesta de AMPc presentes en los genes en los que se induce su transcripción. Por lo tanto, la activación de la histidasa depende del mecanismo de acción de la hormona administrada.

Se ha informado que las dietas elevadas en hidratos de carbono pueden afectar la expresión de genes específicos incluyendo el de algunas enzimas degradadoras de aminoácidos, por lo tanto se estudió el efecto represor de una dieta alta en hidratos de carbono y baja en proteína coadministrada con las hormonas en análisis sobre la expresión de la HAL. Para este propósito las ratas se alimentaron con una dieta alta en proteína y baja en hidratos de carbono (80% de caseína) por 9 días para inducir a la HAL hasta su máximo nivel, y después se cambiaron las ratas a consumir una dieta libre proteína con un alto contenido de hidratos de carbono (0% de caseína-89% hidratos de carbono) por sólo un día o por 8 días.

La proteína de la dieta tiene un efecto sobre la síntesis de enzimas

involucradas en el catabolismo de los aminoácidos contrario al de los hidratos de carbono. El ayuno y el consumo de dietas con alto contenido de proteína producen aumento en las enzimas degradadoras de aminoácidos para convertir a los aminoácidos en precursores de la síntesis de glucosa y ácidos grasos, o para su oxidación completa. Por el contrario, una dieta con alto contenido de hidratos de carbono y baja en proteína, disminuye la actividad de enzimas que participan en la gluconeogénesis y en el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, el efecto de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas degradadoras de aminoácidos es diferente en cada órgano o tejido, y dependerá de factores tales como la duración del ayuno, la composición de la dieta o la adaptación a una dieta previa (87). En este estudio se comprobó que la inducción de la histidasa por una dieta alta en proteína se inhibió con el consumo de una dieta alta en hidratos de carbono, efecto que no se vio modificado al administrar hidrocortisona o glucagon (Fig. 23). Esta represión también se ha observado sobre otras enzimas degradadoras de aminoácidos, como la serina deshidratasa y la tirosina aminotransferasa (89, 91, 92, 95, 125, 128, 129, 130). El efecto represivo que ejercen los hidratos de carbono sobre la concentración de ARNm de la histidasa son mayores que los que ejercen para la actividad enzimática; esto se explica por la diferencia en la vida media de la enzima medida como actividad (2.8 días) comparada con la de su ARNm (17.7 horas) (146). Además, indica que los hidratos de carbono probablemente suprimen la inducción de la histidasa a nivel de la transcripción; esto mismo se observó para la serina deshidratasa (SDH) (95), lo que indica que los mecanismos de regulación para enzimas hepáticas, como la HAL y la SDH son similares.

Los hidratos de carbono modulan la transcripción de muchos genes lipogénicos y glicolíticos utilizando como probable señal a la glucosa 6 fosfato (21, 147). El efecto transcripcional de los hidratos de carbono puede ser indirecto, mediado in vivo por variaciones hormonales como un incremento en la secreción de la insulina y una disminución en la de glucagon, ó directo mediado por glucosa en ausencia de insulina (85, 147). El gen de la HAL se reprime rápidamente por el consumo de una dieta alta en hidratos de carbono, probablemente a través de un incremento en la concentración de insulina para contrarrestar rápidamente la activación dependiente de glucagon. La administración de glucagon ó hidrocortisona no contrarrestó la represión causada por los hidratos de carbono. Estos resultados indican que los hidratos de carbono

son más potentes en reprimir el gen de la HAL que el glucagon en inducirla. Souza y colaboradores (41) mostraron que la administración de glucagon, hidrocortisona ó epinefrina, hormonas gluconeogénicas, no son capaces de contrarrestar el efecto de la insulina en ratas con hiperinsulinemia inducida, ni restaurar la glicemia por sí solas, pero las tres juntas provocan hiperglicemia en animales hipoglicémicos. Estudios realizados en seres humanos alimentados durante 3 días con una dieta sin proteínas, mostraron que este tipo de dieta reduce el catabolismo de proteínas disminuyendo la oxidación de aminoácidos y promoviendo la síntesis de proteínas selectas como la albúmina plasmática, y que este anabolismo de proteínas esta inducido por el incremento en las concentraciones plasmáticas de insulina (148).

Un elemento de respuesta a la glucosa ha sido identificado en algunos genes glucolíticos y lipolíticos (85), el cual es capaz de unir a diferentes factores transcripcionales. Se desconoce hasta el momento si este tipo de elemento de respuesta existe en los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos, aunque se sabe que los genes metabólicos que están regulados positivamente por glucosa e insulina, están regulados negativamente por glucagon, y viceversa, por lo que es probable que en genes como el de la histidasa esto también se cumpla (85).

La TAACR tuvo una respuesta diferente a los tratamientos hormonales que la observada con la HAL, ya que no respondió a ninguno de ellos en ninguno de los tejidos utilizados (riñón, corazón y músculo esquelético), ni en su actividad enzimática ni en la concentración de su ARNm. Los estudios realizados anteriormente han sido contradictorios, ya que algunos han mostrado un aumento en la actividad de la TAACRm, mientras que otros no han mostrado un efecto después de tratamientos con hidrocortisona (13, 118, 119). No existen referencias de otros estudios en los cuales se haya reportado la concentración del ARNm de la TAACRm en presencia de hormonas, y en este estudio se encontró que efectivamente, no existe una respuesta de esta enzima al tratamiento con hormonas.

Se ha demostrado que la TAACR sufre poco o ningún cambio en su actividad con diferentes tratamientos dietarios; estas observaciones son dependientes del tejido (131). En observaciones anteriores se ha mostrado que hay

variaciones en la actividad de la TAACRm en etapas fisiológicas como la lactancia (66) y también en sobre la concentración de su ARNm específico durante la lactancia y en el desarrollo embrionario (66), (datos no publicados).

Estudios en levaduras han mostrado que el gen de la TAACR está regulado por c-myc (127, 149). Aún no se sabe si este mecanismo también se lleva a cabo en organismos superiores. Tampoco se ha clonado aún la región promotora de la TAACR por lo que las secuencias regulatorias implicadas en este gen aún son desconocidas.

La TAACR es una enzima sumamente importante en el mantenimiento del nitrógeno corporal, por lo que quizá las pocas variaciones existentes en ella se deban a la posibilidad de que sea una enzima constitutiva.

Por lo tanto, los mecanismos de regulación de algunas de las enzimas degradadoras de aminoácidos son diferentes, y por lo tanto la expresión de sus genes también lo es. La HAL, enzima exclusivamente hepática sufre cambios importantes en su actividad enzimática que están asociados con cambios en el mismo sentido en su concentración de proteína HAL y su ARNm como respuesta a tratamientos dietarios y hormonales, mientras que la TAACR, enzima extrahepática, no sufre tales cambios.

Las diferencias en la expresión de los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos y de otras, como las enzimas del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono se deben probablemente a las diferencias existentes entre los sitios de respuesta presentes en sus regiones promotoras, así como la presencia de diferentes factores transcripcionales que son específicos de cada tejido. Así, posiblemente los cambios observados especialmente en el gen de la HAL puedan estar asociados con cambios en su velocidad de transcripción como una resultante de la presencia de algunos factores transcripcionales y de su efecto sobre los elementos de respuesta de este gen. Esta hipótesis requiere de una investigación detallada sobre el promotor de la HAL.

8. CONCLUSIONES:

1. La regulación de la expresión génica de la Histidasa por la hidrocortisona y el glucagon ocurre a nivel pretraduccional. No hay efecto de estas hormonas sobre la expresión de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada.

2. El máximo efecto del glucagon sobre la histidasa ocurre a las 3 horas después de aplicada la última dosis de hormona, mientras que con la administración de hidrocortisona no se observan diferencias en cuanto a tiempos de inducción.

3. Una dieta alta en hidratos de carbono administrada durante un día después de una alimentación con una dieta alta en proteína y baja en hidratos de carbono no produce cambios en la actividad enzimática de la histidasa y solo una ligera disminución en la concentración de su ARNm; sin embargo, si este mismo tratamiento se aplica durante 8 días, se observa decremento considerable tanto en la actividad enzimática como en la concentración del ARNm de la histidasa.

9. BIBLIOGRAFIA:

1. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1993) Glycolysis and the metabolism of hexoses. In *Principles of Biochemistry* (eds) pp. Chapter 14, Worth Publishers, New York
2. Olson, R. E. (1975) Introductory remarks: nutrient, hormone, enzyme interactions. *Am J Clin Nutr* 28, 626-637
3. Young, V. R., and J.S., M. (1990) Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* 51, 270-289
4. Munro, H. N. (1970) Free amino acid pools and their regulation. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H. N. eds) pp. 299-386, Academic Press, New York
5. Block, K. P., Afring, R. P., Mehard, W. B., and Use, M. G. (1987) Modulation of rat skeletal muscle branched-chain a-cetoacid deshydrogenase in vivo. Effects of dietary protein and meal consumption. *J Clin Invest* 79, 1349-1358
6. Krebs, H. A. (1972) Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. *Adv Enz Regul* 10, 397-420
7. Freedland, R. A., and Szepesi, B. (1971) Control of Enzyme Activity: Nutritional Factors. In *Enzyme Synthesis and Degradation in Mammalian Systems* (Rechigi, M. eds) pp. 103-140, University Park Press, New York
8. Harper, A. E. (1984) Biological Factor influencing the utilization of amino acids. In *Genetic Factors in Nutrition* pp. 243-267, Academic Press, Inc.
9. Steele, R. D., and Harper, A. E. (1990) Proteins and amino acids. In *Present Knowledge in Nutrition* (Brown, M. L. eds) pp. 67-79, International Life Sciences Inst., Washington, D.C.
10. Linder, M. C. (1991) Nutrition and Metabolism of Proteins. In *Nutritional Biochemistry and Metabolism* (eds) pp. 87-109, Elsevier, New York
11. Harper, A. E. (1986) Enzymatic basis for adaptative changes in amino acid metabolism. In *Proceedings of the XII International Congress of Nutrition* (Taylor, T. G., and Jenkins, N. K. eds) pp. 409-414, John Libbey, London, England
12. Hutson, S. M., and Harper, A. E. (1981) Blood and tissue branched-chain amino and a-keto acid concentrations: effect of diet, starvation, and disease. *Am J Clin Nutr* 34, 173-183
13. Ichihara, A., Takahashi, H., Aki, K., and Shirai, A. (1967) Transaminase of Branche Chain Amino Acids. *Biochem Biophys Res Comm* 26, 674-678
14. Finkelstein, J. D. (1978) Regulation of methionine metabolism in mammals. In *Transmethylation* (Usdin, E., Borchardt, R. T., and Creveling, C. R. eds) pp. 49-58, Elsevier/North Holland, New York
15. Harper, A. E. (1983) Some recent developments in the study of amino acid metabolism. *Proc Nutr Soc* 42, 437-449
16. Pitot, H. C., and Yatvin, M. B. (1973) Interrelationships of Mammalian Hormones and Enzyme Levels in Vivo. *Physiol Rev* 53, 228-297
17. Edozien, J. C., Khan, M. A. R., and Waslien, C. I. (1976) Human protein deficiency: Results of a Nigerian village study. *J Nutr* 106, 312-328

18. Edozien, J. C., Niehaus, N., Mar, M. H., Makoui, T., and Switzer, B. R. (1978) Diet-Hormone Interrelationships in the Rat. *J Nutr* 108, 1767-1776
19. Cuatrecasas, P. (1974) Membrane Receptors. *Ann Rev Biochem* 43, 169 - 214
20. Jensen, E. V., and Jacobson, H. I. (1960) Mode of action of steroid hormones. In *Biological activities of steroids in relationship to cancer* (Pincus, G. eds) pp. 1105-1111, New York Academic, New York
21. Girard, J., Ferré, P., and Foufelle, F. (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Ann Rev Nutr* 17, 325-352
22. Wicks, W. D., Barnett, C. A., and McKibbin, J. B. (1974) Interaction between hormones and cyclic AMP in regulating specific hepatic enzyme synthesis. *Federation Proc* 33, 1105-1111
23. Goodlad, G. A. J., and Munro, H. N. (1959) Diet and the action of cortisone on protein metabolism. *Biochem J* 73,
24. Wagle, S. R. (1966) Effects of insulin deficiency and cortisol administration on mobilization of protein to gluconeogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 121, 1297-1304
25. Wool, I. G., and Weisenhalbaum, E. I. (1959) Incorporation of C¹⁴ amino acids into protein of isolate diaphragms: role of the adrenal steroids. *Am J Physiol* 197, 1089-1093
26. Wool, I. G., and Weisenhalbaum, E. I. (1960) Corticoesterone and incorporation of C¹⁴ phenilalanine into protein of isolated rat diaphragms. *Am J Physiol* 198, 1111-1119
27. Weinshelbaum, E. I., and Wool, I. G. (1963) Effect of adrenalectomy and corticosteroids on distribution of radioactivity in protein of cell fractions from myocardial slices. *Nature* 191, 1401-1404
28. Ruderman, M. B. (1975) Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Ann Rev Med* 26, 245-256
29. Kline, D. L. (1949) A procedure for the study of factors which affect the nitrogen metabolism of isolated tissues: hormonal influences. *Endocrinology* 45, 596-602
30. Rosen, F. (1963) Enzymes in tissues responsive to corticosteroids. *Cancer Res* 23, 1447-1454
31. Kenney, F. T. (1970) Hormonal regulation of synthesis in liver enzymes. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H. N. eds) pp. 131-145, Academic Press, New York
32. Friedberg, F., and Greenberg, D. M. (1947) Endocrine regulation of amino acid levels in blood and tissues. *J Biol Chem* 114, 816-823
33. Bondy, P. B. (1949) The effect of the adrenal and thyroid glands upon the rise of plasma amino acid in the eviscerated rat. *Endocrinology* 45, 605-611
34. Kaplan, S. A., and Shimizu, C. S. N. (1963) Effects of cortisol on amino acids in skeletal muscle and plasma. *Endocrinology* 72, 267-274
35. Ryan, W. L., and Carver, M. J. (1963) Immediate and prolonged effects of hydrocortisone on the free amino acids of rat skeletal muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 114, 816-823

36. Owen, O. E., and Cahill, G. F. (1973) Metabolic effects of exogenous glucocorticoids in fasted man. *J Clin Invest* 52, 2596-2605
37. Tataranni, P. A., Larson, E., Snitker, S., Young, J. B., Flatt, J. P., and Ravussin, E. (1996) Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol* 271, E317-E325
38. Bloom, S. R., Daniel, P. M., Johnston, D. I., Ogawa, O., and Pratt, O. E. (1972) Changes in glucagon level associated with anxiety or stress. *Psychol Med* 2,
39. Muller, W. A., Faloona, G. R., and Unger, R. H. (1971) The influence of the antecedent diet upon glucagon and insulin secretion. *N Eng J Med* 285, 1450-1454
40. Rachmiel, L. (1976) Glucagon and the regulation of blood sugar. *N Engl J Med* 294, 494-495
41. Souza, H. M., Hell, N. S., Lopes, F., and Bazotte, R. B. (1996) Synergistic effect of counterregulatory hormones during insulin-induced hypoglycemia in rats: participation of lipolysis and gluconeogenesis to hyperglycemia. *Acta Pharmacol Sinica* 17, 455-459
42. Menahan, L. A., and Wieland, O. (1969) Interactions of glucagon and insulin on the metabolism of perfused livers from fasted rats. *European J Biochem* 9, 55-62
43. Flakoll, P. J., Borel, M. J., Wentzel, L. S., Williams, P. E., Lacy, D. B., and Abumrad, N. N. (1994) The role of glucagon in the control of protein and amino acid metabolism in vivo. *Metabolism* 43, 1509-1516
44. Ohneda, A., Parada, E., Eisentraut, A. M., and Unger, R. H. (1968) Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids. *J Clin Invest* 47, 2305-2322
45. Boden, G., Tappi, L., Jadali, F., Hoeldtke, R. D., Rezvani, I., and Owen, O. E. (1990) Role of glucagon in disposal of an amino acid load. *Am J Physiol* 259, E225-E232
46. Charlton, M. R., Adey, D. B., and Sreekumaran, N. K. (1996) Evidence for a catabolic role of glucagon during an amino acid load. *J Clin Invest* 98, 90-99
47. Daniel, P. M., Pratt, O. E., and Spargo, E. (1977) The mechanism by which glucagon induces the release of amino acids from muscle and its relevance to fasting. *Proc R Soc Lond B* 196, 347-365
48. Elwyn, D. H. (1970) The role of the Liver in the Regulation of Amino Acid and Protein Metabolism. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H. N. eds) pp. 523-674, Academic Press, New York
49. Young, V. R. (1970) Skeletal and cardiac muscle and regulation. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H. N. eds) pp. 605-671, Academic Press, New York
50. Peterkofsky, A. (1962) The mechanism of action of histidase: Amino-enzyme formation and partial reactions. *J Biol Chem* 237, 787-795
51. Bhargava, M. M., and Feigelson, M. (1976) Studies on the mechanisms of histidase development in rat skin and liver. *Dev Biol* 48, 226-236
52. Brand, M., and Harper, A. E. (1976) Histidine Ammonia-lyase from rat liver. Purification, properties and inhibition by substrate analogues. *Biochemistry* 15, 1814-1821.

53. Taylor, R. G., Levy, H. L., and McInnes, R. R. (1991) Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. *Mol Biol Med* 8, 101-116
54. Lam, W. K., Cleary, M. A., Wraith, J. E., and Walter, J. H. (1996) Histidinaemia: a benign metabolic disorder. *Arch Dis Child* 74, 343-346
55. Spolter, P. D., and Baldrige, R. C. (1963) The metabolism of histidine. *J Biol Chem* 238, 2071-2074
56. Taylor, R. G., García-Haras, J., Sadler, S. J., Lafreniere, R. G., Willard, H. F., Ledbetter, D. H., and McInnes, R. R. (1991) Localization of histidase to human chromosome region 12q22-q24.1 and mouse chromosome region 10C2-D1. *Cytogenet Cell Genet* 56, 178-181
57. Suchi, M., Harada, N., Wada, Y., and Takagi, Y. (1993) Molecular cloning of a cDNA encoding human histidase. *Biochim Biophys Acta* 1216, 293-295
58. Suchi, M., Sano, H., Mizuno, H., and Wada, Y. (1995) Molecular Cloning and Structural Characterization of the Human Histidase Gene (HAL). *Genomics* 29, 98-104
59. Taylor, R. G., Lambert, M. A., Sexsmith, e., Sadler, S. J., Ray, P. N., Mahuran, D. J., and McInnes, R. R. (1990) Cloning and expression of rat histidase. *J Biol Chem* 265, 18192-18199
60. Martin, D. W., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (1981) Catabolism of the carbon skeletons of amino acids. In *Harper's Review of Biochemistry* (eds) pp. 288-297, Lange,
- 61.
62. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1993) Amino Acids and Peptides. In *Principles of Biochemistry* (eds) pp. Worth Publishers, New York
63. Harper, A. E., Miller, R. H., and Block, K. P. (1984) Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Ann Rev Nutr* 4, 409-454
64. Ichihara, A. (1985) Branched-Chain Aminotransferase. In *Transaminases* (Christen, P., and Metzler, D. E. eds) pp. 430-438, John Wiley and Sons, New York
65. Hutson, S. M. (1986) Branched chain α -keto acid oxidative decarboxylation in skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem* 261, 4420-4425
66. Alemán, G., De Santiago, S., and Hernández, H. (1994) Oxidation of Alanine and Leucine by dam rat in liver, skeletal muscle and mammary gland during lactation and weaning. *FASEB J* 8, A461
67. Hutson, S. M., Fernstermacher, D., and Mahar, C. (1988) Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism. *J Biol Chem* 263, 3618-3625
68. Hutson, S. M., Wallin, R., and Hall, T. R. (1992) Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rat tissues. *J Biol Chem* 267, 15681-15686
69. Hutson, S. M., Bledsoe, R. K., Hall, T. R., and Dawson, P. A. (1995) Cloning and expression of the mammalian cytosolic Branched Chain Aminotransferase isoenzyme. *J Biol Chem* 270, 30344-30352
70. Krebs, H. A., and Lund, P. (1977) Aspects of the regulation of the metabolism of branched-chain amino acids. *Adv Enz Reg* 15, 375-394

71. Adibi, S. A. (1980) Roles of branched-chain amino acids in metabolic regulation. *J Lab Clin Med* 95, 475-484
72. Harper, A. E. (1984) Interrelationships among the Branched Chain Amino Acids. In *Branched Chain Amino and Keto Acids in Health and Disease* (Karger, and Basel eds) pp. 81-99,
73. Harper, A. E., and Zapalowski, C. (1985) Interorgan relationships in the metabolism of the branched-chain amino and α -ketoacids. In *Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Ketoacids* (Williamson, W. a. eds) pp. 195-203, Elsevier North Holland, Inc.,
74. Rucker, R., and Tinker, D. (1986) The role of Nutrition in Gene Expression: A Fertile Field for the Application of Molecular Biology. *J Nutr* 116, 177-189
75. Hanson, R. W., Hatzoglou, M., McGrane, M. M., Wynshaw-Boris, A., Rottman, F. M., and Wagner, T. (1989) Molecular Biology and Nutrition Research. *J Nutr* 119, 957-964
76. Goodridge, A. G. (1989) Nutritional Regulation of Gene Expression. In *Nutrition in Integrated Biological Systems* eds) pp. 489-500, Elsevier, New York
77. Simopolous, A. P. (1990) Genetics and Nutrition: Or what your Genes can tell you about Nutrition. In *Genetic Variation and Nutrition* (Simopolous, A. P., and Childs, B. eds) pp. 25-34, Basel, Karger, Washington, D.C.
78. Fong, Y., Moldawer, L. L., and Lowry, S. F. (1992) Experimental and Clinical Applications of Molecular Cell Biology in Nutrition and Metabolism. *JPEN* 16, 477-486
79. Tjian, R. (1995) Molecular machines that control genes. *Scientific American* 38-45
80. Calkhoven, C. F., and Ab, G. (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem J* 317, 329-342
81. Goodridge, A. G. (1990) The Role of Nutrients in Gene Expression. In *Genetic variation and Nutrition* (Simopolous, A. P., and Childs, B. eds) pp. 183-193, Basel, Karger, Washington, D.C.
82. Clarke, S. D., and Abraham, S. (1992) Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. *FASEB J* 6, 3146-3152
83. Rosa, J. L., Bartrons, R., and Tauler, A. (1992) Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J* 287, 113-116
84. Lemaigre, F. P., and Rousseau, G. G. (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in rat liver. *Biochem J* 303, 1-14
85. Vaultont, S., and Kahan, A. (1994) Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J* 8, 28-35
86. David, K. C., Hargrove, C., and Hargrove, J. I. (1994) Effects of dietary protein in gene expression. In *Nutrition and Gene Expression* (Berdanier, C. D., and Hargrove, J. I. eds) pp. CRC Press, New York
87. Torres, N., Bourges, H., and Tovar, A. R. (1996) Regulaci3n de la expresi3n g3nica por nutrimentos. *Arch Lat Nutr* 46, 89-96
88. Eisenstein, A. B., and Singh, S. P. (1976) Hormonal control of nutrient metabolism. *J Clin Invest* 57, 537-559

89. Jost, J. P., Khairallah, E. A., and Pitot, H. C. (1968) Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. *J Biol Chem* 243, 3057-3066
90. Jost, J. P., Hsie, A., Hughes, S. D., and Ryan, L. (1970) Role of cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate in the induction of hepatic enzymes. *J Biol Chem* 245, 351-357
91. Peraino, C., Lamar, C., and Pitot, H. C. (1966) Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. *J Biol Chem* 241, 2944-2948
92. Peraino, C. (1967) Interactions of diet and cortisone in the regulation of adaptive enzymes in rat liver. *J Biol Chem* 242, 3860-3867
93. Su, Y., Kanamoto, R., Miller, D. A., Ogawa, H., and Pitot, H. C. (1990) Regulation of the expression of the serine dehydratase gene in the kidney and liver of the rat. *Biochem Biophys Res Comm* 170, 892-899
94. Ogawa, H., Fujioka, M., Su, Y., Kanamoto, R., and Pitot, H. C. (1991) Nutritional Regulation and Tissue-specific Expression of the Serine Dehydratase Gene in Rat. *J Biol Chem* 266, 20412-20417
95. Kanamoto, R., Su, Y., and Pitot, H. C. (1991) Effects of Glucose, Insulin and cAMP on Transcription of Serine Dehydratase Gene in Rat Liver. *Arch Biochem Biophys* 288, 562-566
96. Su, Y., and Pitot, H. C. (1992) Location and Characterization of Multiple Glucocorticoid-Responsive Elements in the Rat Serine Dehydratase Gene. *Arch Biochem Biophys* 297, 239-243
97. Della Fazia, D. M., Servillo, G., and Viola-Magni, M. (1992) Different expression of tyrosine aminotransferase and serine dehydratase in rat livers after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Comm* 182, 753-759
98. Wicks, W. D. (1971) Differential Effects of Glucocorticoids and Adenosine 3',5'-Monophosphate on Hepatic Enzyme Synthesis. *J Biol Chem* 246, 217-223
99. Johnson, R. W., Roberson, L. E., and Kenney, F. T. (1973) Regulation of tyrosine aminotransferase in rat liver. *J Biol Chem* 248, 1521-1527
100. Ernest, M. J. (1982) Regulation of tyrosine aminotransferase messenger ribonucleic acid in rat liver. Effect of cycloheximide on messenger ribonucleic acid turnover. *Biochemistry* 21, 6761-6767
101. Ruiz Bravo, N., and Ernest, M. J. (1982) Induction of tyrosine aminotransferase mRNA by glucocorticoids and cAMP in fetal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 365-368
102. Scherer, G., Schmid, W., Strange, C. M., Rowekamp, W., and Schutz, G. (1982) Isolation of cDNA clones coding for rat tyrosine aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7205-7208
103. Hashimoto, S., Schmid, W., and Schutz, G. (1984) Transcriptional activation of the rat liver tyrosine aminotransferase gene by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 6637-6641
104. Pittner, R. A., Fears, R., and Brindley, D. N. (1985) Effects of cyclic AMP, glucocorticoids and insulin on the activities of phosphatidate phosphohydrolase, tyrosine aminotransferase and glycerol kinase in isolated rat hepatocytes in relation to the control of triacylglycerol synthesis and gluconeogenesis. *Biochem J* 225, 455-462

105. Slagboom, P. E., Leeuw, W. J. F., and Vijg, J. (1990) mRNA levels and methylation patterns of the tyrosine aminotransferase gene in aging inbred rats. *FEBS* 269, 128-130
106. Lee, K. L., Reel, J. R., and Kenney, F. T. (1970) Regulation of tyrosine a-ketoglutarate transaminase in rat liver. 245, 5806-5812
107. Iynedjian, P. B., Auburger, P., Guigoz, Y., and Le Cam, A. (1985) Pretranslational regulation of tyrosine aminotransferase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis by glucagon and dexamethasone in adult rat hepatocytes. *Biochem J* 225, 77-84
108. Shinomiya, T., Sherer, G., Schmid, W., Zentgraf, H., and Schutz, G. (1984) Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1346-1350
109. Jantzen, H. M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshrt, M., Miksicek, R., and Schutz, G. (1987) Cooperativity of Glucocorticoid Response Elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49, 29-38
110. Nitsh, D., Boshrt, M., and Schutz, G. (1993) Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5479-5483
111. Oshima, H., and Simons, S. S. (1992) Modulation of Glucocorticoids Induction of Tyrosine Aminotransferase Gene Expression by Variations in Cell Density. *Endocrinology* 130, 2106-2112
112. Espinas, M. L., Roux, J., Ghysadel, J., Pictet, R., and Grange, T. (1994) Participation of Ets Transcription Factors in the glucocorticoid response of the rat tyrosine aminotransferase gene. *Mol Cell Biol* 14, 4116-4125
113. Schweizer-Groyer, G., Froyer, A., Cadepond, F., Grange, T., Baulieu, E. E., and Pictet, R. (1994) Expression from the tyrosine aminotransferase promoter (nt -350 to + 1) is liver-specific and dependent on the binding of both liver-enriched and ubiquitous trans-acting factors. *Nuc Ac Res* 22, 1583-1592
114. DuBois, D. C., Zhi-Xin, X., McKay, L., Almon, R. R., Pyszcznski, N., and Jusko, W. J. (1995) Differential Dynamics of receptor Down-regulation and tyrosine aminotransferase induction following glucocorticoid treatment. *J Steroid biochem Molec Biol* 54, 237-243
115. Oshima, H., Szapary, D., and Simons, J., S.S. (1995) The factor binding to the glucocorticoid modulatory element of the tyrosine aminotransferase gene is a novel and ubiquitous heteromeric complex. *J Biol Chem* 270, 21893-21901
116. Onoagbe, I. O., and Dickson, A. J. (1992) Effects of glucagon and an analogue of cAMP on tyrosine aminotransferase in isolated chick embryo hepatocytes. *Exp Cell Res* 201, 514-516
117. Onoagbe, I. O., Okolie, P. N., Onyeneke, E. C., and Dickson, A. J. (1994) Regulation of tyrosine aminotransferase activity by glucagon and cAMP analogues in chick embryos in ovo. *Comp Biochem Physiol* 109C, 283-287
118. Shirai, A., and Ichihara, A. (1971) Transaminase of Branched Chain Amino Acids. *J Biochem* 70, 741-748

119. Mimura, T., Yamada, C., and Swendseid, M. E. (1968) Influence of Dietary Protein Levels and Hydrocortisone Administration on the Branched-chain Amino Acid Transaminase Activity in Rat Tissues. *J Nutrition* 95, 493-498
120. Schrimmer, M. D., and Harper, A. E. (1970) Adaptive responses of mammalian histidine-degrading enzymes. *J Biol Chem* 245, 1204-1211
121. Feigelson, M. (1973) Studies on the postnatal development of responses of hepatic histidase to endocrine control. *Biochim Biophys Acta* 304, 669-685
122. Lamartiniere, C. A., and Feigelson, M. (1977) Effects of estrogen, glucocorticoid, glucagon and adenosine 3':5'-monophosphate on catalytic activity, amount, and rate of de Novo synthesis of hepatic histidase. *J Biol Chem* 252, 3234-3239
123. Morris, M. L., Lee, S. C., and Harper, A. E. (1973) A comparison of the responses of mitochondrial and cytosol histidine-pyruvate aminotransferases to nutritional and hormonal treatments. *J Biol Chem* 248, 1459-1465
124. Lee, S. C., and Harper, A. E. (1971) Responses of mammalian histidine catabolic enzymes to dietary and hormonal treatments. *Biochim Biophys Acta* 244, 135-145
125. Lee, S. C., Tews, J. K., Morris, M. L., and Harper, A. E. (1972) Rat liver histidase: Glucose repression and Half-life after casein hydrolysate feeding. *J Nutr* 102, 319-330
126. Lamartiniere, C. A., and Feigelson, M. (1976) Glucagon, cyclic AMP, estrogen and glucocorticoids induce elevations in synthetic rate of rat liver histidase. *Fed Proc* 35, 1362
127. Torres, N., Martínez, L., Alemán, G., Bourges, H., and Tovar, A. (1998) Histidase expression is regulated by dietary protein at the pretranslational level in rat liver. *J Nutr* 128, 818-824
128. Anderson, H. L., Benevenga, N. J., and Harper, A. E. (1968) Effect of prior high protein intake on food intake, serine dehydratase activity and plasma amino acids of rats fed amino acid-imbalanced diets. *J Nutr* 97, 463-474
129. Pestana, A. (1969) Dietary and hormonal control of enzymes of amino acid catabolism in liver. *European J Biochem* 11, 400-404
130. Rosen, F., and Milholland, R. J. (1963) Effects of casein hydrolysate on the induction and regulation of tyrosine-a-ketoglutarate transaminase in rat liver. *J Biol Chem* 243, 1900-1907
131. Torres, N., López, G., De Santiago, S., Hutson, S. M., and Tovar, A. R. (1998) Expression of Mitochondrial Branched Chain Aminotransferase in Rat Tissues: Effect of diet and hormones. *J Nutr* 128, 818-824
132. Tabor, H., and Mehler, A. H. (1955) Histidase and Urocanase. In *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. eds) pp. 228-231, Academic Press, New York
133. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949) Determination of serum protein by means of biuret reaction. *Anal Chem* 177, 151
134. Rudiger, H. W., Langenbeck, U., and Goedde, H. W. (1972) A Simplified Method for the Preparation of ¹⁴C-Labelled Branched-Chain α -Oxo Acids. *Biochem J* 126, 445-446

135. Maniatis, S. F. (1989) *Molecular Cloning. Laboratory Manual*, Second, pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
136. Walker, J. M. (1989) *Methods in Molecular Biology*, pp. 41-65, 165-178,
137. Cooper, T. G. (1977) *The tools of Biochemistry*, pp. De Wiley-Interscience, New York
138. Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual.*, pp. Ed. Harlow,
139. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single step method for RNA isolation by acid Guanidinium Thyocinate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
140. Munro, H. N., and Crim, M. C. (1980) Proteínas y amino ácidos. In *Nutrición en la Salud y la Enfermedad* (Goodhart, R. S., and Shils, M. E. eds) pp. Lea and Febiger, Madrid
141. Anderson, H. L., Benevenga, N. J., and Harper, A. E. (1968) Associations among food and protein intake, serine dehydratase, and plasma amino acids. *Am J Physiol* 214, 1008-1013
142. Peters, J. C., and Harper, A. E. (1987) Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids and brain serotonin. *Am J Physiol* 252, R902-R914
143. Peters, J. C., and Harper, A. E. (1985) Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J Nutr* 115, 382-398
144. Gietzen, D. W. (1993) Neural mechanisms in response to amino acid deficiency. *J Nutr* 97, 463-474
145. Gustafson, J. M., Doods, S. T., Burgus, R. C., and Mercer, L. P. (1986) Prediction of brain and serum free amino acid profiles in rats fed graded levels of protein. *J Nutr* 116, 1667-1681
146. Kispal, G. (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from the yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca 39 protein. *J Biol Chem* 271, 24458 - 24464
147. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1996) Regulation of transcription initiation. In *Molecular Cell Biology* (eds) pp. 405-484, Scientific American Books, Inc., New York
148. Volpi, E., Lucidi, P., Cruciani, G., Monacchia, F., Reboldi, G., Brunetti, P., Bolli, G. B., and De Feo, P. (1996) Contribution of Amino Acids and Insulin to Protein Anabolism During Meal Absorption. *Diabetes* 45, 1245-1252
149. Eden, A., Simchen, G., and Benvenisty, N. (1996) Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial Branched-chain Amino Acid Aminotransferases. *J Biol Chem* 271, 20242-20245