



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN DEL CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN EL HÍGADO POR LA
INTERACCIÓN DE PPAR α Y HNF4 α Y SUS CONSECUENCIAS METABÓLICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

SANDRA TOBÓN CORNEJO

DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

DR. ADOLFO GARCÍA SÁINZ

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DR. ANGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2021



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.

Agradecimientos

Al **Dr. Armando Tovar** y a la **Dra. Nimbe Torres** por ser guía y apoyo durante el desarrollo de este proyecto de investigación y por compartir su conocimiento académico y experiencias de vida. También quiero agradecer al **Dr. Adolfo García** y el **Dr. Ángel Zarain**, miembros del comité tutorial, por su valiosa contribución al desarrollo de este trabajo y su asesoramiento al largo de estos años de maestría y doctorado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio especialmente a **Ariana Vargas, Mónica Todd** y **Diana Coutiño** quienes aprecio y he disfrutado de su compañía. A la **Dra. Adriana Margarita** al **Dr. Omar Granados, Dra. Laura Velázquez, Dr. Víctor Ortiz** y la **Q.A Irma Mata** a quienes quiero y estimo.

Finalmente quiero dedicar este trabajo a mi familia, a mis padres **Félix Abel Tobón** y **Ma. Guadalupe Cornejo** y a mis hermanos **Lupita** y **Abel**.

Para volver a empezar pintar girasoles

I. INDICE GENERAL

I. INDICE GENERAL	1
II. ÍNDICE DE TABLAS	3
III. INDICE DE FIGURAS	3
IV. ABREVIATURAS	4
V. RESUMEN	7
VI. ABSTRACT	8
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1 Catabolismo de los aminoácidos	9
1.2 Regulación de la oxidación de los aminoácidos	12
1.2.1 Regulación del catabolismo de los aminoácidos por la dieta	13
1.2.2 Regulación del catabolismo de los aminoácidos por hormonas	13
1.2.3 Regulación transcripcional de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos	15
1.3 Interacción entre el metabolismo de ácidos grasos y de aminoácidos	16
1.4 Receptor activado por el proliferador del peroxisoma (PPARα)	18
1.5 Factor hepático nuclear 4 alfa (HNF4α)	23
1.5.1 Ligando de HNF4α	25
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1 Cultivo celular y transfecciones para la Co-inmunoprecipitación y ensayos de estabilidad de HNF4α	28
5.2 Co-inmunoprecipitación de proteínas	28
5.3 Western blot	28
5.4 Modelo animal y tratamientos dietarios	29
5.5 Determinación del gasto energético y coeficiente respiratorio	30
5.6 Variables bioquímicas plasmáticas	31
5.7 Extracción de proteínas y Western blot	31
5.8 Ensayo de luciferasa	32

5.9 Silenciamiento de HNF4 α	33
5.10 Inmunofluorescencia	33
5.11 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	34
5.11.1 Cross-linking y lisis celular	34
5.11.2 Sonicación	34
5.11.3 Inmunoprecipitación	35
5.12 Análisis estadístico	36
6.- RESULTADOS	37
6.1 Interacción a nivel de proteína entre HNF4 α y PPAR α	37
6.2 Degradación proteasomal de HNF4 α por la interacción con PPAR α y RXR α	40
6.3 Interacción entre HNF4 α y el promotor de la SDS por la sobreexpresión de PPAR α	41
6.4 Ganancia de peso e ingesta de proteína	44
6.5 Efecto de la carencia o sobreexpresión de PPAR α en ratones sobre su composición corporal mediante resonancia magnética	45
.....	45
6.6 Determinación de los parámetros bioquímicos	46
6.7 Determinación del gasto energético y coeficiente respiratorio (RER)	47
6.8 Localización intracelular de HNF4 α y PPAR α y expresión de ECAs en el hígado de ratones WT y <i>Ppara</i> -null	49
6.9 Interacción entre HNF4 α y el promotor de la SDS	51
7. DISCUSION	53
9. CONCLUSIONES	58
10. RESUMEN GRÁFICO	59
11. PERSPECTIVAS	60
12. REFERENCIAS	61

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la dieta AIN-93 ajustada con distintas concentraciones de proteína y carbohidratos.....	30
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

III. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visión general del catabolismo de aminoácidos en mamíferos.....	10
Figura 2. Regulación génica mediada por PPAR α	19
Figura 3. Representación esquemática de la transcripción de genes diana de PPAR α	21
Figura 4: Red de interacción de PPAR α con otros genes.....	23
Figura 5: Dominios funcionales de HNF4.....	24
Figura 6. Modelo de acción de receptores nucleares huérfanos	25
Figura 7: Regulación de HNF4 α por PPAR α y RXR α	39
Figura 8: Degradación proteasomal de HNF4 α por la coexpresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α	41
Figura 9: Regulación del promotor del gen de la SDS por la coexpresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α	43
Figura 10: Ganancia de peso e ingesta de proteína.....	44
Figura 11: Composición corporal de masa grasa y magra en los ratones C57BL/6 y <i>Ppara</i> -null.	45
Figura 12: Parámetros metabólicos.....	46
Figura 13: El genotipo de PPAR α y la cantidad de proteína de la dieta modifican diferencialmente el gasto energético y la tasa de intercambio respiratorio (RER).....	48
Figura 14: La localización intracelular de HNF4 α y PPAR α y la expresión de ECAs en el hígado de ratón dependen de la cantidad de proteína de la dieta y del genotipo PPAR α	50
Figura 15: La ausencia de PPAR α aumentó la unión de HNF4 α al promotor de SDS <i>in vivo</i>	52
Figura 16: Regulación del catabolismo de aminoácidos en el hígado por la interacción de PPAR α Y HNF4 α	59

IV. ABREVIATURAS

AF-1	Primer dominio de activación
AF-2	Segundo dominio de activación
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
C57BL/6	Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón
Caja TATA	secuencia consenso del tipo 5'-TATAAA-3'
C/EBP	CCAAT / proteína de unión potenciadora beta
CPS-1	Carbamoil fosfato sintetasa-1
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB1	Proteína de Unión a Elemento de Respuesta al AMP Cíclico 1
ECA	Enzimas catabolizantes de aminoácidos
DBD	Dominio de unión a DNA
DR	Elemento de repetición directa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
EDTA	Etilen diamino tetracetico
IgG	Inmunoglobulina G
IgG-H & L	Inmunoglobulina G- H&L
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
NF-IL6	Factor nuclear de interleucina 6
GLS2	Glutaminasa 2
HAL	Histidasa
HEK 293	Células embrionarias de riñón humano 293
Hep G2	Línea celular de carcinoma hepatocelular
HNF4 α	Factor hepático nuclear 4 alfa
HNF1 α	Factor hepático nuclear 1 alfa
HRE	Elemento de respuesta a HNF4 α
Km	Constante de Michaelis-Menten
LBD	Dominio de unión al ligando

LSD	Menor diferencia significativa
MEM	Medio esencial mínimo
MG-132	Inhibidor de la vía de degradación del proteasoma
RER	Cociente de intercambio respiratorio
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
PBS	Buffer de fosfatos
pGL3	Plásmido GL3
pGL3-SDS	Promotor del gen SDS insertado en el plásmido GL3
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PD	Proteína dietaría
PPAR α	Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa
<i>Ppara-null</i>	Ratones deficientes de la proteína PPAR α funcional
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR α
PPAR γ	Receptor activado por proliferador del peroxisoma gamma
PPAR δ	Receptor activado por proliferador del peroxisoma delta
PPAR $^{-/-}$	Knock out para PPAR α
PMA	Forbol 12-miristato, 13-acetato
sh HNF4 α	Pequeños ARN de horquilla de HNF4 α ("Small hairpin")
Sh RNA-control	Control del ácido ribonucleico de horquilla
SDS-PAGE	Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida
SFB	Suero fetal bovino
ssDNA	DNA de esperma de salmón
Gen SDS	Gen de la deshidratasa de serina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TDO2	Dioxigenasa de triptófano
TAT	Aminotransferasa de tirosina
RE	Elemento de respuesta

RxR α	Receptor x Retinoico alfa
VO ₂	Volumen de oxigeno
WT	Ratones de la cepa silvestre de ratón

V. RESUMEN

El receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa (PPAR α) es un importante regulador del uso de sustratos energéticos. PPAR α se heterodimeriza con el receptor x retinoico (RXR α) y se activa por ciertos ligandos naturales y sintéticos para modular la expresión de sus genes blanco, como los genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos. Además, la expresión de genes implicados en el catabolismo se ve incrementada en ratones deficientes de PPAR α funcional, en comparación con la cepa silvestre (WT), lo que sugiere que PPAR α puede desempeñar un papel represor en la regulación transcripcional de los genes relacionados con la oxidación de aminoácidos, incluidos los relacionados con el ciclo de la urea. Por otro lado, el factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4 α) participa regulando positivamente la expresión de algunos genes de las enzimas catabolizantes de aminoácidos. La evidencia sugiere que PPAR α y HNF4 α están involucrados en este mecanismo; sin embargo, no se conoce cómo llevan a cabo esta regulación. Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue el de estudiar cómo interactúan los factores de transcripción PPAR α y HNF4 α para regular la expresión de los genes relacionados al catabolismo de aminoácidos. Los estudios *in vivo* con ratones *knock out* para PPAR α (*Ppara-null*) alimentados con diferentes cantidades de proteína en la dieta mostraron que, en ausencia de PPAR α , hay un aumento significativo en la abundancia de HNF4 α en el hígado, lo que se asoció con un aumento en la expresión y abundancia de las enzimas catabolizantes de aminoácidos (ECAs) y en la generación de urea postprandial. Este efecto se evidenció al incrementar el porcentaje de proteína en la dieta. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que HNF4 α puede unirse al promotor del gen de la deshidratasa de serina (SDS), enzima asociada con el catabolismo del aminoácido serina, y este efecto se potenció cuando el contenido de proteína en la dieta estuvo por arriba del requerimiento en ratones *Ppara-null*. Los estudios mecanísticos revelaron que RXR α es esencial para reprimir la actividad de HNF4 α en presencia de PPAR α , y que la interacción entre PPAR α y RXR α acelera la degradación de HNF4 α a través de la ruta del proteasoma.

VI. ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) is an important regulator of energy substrate utilization. PPAR α heterodimerizes with the x retinoic acid receptor (RXR α) and is activated by certain natural and synthetic ligands to modulate the expression of its target genes, having the main function of modulating the expression of genes encoding for enzymes involved in fatty acid oxidation. In addition, there is evidence that the expression of genes involved in amino acid catabolism is positively regulated in mice deficient in functional PPAR α compared to the wild-type (WT) strain, suggesting that PPAR α may play a repressor role in the transcriptional regulation of amino acid oxidation genes, including those of the urea cycle. On the other hand, hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) is known to participate by positively regulating the expression of some amino acid catabolizing enzyme genes. Recent evidence suggests that PPAR α and HNF4 α are involved in the mechanism of transcriptional control of amino acid catabolism genes, however it is not known how they are involved in this mechanism. Therefore, the aim of the present work was to study how PPAR α and HNF4 α transcription factors interact to regulate the expression of amino acid catabolism genes. *In vivo* studies with PPAR α knock out mice (*Ppara-null*) fed with different amounts of dietary protein showed that, in the absence of PPAR α , there was a significant increase in the abundance of HNF4 α in the liver, which was associated with an increase in the expression and content of amino acid catabolizing enzymes (ACEs) and in postprandial urea generation. This effect was evidenced by increasing the percentage of protein in the diet. Chromatin immunoprecipitation assays showed that HNF4 α can bind to the promoter of serine dehydratase (SDS), an enzyme associated with serine amino acid catabolism, and this effect was magnified when the protein content of the diet was above the requirement in *Ppara-null* mice. Mechanistic studies revealed that the presence of RXR α is essential to repress HNF4 α activity in the presence of PPAR α , and that the interaction between PPAR α and RXR α accelerates the degradation of HNF4 α through the proteasome pathway.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Catabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades estructurales que constituyen las proteínas en el organismo. Los aminoácidos en general tienen en común un átomo de carbono central alfa (α) asimétrico, es decir, que contienen cuatro sustituyentes enlazados covalentemente, al que están unidos un grupo amino, un átomo de hidrógeno y un grupo carboxilo. Además, al átomo de carbono α se le une un grupo químico específico, denominado cadena lateral, que es diferente para cada uno de los 20 aminoácidos (Devlin, 2004). Los aminoácidos de acuerdo con su estructura química de la cadena lateral se han dividido en aminoácidos zwitteriónicos o neutros, catiónicos o básicos y aniónicos o ácidos (Devlin, 2004). Existen 20 alfa-aminoácidos que son los que forman la estructura de las proteínas, aunque existen otros aminoácidos, incluidos los beta-aminoácidos como la taurina, que juega funciones importantes en el organismo (Nelson & Cox, 2004). Desde el punto de vista nutricional, ocho de los 20 aminoácidos deben ser obligatoriamente consumidos en la dieta, a estos aminoácidos se les conoce como esenciales (Angel, 2005). Dos aminoácidos son clasificados como semi-esenciales, la tirosina y la cisteína, debido a que estos son sintetizados directamente a partir de los aminoácidos esenciales fenilalanina y metionina, respectivamente. El resto de los aminoácidos se les clasifica como no esenciales, ya que pueden ser sintetizados por el organismo (Angel, 2005). La histidina se clasifica como un aminoácido esencial durante la infancia, y no esencial durante la vida adulta. La denominación de no esenciales no indica que se pueden omitir de la dieta, sino que por un cierto lapso estos pueden ser sintetizados cuando se encuentran en bajas concentraciones en la dieta; sin embargo, su síntesis no llega a cubrir el requerimiento de estos aminoácidos a largo plazo. Por lo tanto, la falta de estos aminoácidos en individuos en crecimiento no permite que la tasa de crecimiento sea óptima (Angel, 2005).

Los aminoácidos libres son absorbidos en el intestino, por medio de diversos transportadores que son específicos para los diferentes grupos químicos en los que se clasifican los aminoácidos y posteriormente viajan por la circulación sanguínea al hígado vía la vena porta. Los aminoácidos provenientes de la dieta junto con los

aminoácidos procedentes del recambio proteico forman una poza común, a partir de la cual los aminoácidos pueden tener distintos destinos metabólicos, donde el más importante es su utilización para la síntesis de proteínas. Además, los aminoácidos son también utilizados como precursores de algunas hormonas, neurotransmisores, grupos hemo, bases púricas y pirimidínicas, así como también de aminoácidos no esenciales (Nelson & Cox, 2004). Sin embargo, a diferencia de los lípidos y de los hidratos de carbono, no existe un verdadero almacén de proteínas, por lo que los aminoácidos se oxidan en condiciones de exceso en la dieta (**Figura 1**).

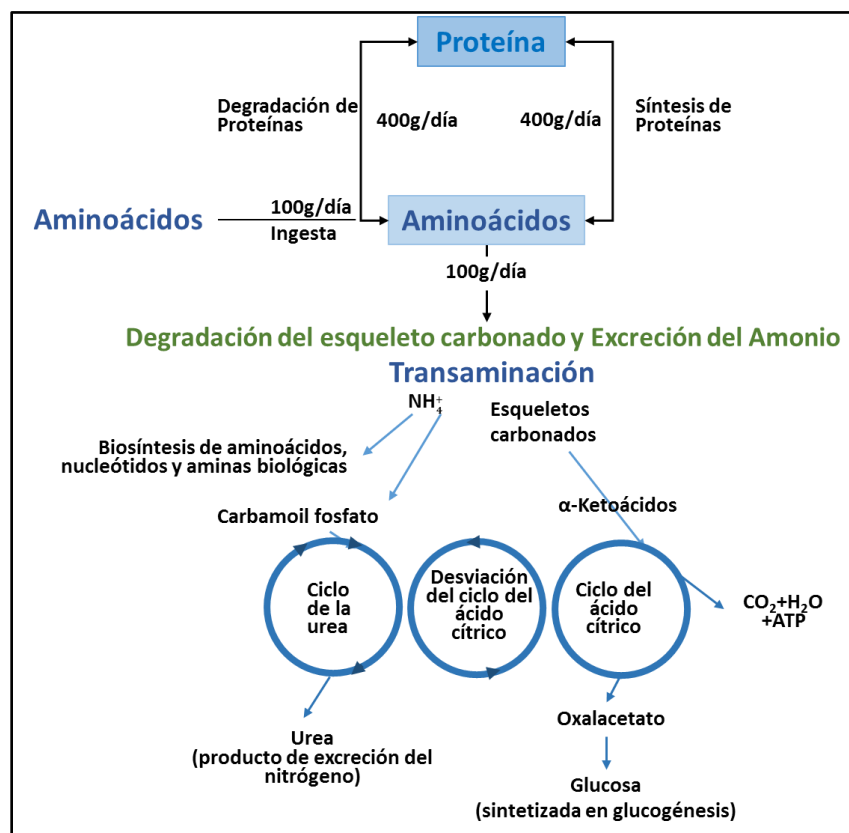


Figura 1. Panorama general del catabolismo de aminoácidos en mamíferos. ATP, Adenosín trifosfato; H₂O, agua; CO₂, dióxido de carbono, NH₄, amonio (Imagen adaptada (Nelson & Cox, 2004)).

Los principales sitios donde se lleva a cabo el catabolismo de aminoácidos son el hígado, el intestino delgado, el músculo y el riñón, siendo el hígado el principal órgano encargado del catabolismo de los aminoácidos (Lozano, 2011). Con el uso de isótopos

radiactivos, durante la década de 1950, se demostró cual era el destino de los aminoácidos. Mediante análisis de pulso-persecución, fue posible estudiar la incorporación de aminoácidos a las proteínas. A finales de los años 50, el uso de aminoácidos marcados radiactivamente permitió estudiar con más detalle la oxidación de los aminoácidos. Los experimentos en los que utilizaron la perfusión de hígado de rata con aminoácidos marcados radiactivamente indicaron que la mayoría de los aminoácidos se catabolizaban en este órgano. Existen algunas características del catabolismo de los aminoácidos específicas de cada órgano, por lo que su degradación en cada lugar debe ser considerado en relación con las funciones intrínsecas de cada órgano o tejido (Ekhard & Ziegler, 1997). Como se ha indicado, el hígado desempeña un papel primordial en el metabolismo, modificando las cantidades y proporciones de aminoácidos de la sangre portal, que son distribuidos al resto del organismo. El hígado es el único órgano capaz de catabolizar todos los aminoácidos, con excepción de los aminoácidos de cadena ramificada, la leucina, isoleucina y valina (Devlin, 2004). Esto se debe a que la primera enzima para su catabolismo está casi ausente en el hígado, y se encuentra presente en varios órganos extrahepáticos, particularmente en el músculo esquelético. Por ello, el músculo esquelético metaboliza gran parte de los aminoácidos de cadena ramificada, cuyo nitrógeno es exportado en forma de glutamina y alanina, y sus esqueletos carbonados son liberados en gran medida a la circulación sanguínea en forma de alfa-cetoácidos de cadena ramificada, los cuales son principalmente canalizados al hígado, en donde se encuentran presentes las enzimas que llevan a cabo la oxidación completa de estos aminoácidos (Devlin, 2004). Para el resto de los 17 alfa-aminoácidos, se ha demostrado que existe una vía de oxidación específica para cada aminoácido en el hígado. Se ha establecido que existe para cada vía de oxidación de los aminoácidos, una enzima paso limitante, que es quien regula la actividad de la vía metabólica, modulando la velocidad o flujo a través de la vía (Nelson & Cox, 2004). Interesantemente, se ha demostrado que estas enzimas paso limitante, también llamadas enzimas catabolizantes de aminoácidos, se ha demostrado que son la primera enzima de cada vía. Estas enzimas se caracterizan por tener valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) similares a la concentración plasmática de cada uno de los correspondientes aminoácidos. Las tasas de catabolismo de los aminoácidos dependen,

en gran medida, de sus concentraciones en el tejido, que a su vez reflejan el balance entre el aporte nutricional y la necesidad metabólica (Ekhard & Ziegler, 1997). En los mamíferos, los aminoácidos son oxidados particularmente bajo tres diferentes situaciones metabólicas (Nelson & Cox, 2004): A) Durante la síntesis y degradación normal de proteínas celulares, lo que se conoce como recambio proteico, algunos de los aminoácidos liberados durante la degradación de las proteínas se degradan, si no se reutilizan para la síntesis de nuevas proteínas; B) Cuando se consume una dieta rica en proteínas y los aminoácidos ingeridos exceden las necesidades corporales para la síntesis de proteínas, y dicho excedente se cataboliza. Esto ocurre ya que el exceso de los aminoácidos no se puede almacenar; y C) Durante la inanición o en la diabetes mellitus, situaciones bajo las cuales las concentraciones de glucosa se encuentran en un estado limitante, o no puede utilizarse adecuadamente, se recurre a los aminoácidos de las proteínas celulares como combustible, para la síntesis de glucosa a través de la gluconeogénesis (Nelson & Cox, 2004). Se ha demostrado que la actividad de estas enzimas está modulada por varias hormonas, como la insulina, el glucagón y los glucocorticoides. Sin embargo, durante muchos años no se establecieron los mecanismos detallados por los que podía producirse la regulación de la expresión génica de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos, hasta la aparición de las técnicas de biología molecular. Ahora, se ha demostrado que la mayoría de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos tienen una K_m elevada, y su saturación se produce sólo cuando la concentración circulante de aminoácidos en el organismo es elevada.

1.2 Regulación de la oxidación de los aminoácidos.

El estudio de la regulación de las enzimas degradadoras de aminoácidos, es un campo poco explorado. A finales de los 1980's y principios de los 1990's hubo un avance significativo acerca de la regulación del catabolismo de aminoácidos, que fue mermando hasta ser casi nulo a principios del 2000. En este corto periodo, se dilucidó la regulación de la expresión de algunas enzimas degradadoras de aminoácidos, como es el caso de la oxigenasa de triptófano, deshidratasa de serina, histidasa, glutaminasa, arginasa y tirosina transaminasa, encontrándose el papel que juega la ingesta de

proteína dietaría en su regulación, así como la participación hormonal, como el caso de los glucocorticoides o el glucagón, en la expresión de algunas de estas enzimas.

1.2.1 Regulación del catabolismo de los aminoácidos por la dieta

Uno de los principales conocimientos que se tuvieron acerca de la regulación de las enzimas catabolizantes de aminoácidos (ECAs) fue su regulación por la dieta. La cantidad de proteína dietaría contribuye significativamente en la expresión de las ECAs y no exclusivamente la cantidad del aminoácido sustrato de la enzima, como se observó en la histidasa (Torres, Martínez, Alemán, Bourges, & Tovar, 1998). Por otro lado, se observó que en ratas Wistar alimentadas con diferentes cantidades de proteína dietaría, había un incremento en el nivel del RNAm de la SDS en el hígado y la expresión de la SDS aumentaba a medida que aumentaba el contenido de proteína en la dieta; sin embargo, los niveles del RNAm caían rápidamente en un 60% en 3 horas, después de que las ratas se alimentaban con una dieta libre de proteínas, mientras que la actividad de la SDS permanecía relativamente estable durante un día y luego disminuía rápidamente (Ogawa, y otros, 1988); un patrón similar se observó en el caso de la glutaminasa 2 (GLS2) (Watford, Nadine, Zhan, & Pannelli, 1993). Por otro lado, las enzimas del ciclo de la urea no se salvan de una regulación similar, ya que se ha visto que incrementan sus niveles con una dieta alta en proteínas o cuando existe inanición (Christowitz, Mattheyse, & Balinsky, 1981). Cabe resaltar que las isoformas de algunas enzimas como la SDS y GLS2, localizadas en el riñón, no responden a la misma regulación por proteína dietaría (Su, Kanamoto, Miller, Ogawa, & Pitot, 1990); (Hwang & Curthoys, 1991). De tal manera que en ese momento se conocía a grandes rasgos, que un exceso de proteína dietaría, el ayuno prolongado y en menor medida el recambio proteico, producían un incremento en la expresión de las enzimas degradadoras de aminoácidos; este conocimiento se iría refinando con el paso de los años.

1.2.2 Regulación del catabolismo de los aminoácidos por hormonas

La dioxigenasa de triptófano (TDO2) fue de las primeras enzimas, a las que se les atribuyó una regulación por hormonas, en especial por glucocorticoides, utilizando su análogo sintético, la dexametasona (1982,). Danesch y colaboradores encontraron que

el suministro de este compuesto causaba un aumento en la tasa de transcripción del RNAm de la TDO2, pero no tenía efecto sobre su estabilidad (Danesch, Hashimo, Renkawitz, & Shutz, 1983). Además de los glucocorticoides, se encontró que el aumento en la cantidad de proteína dietética se acompaña de un aumento en la concentración circulante de glucagón. Estudios posteriores demostraron que una inyección de glucagón a ratas aumenta en 5 veces la abundancia del RNAm de la histidasa (HAL) (Torres, Martínez, Alemán, Bourges, & Tovar, 1998). También se mostró que, tanto los glucocorticoides como el Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) tenían un efecto positivo en la tasa de transcripción del gen de la aminotransferasa de tirosina (TAT). En el caso de las enzimas del ciclo de la urea se observó que además de la dieta, también estaban reguladas por los glucocorticoides y el AMPc (Nebes & Morris, 1988). Esto se probó al evaluar el efecto separado y sinérgico de los glucocorticoides y el AMPc sobre el aumento en los niveles del RNAm para cuatro enzimas del ciclo de la urea, incluida la arginasa (Nebes & Morris, 1988). Otro estudio, realizado en ratas adenolectomizadas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos, mostraba que tanto la dexametasona como el glucagón podían aumentar la tasa de transcripción del gen SDS en el hígado, pero la presencia de ambos potenciaba sus efectos, aumentando la tasa máxima de transcripción (Kanamoto, Su & Pitot, 1991). Ahora se sabe que el glucagón puede aumentar la tasa de transcripción del gen SDS al aumentar los niveles de AMPc que estimulan la unión de los receptores de glucocorticoides a sus ligandos (Kanamoto, Su & Pitot, 1991). Aunque, por otro lado, se observó que la activación de la GLS2 a través del glucagón no se inhibía en presencia del Rp-8-Br-AMPcS, un inhibidor de la proteína cinasa A (PKA), sugiriendo la existencia de un mecanismo alternativo mediante el cual el glucagón estimula la expresión del gen (Brosnan, Ewart, & Squires, 1995).

Se ha probado que en condiciones de ayuno o tras el consumo de una dieta alta en proteínas, el glucagón y los glucocorticoides actúan de forma sinérgica, y esto se debe a su capacidad para producir AMPc como una respuesta a la elevación del glucagón para inducir la expresión de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos. Sin embargo, también se debe a que el AMPc puede aumentar la estabilidad del receptor de glucocorticoides, así como incrementar la transcripción del gen que lo codifica. Se ha

observado que el aumento de la actividad de estas enzimas, por una dieta alta en proteínas, se reprime por la administración de glucosa, insulina o una dieta baja en proteínas (Kanamoto, Su & Pitot, 1991).

1.2.3 Regulación transcripcional de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos

Se ha estudiado el control transcripcional para algunas de las enzimas catabolizadoras de aminoácidos como la deshidratasa de serina, la histidasa y la glutaminasa. En el caso de la deshidratasa de serina, se han identificado algunas secuencias responsables de su regulación en el promotor de su gen, utilizando ensayos con genes reporteros. Estos revelaron que la región de -133 a -33 pb del promotor es esencial para la expresión del gen, ya que se observa una pérdida completa de actividad cuando se elimina esta región, atribuyendo su regulación a los factores de transcripción HNF1 α (Factor hepático nuclear 1 alfa) y HNF4 α (factor nuclear de hepatocitos 4 alfa) (Su, Kanamoto, Miller, Ogawa, & Pitot, 1990). Estudios posteriores mostraron dos elementos de respuesta a AMPc (CRE) a los cuales se unió CREB1, designados como CRE1 y CRE2 a aproximadamente -3.5 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen SDS. Las mutaciones de ambos sitios CRE que se empalmaban, disminuyeron parcialmente la activación de la transcripción del gen de la deshidratasa de serina por el AMPc, indicando que el glucagón puede estimular directamente la tasa de transcripción del gen SDS. Por lo tanto, los sitios CRE se consideran como potenciadores que estimulan positivamente la expresión del gen SDS (Haas & Pitot, 1994). Estudios recientes indican que la expresión del gen SDS está regulada a la baja por HNF4 α (Contreras, y otros, 2015).

En cuanto a la histidasa, el análisis del promotor de su gen revela la presencia de varios elementos de respuesta para varios factores de transcripción, incluyendo CCAAT / proteína de unión potenciadora beta (C/EBP), factor nuclear de interleucina 6 (NF-IL6), HNF4, receptores de progesterona, glucocorticoides y CREB1 (Proteína de Unión a Elemento de Respuesta al AMP Cíclico 1) (Alemán, Ortíz, Langley, Tovar, & Torres, 2005). En particular, la presencia de elementos CRE en la región entre -340 a -815 pb del promotor, establece la evidencia que explica los efectos del glucagón en la expresión

del gen HAL. De hecho, la estimulación con forskolina activa el promotor del gen de la histidasa, lo que sugiere que el glucagón puede regular el promotor de HAL al activarlo mediante la activación de CREB1, a través de PKA. Interesantemente, la estimulación con el forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA), también activa al promotor de HAL, lo que indica que la expresión del gen de la enzima catabolizante también puede ser estimulada vía proteína cinasa C (PKC) (Alemán, Ortíz, Langley, Tovar, & Torres, 2005).

Por otro lado, el promotor del gen GLS2 que carece de la secuencia consenso del tipo 5'-TATAAA-3' (caja TATA), muestra que se requiere la región de -48 a -103 pb del promotor para mantener su actividad basal, mientras que la región de -103 a -252 es sensible a los glucocorticoides; sin embargo, no existe un elemento putativo de respuesta (RE) para glucocorticoides (Chung , Vincent , Jhala , & Watford, 1997). El promotor del gen GLS2 también contiene elementos de respuesta para CRE en la región -785 a -780 pb, HNF1 en -528 a -522 pb y HNF-5 en -528 a -522, y -405 a -397 pb. Recientemente, se ha descubierto que HNF4 α regula positivamente al promotor del gen de GLS2, y que los elementos de respuesta para HNF4 se conservan entre humanos, ratones y conejos (Velázquez, y otros, 2016).

1.3 Interacción entre el metabolismo de ácidos grasos y de aminoácidos

La homeostasis proteica es uno de los aspectos más importantes que es necesario para mantener el balance homeostático celular (Albero, Sanz, & Playán., 2004). Las proteínas en el organismo tienen funciones vitales, tales como la regulación de la estructura celular, la señalización celular, así como en diversos procesos enzimáticos, entre otros, por lo que la degradación de proteína durante periodos prolongados se traducirá en pérdida de la función biológica (Nelson & Cox, 2004).

Los aminoácidos en el cuerpo juegan un papel importante en la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados (Wu, 2009). En ciertas condiciones fisiológicas, como el ayuno o después del consumo de una dieta rica en proteínas, los aminoácidos se pueden utilizar como combustible energético. Existe evidencia de que los mecanismos de adaptación se activan cuando estas condiciones son prolongadas en el tiempo (Harper, Miller, & Block, 1984). De hecho, la excreción de urea se estabiliza en la orina

con el tiempo, sugiriendo que los mecanismos implicados en la oxidación de los aminoácidos se suprimen como parte de esta adaptación (Cahill, 1970), debido en parte a que se activa un *switch* metabólico que permite la utilización de ácidos grasos como fuente de energía en lugar de los aminoácidos.

Se sabe que la expresión de genes implicados en el catabolismo de los aminoácidos está regulada positivamente en ratones deficientes de la proteína PPAR α funcional (*Ppara-null*) en comparación con la cepa silvestre C57BLACK6 de ratón (C57BL/6), mientras que la oxidación de los ácidos grasos se disminuye (Kersten, y otros, 2001), sugiriendo que PPAR α puede desempeñar un papel en la regulación transcripcional de los genes que participan en la oxidación de los aminoácidos, incluidos los implicados en el ciclo de la urea (Walters & Wallace, 2010). Otros estudios han reforzado este concepto, ya que se observó que, en ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta, la adición del compuesto Wy14643, que es un ligando sintético de PPAR α , disminuyó los niveles del RNAm de las ECAs como HAL, SDS y TAT (Aleman, y otros, 2013). Sin embargo, los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) mostraron que no hay interacción entre PPAR α y la secuencia promotora de estas enzimas (Contreras, y otros, 2015), lo que sugirió que, si bien PPAR α inhibe la transcripción de las ECAs, esta regulación se lleva a cabo indirectamente a través de un modulador secundario involucrado en el control transcripcional. Un análisis de enriquecimiento funcional de los genes expresados diferencialmente, dependiendo de la ingesta de proteína de la dieta, reveló una red de interacción que involucraba PPAR α y varios genes, entre ellos HNF4 α (Contreras, y otros, 2015). Estos resultados indicaron que HNF4 α puede ser el mediador directo de la regulación de la expresión de las ECAs, a través de un mecanismo indirecto que implica su interacción con PPAR α . En síntesis, la homeostasis proteica es uno de los aspectos más importantes que es necesario preservar para mantener el balance homeostático celular (Albero, Sanz, & Playán, 2004).

1.4 Receptor activado por el proliferador del peroxisoma alfa (PPAR α)

PPAR α pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares. Se conoce en la actualidad que existen tres miembros de la familia del PPAR, conocidos como Receptor activado por proliferador del peroxisoma gamma (PPAR γ), Receptor activado por proliferador del peroxisoma delta (PPAR δ) y PPAR α (Dreyer, Krey, & Keller, 1992). PPAR γ es un factor de transcripción cuya función principal es la de activar el proceso de adipogénesis (Jia, 2012). El PPAR δ , el cual se expresa en diversos órganos y tejidos, se ha demostrado que tiene un papel central en el metabolismo de la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético (Berger & Moller, 2002). Por otro lado, PPAR α ha mostrado ser un regulador fundamental en la oxidación de ácidos grasos, particularmente en el hígado.

El gen de PPAR α de ratones consta de ocho exones y se encuentra en la región cromosómica 22q12-q13.1 (Sher, Sher, Yi, McBride, & Gonzalez, 1993). Similar a otros miembros de la familia de receptores nucleares, PPAR α contiene cinco dominios principales: el NH 2-terminal final, dominio de transactivación independiente del ligando (o dominio A / B); el dominio de unión a DNA (ácido desoxirribonucleico) (DBD) de 70 aminoácidos de largo o dominio C, que contiene dos motivos de dedos de zinc altamente conservados y promueve la unión del receptor a una secuencia de DNA en la región promotora de genes diana, conocidos como RE a PPAR α (PPRE). La región de bisagra o dominio D actúa como un sitio de acoplamiento para cofactores y también conecta el DBD al dominio de unión a ligando (LBD). El C-terminal, el dominio E / F o LBD, que es responsable de la especificidad del ligando, y la activación de la unión de PPAR α al PPRE que conduce a una mayor expresión de genes diana, contribuye a la dimerización del RXR y es un sitio para la unión de co-activadores y co-represores; y dos dominios de activación: el primer dominio de activación 1 (AF-1) localizado en el extremo amino terminal y el segundo dominio de activación 2 (AF-2) en el extremo carboxilo terminal (AF-2). La activación de AF-1 sola es en general débil, pero se sinergia con AF-2 al unirse al ligando, lo que conduce a una mayor transcripción y expresión génica. PPAR α , al igual que otros dos PPARs, forma heterodímeros con RXR (α , β , γ) y se une a un elemento cis consenso, PPRE, en el DNA blanco, que consiste en

dos hexanucleótidos separados por un nucleótido (AGGTCANAGGTCA), llamada repetición directa. Bajo el estado no ligado, los heterodímeros PPAR α y el receptor x retinoico alfa (RXR α) están unidos a represores multicomponentes que contienen actividad de histona desacetilasa, como el co-represor del receptor nuclear y el mediador silenciador para el receptor de hormona tiroidea y retinoide, inhibiendo así la transcripción génica (Viswakarma , y otros, 2010). Después de la estimulación por los activadores de PPAR α , los heterodímeros PPAR α y RXR α se disocian de los co-represores y reclutan co-activadores como el co-activador del receptor de esteroides-1 (SRC-1) y la proteína de unión a PPAR α con actividad de histona acetilasa, y posteriormente se unen a los PPRE de sus genes blanco para modular la transcripción génica (**Figura 2**).

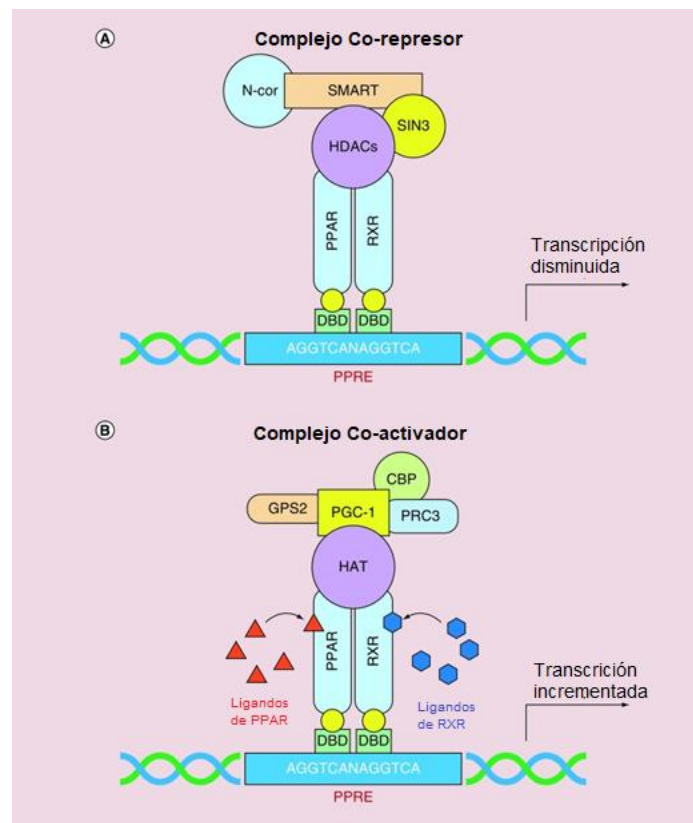


Figura 2. Regulación génica mediada por PPAR α . En estado no ligado, los heterodímeros PPAR α /RXR α están unidos a represores multicomponentes que contienen actividad de histona desacetilasa, como NcoR y SMRT, inhibiendo así la transcripción génica (A). La unión del ligando a PPAR α o RXR α provoca el

desplazamiento de represores unidos, el reclutamiento de co-activadores como SRC-1 y el PBP y la modulación transcripcional (principalmente activación) de la transcripción génica (B). SMRT: Mediador silenciador de los receptores retinoicos y tiroideos; DBD: dominio de unión a ADN; NcoR, Co-represor del receptor nuclear; PBP: proteína de unión a PPAR; PPRE, RE del proliferador de peroxisoma; RXR, receptor de retinoide X; SRC-1, Co-activador de receptor nuclear 1; PBP, Proteína de unión a PPAR α ; CBP, Proteína de unión a CREB; GPS2, Supresor 2 de la ruta de proteínas G; PGC1, Co-activador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1- α ; PRC3, Co-activador relacionado con PGC-1; HDAC, Complejos histona desacetilasa; SIN3, Independiente de Swi 3; ADN, Ácido desoxirribonucleico; PPAR α , Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa (Han, Shen, Bittner , Kraemer , & Azhar , 2017).

Este receptor nuclear se activa por ciertos ligandos naturales y sintéticos para modular la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (**Figura 3**). Se ha demostrado que los principales ligandos naturales de PPAR α son los ácidos grasos, dentro de los cuales los poliinsaturados tienen una mayor afinidad por este factor de transcripción. Además, se conoce que algunos eicosanoides como el leucotrieno B4 y el ácido 8 hidroxí-eicostetraenoico pueden activar a este factor de transcripción (Contreras , Torres, & Tovar, 2013). Se ha demostrado que la célula es capaz también de sintetizar un ligando endógeno específico para PPAR α , el 1-palmitoil.2oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (Chakravarthy, y otros, 2009). Por otro lado, se han descubierto una serie de moléculas que son ligandos sintéticos de PPAR α , dentro de los que se encuentran los fibratos como el bezafibrato, fenofibrato y clofibrato, así como el Wy14643. Para que este receptor nuclear se una al DNA se requiere que forme un heterodímero con el receptor X retinoico (RXR α) (Viswakarma , y otros, 2010). Este heterodímero interactúa con el PPRE, el cual tiene una secuencia consenso que consiste en repetidos directos separados por un nucleótido (AGGTCA N AGGTCA) (Osada , Tsukamoto , Takiguchi , Mori , & Osumi, 1997).

Se ha reportado que la expresión de genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos se encuentra regulada positivamente en ratones *Ppara-null* en comparación con los ratones silvestres (Kersten, y otros, 2001), sugiriendo que PPAR α podría tener un papel en la regulación de la expresión de los genes asociados con la oxidación de los aminoácidos, incluyendo también genes relacionados con el ciclo de la urea.

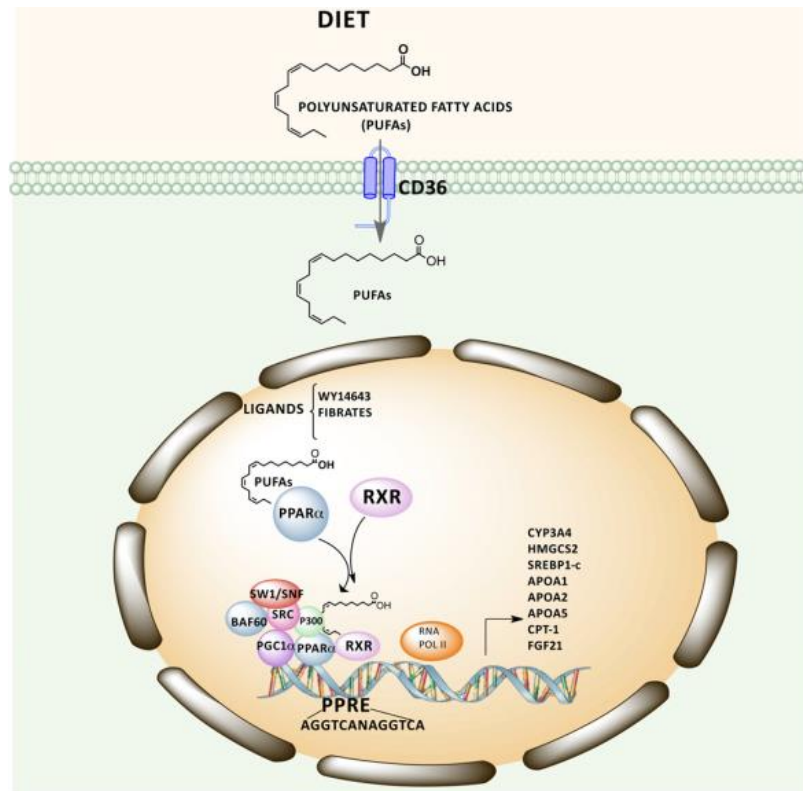


Figura 3. Representación esquemática de la transcripción de genes diana de PPAR α . La transcripción de genes diana depende de la unión del ligando y el reclutamiento de co-activadores. PPAR- α puede ser activado por ciertos ligandos, tales como PUFAs y los fibratos, que modulan la transcripción de los genes blanco de PPAR α . La unión al ADN requiere la formación de un heterodímero que contiene PPAR α y RXR α una que es capaz de interactuar con los elementos de respuesta del proliferador de peroxisomas. APO: apolipoproteína; BAF60, gen 1 relacionado con Brahma/factor 60 asociado a Brahma; CD36, Cluster de diferenciación 36; CPT-1, Carnitina palmitoiltransferasa I; CYP, citocromo P-450; FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21; HMGCS2,

hidroximetilglutaril CoA sintasa 2; p300, histona acetiltransferasa p300; PGC1 α , co-activador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1- α PPRE, elemento sensible al proliferador de peroxisomas; ARN POLII: ARN polimerasa II; SRC, co-activador del receptor de esteroides; SREBP1-c, proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c; SW1/SNF, complejo modificador de cromatina no modificable de conmutación/sacarosa. (Imagen adaptada de (Contreras , Torres, & Tovar, 2013)).

Estudios posteriores reforzaron este concepto, ya que se observó que en ratas alimentadas con dietas que contenían diferentes concentraciones de proteína, la adición del ligando sintético de PPAR α , el Wy 14,643, disminuía las concentraciones del RNAm de las enzimas del catabolismo de aminoácidos como la HAL, la deshidratasa de serina (SDS) y TAT (Aleman, y otros, 2013). Sin embargo, estudios de EMSA mostraron que no hay interacción entre PPAR α con la secuencia promotora de los genes que codifican para las enzimas (Aleman, y otros, 2013). Estos resultados sugirieron que PPAR α probablemente activaba en parte la transcripción de las enzimas del catabolismo de aminoácidos, pero que la activación podría estar realizando indirectamente a través de una segunda vía directamente implicada en el control transcripcional. Para estudiar la posibilidad de un efecto indirecto de la activación de la expresión de ECAs por PPAR α , Contreras y colaboradores evaluaron el papel de PPAR α sobre el metabolismo de aminoácidos, usando el modelo del ratón Knock out para PPAR α (*Ppara null*) alimentados con dietas que contenían concentraciones crecientes de proteína (Contreras, y otros, 2015). Como era de esperarse, los ratones PPAR α -/- presentaron un incremento en la expresión de las ECAs en hígado, como se observó en el estudio de Kersten (Kersten, y otros, 2001). El análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados por el consumo de proteína dietaria, mostró una red de interacción de PPAR α con diversos genes, dentro de los cuales se encontró a HNF4 α , el cual podría ser el mediador directo de la regulación de la expresión de ECAs, a través de un mecanismo de interacción indirecta con el PPAR α (**Figura 4**).

reconocimiento en un elemento de repetición directa (AGGTCA) con un espaciador de uno o dos nucleótidos (designada como DR1 DR2, respectivamente) (Fang, Mane-Prados, Bolotin, Jiang, & Sladek, 2012). El HNF4 α se expresa en niveles altos en el hígado, y en menor grado en el riñón, el intestino delgado, colon y páncreas. Este factor transcripcional se compone de seis dominios nombrados de la A a la F como se muestra en la **Figura 5** (Sladek, Zhong, Lai, & Darnell, 1990).

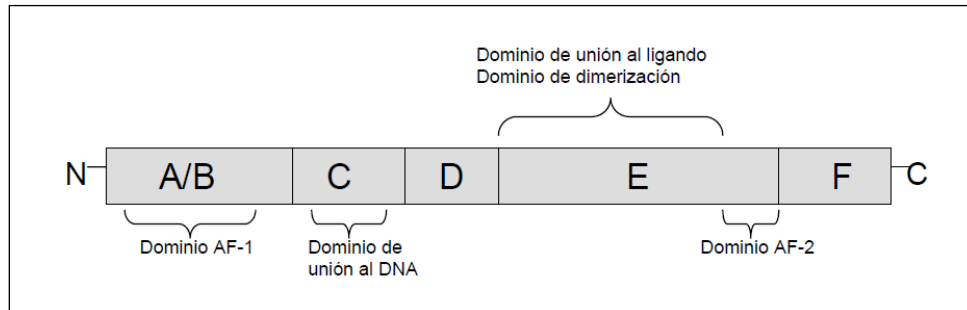


Figura 5: Dominios funcionales de HNF4. El dominio A/B se encuentra en el extremo amino terminal, y contiene un motivo llamado AF-1 (función de activación 1) que implica un mecanismo de transactivación constitutivo que es independiente de la función del ligando. El dominio C, o DBD (DNA Binding Domain) consta de 66 residuos de aminoácidos, es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Se caracteriza por una estructura de dedos de zinc con una conformación de hélice que permite la interacción con el surco mayor del DNA. Este dominio también se encuentra implicado en el mecanismo de dimerización de los receptores. El dominio D es una unión flexible entre el dominio C y el dominio E, y permite los fenómenos de rotación de estos últimos. Este dominio se encuentra implicado en la localización nuclear. El dominio E o LBD (Ligand Binding Domain) es una región compleja. Contiene el sitio de fijación al ligando, e interviene en la dimerización y en la transactivación (AF-2, función de activación 2), este dominio también está implicado en la localización nuclear. La función del dominio F no está determinada, algunos receptores no poseen el dominio F o éste es muy corto (Imagen adaptada de (Sladek, Zhong, Lai, & Darnell, 1990)).

1.5.1 Ligando de HNF4 α

El HNF4 α se clasificó originalmente como un receptor huérfano que presentaba actividad de transactivación constitutiva, aparentemente por estar ligado de forma continua a una variedad de ácidos grasos (Giguère, 1999). Se propuso que los ácidos grasos de cadena larga modulaban directamente la actividad transcripcional de HNF4 α mediante la unión con sus tioésteres de acil-CoA en el LBD de HNF4 α . Esta unión puede modular positiva o negativamente la actividad transcripcional de HNF4 α , dependiendo de la longitud y el grado de saturación del ácido graso. Se ha identificado al ácido linoleico (LA) como el ligando endógeno reversible de HNF4 α en el hígado del ratón (Yuan, y otros, 2009). Tras la unión al DNA (**Figura 6**), HNF4 α recluta co-activadores y otras proteínas transcripcionales accesorias que regulan positivamente la expresión de sus genes blanco. En el hígado, donde HNF4 α se localiza exclusivamente en el núcleo de los hepatocitos, éste regula la expresión constitutiva de un gran número de genes blanco (Sladek F. , Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), in Liver., 1994).

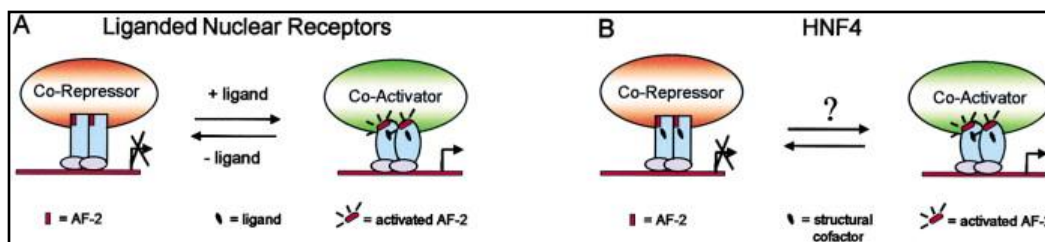


Figura 6. Modelo de acción de receptores nucleares huérfanos. (A) Para los receptores nucleares con ligandos conocidos, sus regiones promotoras reclutan complejos co-represores que mantienen la transcripción del gen blanco apagado. Con la unión a su ligando (agonista), el receptor experimenta un cambio conformacional que pone la AF-2 en una conformación activa que recluta co-activadores y la transcripción se lleva a cabo. Por el contrario, HNF4 se une constitutivamente a ácidos grasos como cofactores estructurales, planteando la pregunta de cómo se hace el cambio del complejo co-represor al complejo co-activador. HNF4 α , Factor hepático nuclear 4 alfa; AF-2, función de activación 1 (Imagen adaptada de (Sladek F. , Desperately Seeking...Something, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que PPAR α está involucrado en activar la expresión de genes de la oxidación de ácidos grasos y de reprimir la de los aminoácidos, el conocimiento del mecanismo de acción para regular el catabolismo de los aminoácidos puede generar estrategias, a través de las cuales se apoye a personas en condiciones de catabolismo acelerado, el cual se presenta de manera frecuente en varias alteraciones metabólicas. Además, es importante a nivel de investigación básica conocer cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión de genes del catabolismo de aminoácidos, a través de la interacción de PPAR α con HNF4 α , de la cual se conoce poco. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue el evaluar el impacto metabólico de la pérdida de función de PPAR α sobre el consumo de diferentes cantidades de proteína dietética, y establecer el mecanismo molecular por el cual el catabolismo de aminoácidos se regula en el hígado por la interacción entre los factores de transcripción PPAR α y HNF4 α .

3. HIPÓTESIS

La regulación del catabolismo de los aminoácidos depende de la interacción a nivel de proteína entre PPAR α y HNF4 α .

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto metabólico de la pérdida de función de PPAR α sobre el consumo de diferentes cantidades de proteína dietética, así como establecer el mecanismo molecular por el cual el catabolismo de aminoácidos se regula en el hígado por la interacción entre los factores de transcripción PPAR α y HNF4 α .

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar si existe una interacción a nivel de proteína entre HNF4 α y PPAR α mediante ensayos de coimmunoprecipitación.
2. Estudiar el efecto de la expresión a nivel proteína de PPAR α sobre la estabilidad de HNF4 α .
3. Estudiar el efecto de PPAR α sobre la interacción entre HNF4 α y el promotor del gen de la SDS.
4. Realizar ensayos de inmunolocalización de HNF4 α y PPAR α en el hígado de ratones silvestres C57BL/6 alimentados con diferentes concentraciones de proteína dietaria.
5. Estudiar el efecto de ingesta de diferentes concentraciones de proteína sobre la ganancia de peso y parámetros bioquímicos en los ratones silvestres C57BL/6 y *Ppara null*.
6. Estudiar el efecto de la carencia de PPAR α en comparación de los ratones silvestres C57BL/6 sobre la composición corporal mediante resonancia magnética.
7. Ver el efecto de la carencia de PPAR α en comparación de los ratones silvestres C57BL/6 sobre el gasto energético e intercambio respiratorio por calorimetría indirecta.
8. Analizar la expresión de HNF4 α , PPAR α y enzimas catabolizadoras de aminoácidos en el hígado de ratones silvestres C57BL/6 y *Ppara null*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo celular y transfecciones para la Co-inmunoprecipitación y ensayos de estabilidad de HNF4 α

Las células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) se mantuvieron en medio esencial mínimo (MEM) de Gibco™ suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las transfecciones se realizaron con el reactivo de Lipofectamine® LTX con Plus™ (Thermo Fisher Scientific) en un medio sin antibiótico y sin SFB. La transfección se llevó a cabo con solo el plásmido Flag-HNF4 α , por otro lado, se cotransfectó con Flag-HNF4 α y PPAR α , por último, se transfectó con Flag-HNF4 α , PPAR α y RXR α , para normalizar se añadieron plásmidos vacíos en cada transfección. El medio fue reemplazado por MEM suplementado con 10% SFB, 5 h después de la transfección. Y 24 h después de la transfección, se llevó a cabo la lisis celular para obtener los extractos.

5.2 Co-inmunoprecipitación de proteínas

Las perlas magnéticas anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich M8823) se incubaron con 500 μ g de proteína total de células HEK 293 transfectadas, durante toda la noche a 4 ° C en un rotor (LabRoller). Después de la incubación, las perlas se recogieron con un soporte magnético y se lavaron varias veces con buffer IP 100 (TRIS 500mM, MgCl₂ 5mM, 100 Mm KCl, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 1mM, glicerol 10%, DTT 1Mm, NP40 1%). Se eluyeron las proteínas inmunoprecipitadas fueron eluidas por calentamiento durante 5 min en buffer de muestra Laemmli (Bio-Rad, Hercules CA, EE. UU.), seguido de SDS-PAGE (Electroforesis Desnaturalizante en Gel de Poliacrilamida). Los plásmidos de PPAR α y RxR α se compraron en la empresa Addgene, mientras que el plásmido de FLAG-HNF4 α fue una donación de la Dra. Elizabeth Langley del Instituto Nacional de Cancerología.

5.3 Western blot

Los ensayos de western se realizaron en SDS-PAGE, con un porcentaje del 8%. Las corridas electroforéticas fueron de 75 V durante 20 min y después a 100 V durante 1 h y media. Para la transferencia se utilizaron membranas de nitrocelulosa en cámara

húmeda durante 1 h a 100 V. Al término se bloquearon las membranas con leche al 5 % de Bio-Rad®. La misma solución, pero al 1 % se utilizó para diluir 1:1000 los anticuerpos primarios de HNF4 α , RXR α y PPAR α , con los que se incubaron las membranas durante 12 h a 4 °C, se lavó abundantemente con TBS-tween y se incubó con el anticuerpo secundario de ratón diluido 1:3000 en leche al 1 % durante 1 h. Las membranas se revelaron usando los reactivos de detección de quimioluminiscencia de Bio-Rad® y se observaron utilizando el fotodocumentador ChemicDoc.

5.4 Modelo animal y tratamientos dietarios

Se utilizaron ratones macho cepa C57BL/6 y *Ppara*-null de 7-9 semanas de edad con un peso promedio de 20-22 g. Esta cepa transgénica tiene deletado un fragmento de 83 pb del exón 8 del gen de PPAR α y en su lugar tiene un cassette de resistencia a neomicina que se traduce en un PPAR α no funcional. Para evaluar el papel de PPAR α en el catabolismo de aminoácidos, los ratones C57BL/6 y *Ppara*-null se alimentaron con tres diferentes dietas isocalóricas *ad libitum* durante 10 días. Se manejaron 3 grupos, un grupo fue alimentado con la dieta control con los requerimientos de la *American Institute of Nutrition* (AIN-93), otro grupo de ratones fueron alimentados con una dieta baja en proteína correspondiente al 6% y el tercer grupo con 50% de proteína (Tabla 1), ajustando la concentración de proteína con carbohidratos. Al término de los 10 días, los ratones se dividieron en dos grupos de 8 ratones, un grupo de ratones se mantuvo en ayuno durante 16 h (de las 5 pm a las 9 am del siguiente día) antes de ser sacrificados, y el segundo grupo se sacrificó después de 3 horas de alimentación (de las 6 am a las 9 am). Se anestesiaron los ratones con sevoflurano y se extrajo sangre de la vena cava. Por otro lado, se extrajo el hígado y se almacenó a -70 ° C para su posterior análisis. Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité de Cuidado Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (FNU-1828-16 / 19-1).

Tabla 1. Composición de la dieta AIN-93 ajustada con distintas concentraciones de proteína y carbohidratos.

	AIN-93G (g/kg) 6% proteína/77% carbohidrato	AIN-93G (g/kg) 20% proteína/63% carbohidrato	AIN-93G (g/kg) 50% proteína/33% carbohidrato
Almidón	485.88	397.5	209.94
Caseína (>85% proteína)	60	200	500
Dextrinas	161.36	132	69.72
Sacarosa	122.24	100	52.82
Aceite de soya	70	70	70
Fibra (celulosa)	50	50	50
Mezcla de minerales	35	35	35
Mezcla de vitaminas	10	10	10
L-cistina	3	3	3
Colina	2.5	2.5	2.5

5.5 Determinación del gasto energético y coeficiente respiratorio

El gasto energético y coeficiente respiratorio se midió a través de colorimetría indirecta utilizando el equipo *Oxymax-CLAMS Lab Animal Monitorin System* (Columbus

instruments, Columbus, OH, EUA)). Al término de los 10 días de tratamiento se colocaron los animales en jaulas individuales cerradas herméticamente y conectadas a un flujo de aire, después de un periodo de aclimatación de 12 h. Se evaluó el consumo de oxígeno (VO_2 , mL/kg/h) y la producción de CO_2 (VCO_2 , mL/kg/h), durante los periodos de ayuno y alimentación. Dichos parámetros se midieron durante un lapso de 90s, repitiéndose cada 22 min durante 24 horas. El coeficiente respiratorio se calculó como una relación entre el CO_2 producido respecto del O_2 consumido (VCO_2/VO_2). Por lo que el coeficiente respiratorio se determinó de la siguiente manera:

$$RE = \frac{VCO_2 \text{ producido}}{VO_2 \text{ consumido}}$$

El coeficiente respiratorio nos permite determinar qué fuente de carbono se está oxidando:

Carbohidratos (glucosa)



Lípidos (ácido palmítico)



5.6 Variables bioquímicas plasmáticas

Se tomó sangre por punción cardiaca con una jeringa heparinizada el día de la eutanasia, la sangre se centrifugo a 3000 rpm durante 15 min y se separaron 200 μ L de plasma. Se cuantificó glucosa, triglicéridos, colesterol y urea por métodos enzimáticos colorimétricos mediante el uso del auto analizador Cobas C11 de Roche®.

5.7 Extracción de proteínas y Western blot

Las proteínas se extrajeron del hígado usando un amortiguador de lisis (Tris 50 mM (pH 7.4), KCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, NAM 5 mM, butirato de sodio 1 mM e inhibidores de proteasa). Se cargaron 20 μ g de proteína extraída en geles SDS-PAGE (10%) y luego fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno

(Bio-Rad). Se bloqueó con 5% de leche en polvo libre de grasas. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos específicos contra PPAR α (sc-9000 1: 1000), RXR α (sc-553 1: 1000), HNF4 α (sc-8987 1: 1000), Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (sc-365062 1: 1000) y Lamina β (sc- 6216: 1000), obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Las proteínas de interés se detectaron con un anticuerpo inmunoglobulina G- H&L (IgG-H & L) anti-ratón de cabra (ab6789 1: 15000), IgG anti-conejo de cabra H&L (ab6721 1: 18000) de Abcam, o anticuerpo IgG anti-cabra de conejo (sc-2768, 1: 3500) de Santa Cruz Biotechnology. Las reacciones de detección de anticuerpos se llevaron a cabo utilizando el kit: Sustrato quimioluminiscente Immobilon Western de HRP (Millipore, Temecula, CA). La quimioluminiscencia se digitalizó utilizando un sistema de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA) y analizados utilizando el software ImageJ.

5.8 Ensayo de luciferasa

Las células de la línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) se transfectaron con la construcción del promotor del gen SDS insertado en el plásmido GL3 (pGL3b) (PGL3b-SDS) (Promega) usando FuGENE HD (Roche Applied Science). Las celdas fueron cotransfectadas con los vectores de expresión Flag-HNF4 α , PPAR α y RXR α . El vector pGL3b también se transfectó como control basal; después de 24 h de incubación, se lisaron las células de acuerdo con el protocolo dual luciferasa (Promega®). Se midió la actividad como unidades relativas de luz con un BD Monolight Luminómetro 3010C (BD Biosciences Pharmingen®). Se cuantificó la proteína total por el método de Lowry (BIO-Rad) para normalizar. Cada tratamiento se realizó por triplicado y todos los experimentos se repitieron al menos tres veces. La actividad de la luciferasa se midió como unidades relativas de luz con un BD Monolight 3010C luminómetro (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.). La concentración de proteínas de las muestras se determinó usando el ensayo de Lowry (Bio-Rad) para normalizar la eficiencia de la transfección.

5.9 Silenciamiento de HNF4 α

Se sembraron placas de seis pozos con células HepG2 a una densidad de 2×10^5 células/pozo en 3 ml de MEM (Gibco), y después de 24 h se realizó la transfección transitoria utilizando el Reactivo de transfección de Lipofectamine LTX & PLUSTM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, se agregaron 500 ng de pequeños RNA de horquilla de HNF4 α (sh HNF4 α) o el control del ácido ribonucleico de horquilla (sh RNA-control) a los pozos, por triplicado, junto con 400 ng de la construcción PGL3b-SDS (Promega) (-831 / + 290 pb) y 100 ng del plásmido HNF4 α marcado con Flag. Después de 72 h de transfección, las células se lisaron con 200 μ L de buffer de lisis pasivo de acuerdo con el protocolo dual luciferasa (Promega®). La actividad de la luciferasa se midió como unidades de luz relativa con el luminómetro BD Monolight 3010C (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.). La concentración de proteína de las muestras fue determinada de acuerdo con el ensayo de Lowry (Bio-Rad) y se usó como control para normalizar eficiencia de transfección.

5.10 Inmunofluorescencia

Para identificar las células que expresan PPAR α y HNF4 α , se realizaron cortes del hígado de 2 μ m fijadas con formalina. El tejido incluido en parafina se colocó en portaobjetos cargados positivamente. La desparafinización y La rehidratación se realizó utilizando xileno y alcoholes graduados. La recuperación de antígeno se llevó a cabo durante 10 min a 100 ° C con buffer de citrato, pH 6.0 (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.), Los portaobjetos se lavaron con agua desionizada y luego con buffer de lavado y se evitó la tinción de fondo inespecífica incubado durante la noche a 4 ° C con un bloqueador de fondo IHC (Enzo Life Sciences). Después se incubó con la adición de anticuerpos específicos contra PPAR α (sc-9000 1: 1000) y HNF4 α (sc-8987 1: 1000) (Santa Cruz Biotechnology) diluido a 10 μ g / ml durante 1 h a 4 ° C. Para la detección de la unión, las muestras de tejido se incubaron con Alexa de cabra anti-conejo, anticuerpo secundario conjugado con flúor 488 (1: 500, ab150077, Abcam) y anti-conejo de cabra DyLight™ 549 (1: 2000, FDR549C, Biocare Medical) a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. Finalmente, se utilizó DAPI para los

núcleos (UltraCruz Aqueous Medio de montaje con DAPI, Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó un control negativo universal (específico para anticuerpos de conejo, ratón o cabra) (Enzo Life Sciences) en lugar de un anticuerpo primario.

5.11 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se procedió a la realización de ensayos de ChIP en tejido de hígado de ratones C57BL/6 y *Ppara null* alimentadas por 10 días con 6, 20 y 50 % de caseína que representaban una dieta baja, normal y alta en proteína, respectivamente.

5.11.1 Cross-linking y lisis celular

En un mortero con nitrógeno líquido o hielo seco se pulverizó el hígado congelado a -20 °C, se pesaron 200 mg de tejido y se colocó en un tubo Falcón de 15 mL con 5 mL de solución de *cross-linking* con buffer de fosfatos (PBS) 1x y formaldehído al 1% (0.1 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.5 mM de EGTA y 50 mM de HEPES, pH 8). Se colocaron en agitación por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando glicina 2.5 M, teniendo una concentración final de 0.125 M, se dejó en agitación otros 5 min a T.A. Las muestras de tejido se centrifugaron 5 min a 5000 rpm a 4°C, seguido de tres lavados de 10 min a 4 °C con PBS frío, entre cada lavado se centrifugaba a 5000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis celular (60 mM de KCl, 1 mM de EDTA 0.5% de NP40 y 10 mM HEPES, pH 8) y se centrifugó 10 min a 8000 rpm a 4°C. Se quitó con cuidado el sobrenadante y se agregó 1 mL de buffer de lisis de núcleos (10 mM de EDTA, 1% SDS y 50 mM de Tris-HCl, pH 8).

5.11.2 Sonicación

Se obtuvieron fragmentos de alrededor de 300 a 500 pb con el sonicador EpiSonic™. *Multi-Functional Bioprocessor* 1100. La sonicación se llevó a cabo en 20 ciclos, con 60 seg de sonicación y 60 seg de descanso usando una amplitud de 40 % a 4°C. Se tomó una pequeña alícuota para revertir el *cross-linking*, cuantificar el DNA y correr un gel de agarosa para verificar el tamaño de los fragmentos sonicados.

5.11.3 Inmunoprecipitación

Después de sonicar, se centrifugaron las muestras a 11 000 x g a 4°C por 10 min, guardando una pequeña alícuota del sobrenadante antes de desecharlo. Se hizo una dilución 1:10 con el buffer de dilución (150mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 1% de triton X-100 y 20 mM Tris-HCl, pH 8). Se incubó la cromatina soluble por 4 h a 4°C en agitación constante con 40 uL de suero de caballo y 40 uL de perlas de agarosa con proteína A/G, a una temperatura de 4°C se centrifugó a 300 rpm por 5 min, se tomó el sobrenadante y se agregó 4 µg de anticuerpo para anti-HNF4α, anti-IgG (control negativo) por separado y se incubó toda la noche a 4°C. Al siguiente día a cada inmunoprecipitación se agregó 40 uL de perlas magnéticas de proteína A/G con DNA de esperma de salmón (ssDNA) se dejó rotando por 4 h a 4°C. Se recuperaron las perlas y se lavaron secuencialmente por 10 min en los buffers: PARO I (0.1% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), 2 mM de EDTA, 1% de triton X-100, 20 mM Tris-HCl y 150 mM de NaCl), PARO II (0.1% SDS, 2 mM de EDTA, 1% de triton X-100, 20 mM Tris-HCl y 500 mM de NaCl) y PARO III (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% Deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8). Al finalizar de los lavados con los buffers de paro, se llevó a cabo el último lavado dos veces con buffer TE. Por último se agregó a las perlas 150 µL de la solución de lavado de perlas y se incubó durante 15 min a 37 °C, se centrifugó a 3000 rpm/1 min y se recuperó el sobrenadante, se repitió el paso anterior, recuperando de nuevo el sobrenadante teniendo un volumen final de 300 ul, posteriormente para revertir el *cross-linking* se incubó con NaCl 5M y RNAsa 10ug/mL a 65 °C por 4 h, al término de esta incubación se agregó proteinasa K y se incubó a 60°C durante 1 h para revertir el *cross-linking* y se purificó la cromatina por el método de fenol-cloroformo.

Se realizó un análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos que flanquean el sitio putativo al RE a HNF4α (HRE) en el promotor del gen de HNF4 α, utilizando los siguientes cebadores: GGC TCA GTG GGT AAG AGC AC (directo) y GAG CGA GCG AGA GGA GTA GA (reverso). Se utilizó el siguiente programa: 95 °C durante 5 min seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 61.6 °C durante 1 min y 72 °C durante 2 min, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.0 % (peso / volumen). Para la PCR en

tiempo real, se utilizaron 2 μ l de muestra purificada con 1 pmol de cebadores flanqueantes y 5 μ l de SYBR Green Master Mix (Roche). El esquema de PCR utilizado fue de 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 61 °C durante 1 min. La amplificación y detección de productos específicos se realizó con un *Light Cycler* 480 (Roche). Las cantidades relativas se calcularon utilizando el ciclo umbral (CT) comparativo como porcentaje de la entrada de CT para cada muestra para la normalización.

5.12 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar (SD). Se utilizó una prueba t de Student para comparar diferencias entre dos grupos no apareados. El análisis de más de dos grupos se realizó por una prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de menor diferencia significativa (LSD) de Fisher. Se utilizó ANOVA cuando se compararon dos variables, como la concentración de proteína en la dieta y el genotipo, seguido de la prueba post hoc LSD de Fisher para múltiples comparaciones e interacciones de variables. Todos los valores de p fueron de dos colas con un valor de significancia menor a 0.05. Además, se muestran las comparaciones múltiples resumidas con letras pequeñas. Cuando un grupo fue diferente a otro, a la barra más alta se le asignó la letra a, al grupo con la siguiente mayor diferencia significativa se le asignó la letra b, y así sucesivamente hasta la letra d. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software GraphPad Prism* (GraphPad Prism 7, San Diego, CA).

6.- RESULTADOS

6.1 Interacción a nivel de proteína entre HNF4 α y PPAR α

Primero se evaluó la regulación de HNF4 α en células HEK 293, un modelo ideal por no expresar HNF4 α endógeno, determinando si la abundancia de la proteína HNF4 α se modificó por la presencia del agonista de PPAR α , Wy14643. En condiciones basales, la transfección de estas células con HNF4 α , PPAR α y RXR α ligeramente aumentó la abundancia de la proteína nuclear de HNF4 α , y después de 36 y 48 h, se observó una disminución significativa en los niveles de la proteína nuclear de HNF4 α (**Figura 7A y B**). La activación selectiva de PPAR α con Wy14643 resultó en un aumento progresivo en la abundancia de proteína nuclear de HNF4 α después de 12, 24 y 36 h de estimulación, efecto que se perdió después de 48 h de incubación con este compuesto (**Figura 7A y B**). Estos resultados sugieren que la activación de PPAR α promueve la translocación nuclear de HNF4 α . Dado que la unión de Wy14643 a este factor de transcripción implica el reclutamiento de su pareja el heterodímero RXR α , se evaluó si el cambio en la estabilidad de HNF4 α estaba posiblemente mediado por una interacción potencial entre PPAR α y RXR α . Para ello, se cotransfectaron células HEK 293 con los vectores de expresión PPAR α y HNF4 α , o una combinación de los tres factores de transcripción PPAR α , RXR α y HNF4 α . Se observó que la cotransfección con los tres receptores de transcripción redujo significativamente la abundancia proteica total de HNF4 α ; sin embargo, la coexpresión de PPAR α con HNF4 α en ausencia de RXR α no afectó la abundancia total proteica de HNF4 α (**Figura 7C**). Interesantemente, la abundancia total de las proteínas PPAR α o RXR α no se modificó por la cotransfección con los tres receptores nucleares (**Figura 7C**), lo que sugiere que PPAR α y RXR α interactúan y modulan la abundancia de HNF4 α . Para demostrar que PPAR α interactúa con HNF4 α , se realizaron ensayos de Co-inmunoprecipitación. Llama la atención que cuando HNF4 α se sobreexpresó con PPAR α en ausencia de RXR α , no se observó unión entre PPAR α y HNF4 α (**Figura 7D**). De hecho, PPAR α se unió a HNF4 α solo cuando las células se transfectaron con los tres receptores nucleares, lo que indica que la unión de HNF4 α a PPAR α está mediada por RXR α , como se muestra en la **Figura 7D**. Dado que este efecto sobre la reducción de la proteína HNF4 α después de la activación de PPAR α

se observó solo después de 48 h de estimulación, el resultado sugiere que la vida media de la proteína total de HNF4 α es superior a 48 h, lo que significa que antes de este tiempo la proteína HNF4 α es estable. Por tanto, se llevó a cabo un análisis del curso temporal de la abundancia de proteínas totales de HNF4 α en células cotransfectadas con los vectores de expresión para HNF4 α y PPAR α o HNF4 α , PPAR α y RXR α en presencia de cicloheximida, un inhibidor del proceso de traducción. Los resultados demostraron que la coexpresión de HNF4 α y PPAR α o HNF4 α , PPAR α y RXR α no cambió la concentración de HNF4 α total en las primeras 12 h de incubación. Sin embargo, la cantidad de la proteína total de HNF4 α se redujo significativamente después de 20 h de incubación en las células que coexpresaban HNF4 α /PPAR α y se trataron con cicloheximida (**Figura 7E y F**). Interesantemente, la coexpresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α redujo rápidamente los niveles de proteína total de HNF4 α después de 12 h de incubación, lo que sugiere que la presencia de PPAR α y RXR α promovió una rápida tasa de degradación de HNF4 α (**Figura 7E y F**).

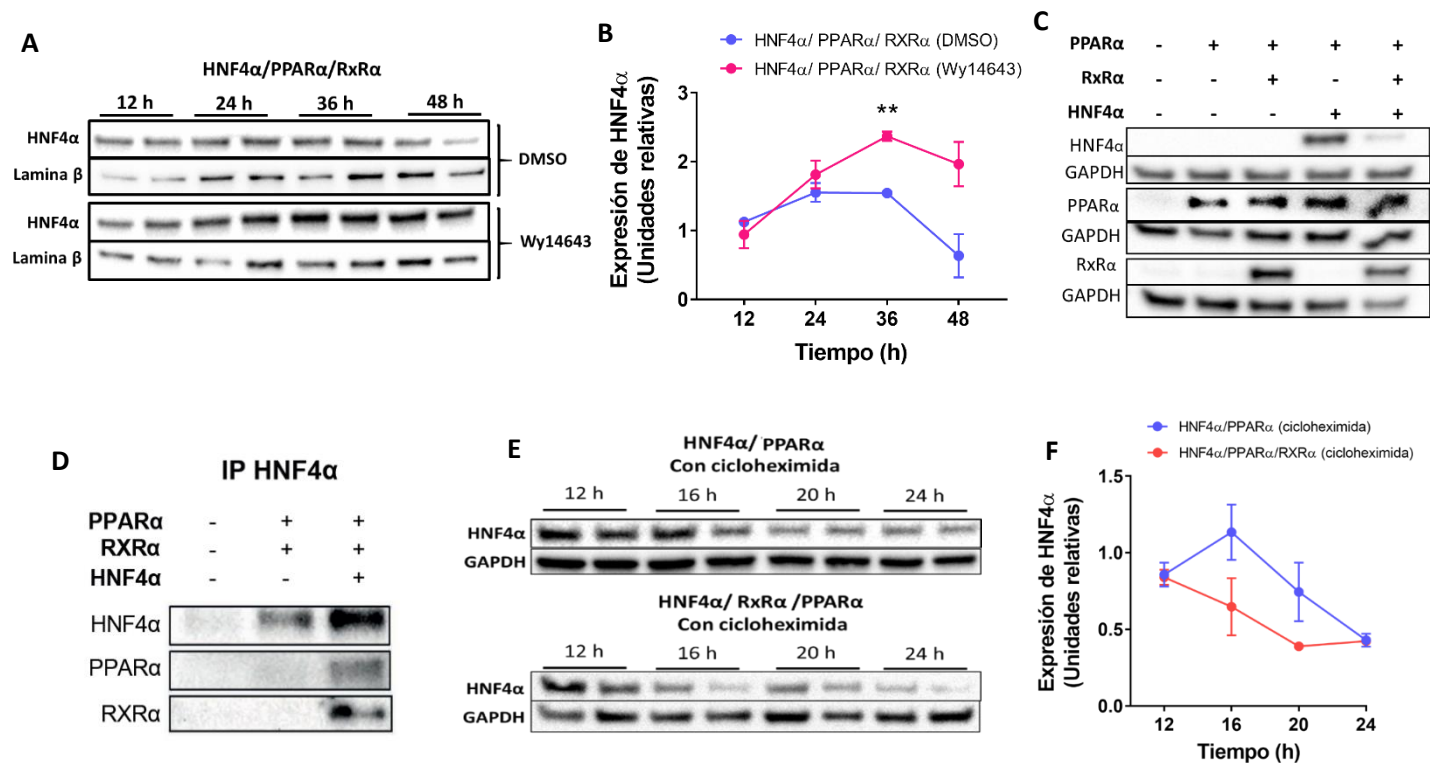


Figura 7: Regulación de HNF4α por PPARα y RXRα. (A) Western blot y (B) Análisis densitométricos de los niveles de proteína nuclear de HNF4α normalizadas con el control lamina β, después de la incubación con el ligando sintético Wy14643 o vehículo (DMSO) durante 12, 24, 36 o 48 horas en células HEK 293 transfectadas con HNF4α, PPARα y RXRα. (C) Western blot de la cantidad de proteínas totales de HNF4α, PPARα o RXRα en células HEK 293 transfectadas con PPARα en presencia o ausencia de HNF4α y RxRα o en combinación con los tres factores de transcripción. GAPDH se usó como proteína estructural. (D) Diseño esquemático de la coimmunoprecipitación de HNF4α con RxRα. Se inmunoprecipitaron (IP) extractos de proteínas totales de células HEK 293 con HNF4α. Las proteínas HNF4α, PPARα o RxRα en el material inmunopurificado se detectaron mediante Western blot. (E) Western blot y (F) análisis densitométricos de la proteína HNF4α normalizada con el control GAPDH en células HEK 293 transfectadas con HNF4α y PPARα o HNF4α, PPARα y RXRα estimuladas con cicloheximida durante 12, 16, 20 y 24 horas. Wy14643, Ácido pirnixico; HEK 293, Células embrionarias de riñón humano 293; HNF4α, Factor hepático nuclear 4 alfa, PPARα, Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; RxRα, Receptor x retinoico allfa; DMSO, Dimetil sulfoxido; GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Los datos se presentan como la media ± SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de dos colas no apareada (para B y F). * p <0.05; ** p <0.01. n = 3.

6.2 Degradación proteasomal de HNF4 α por la interacción con PPAR α y RXR α

Para establecer el mecanismo potencial de degradación de HNF4 α después de la coexpresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α , se incubaron células HEK 293 en presencia o ausencia de un inhibidor de la vía de degradación del proteasoma (MG-132). Los resultados mostraron un aumento muy significativo en la cantidad de la proteína total de HNF4 α en las células transfectadas con HNF4 α y PPAR α después de 24 h de incubación con MG-132, en comparación con el mostrado en las células en presencia del vehículo (**Figura 8**). Se observó un patrón similar en las células cotransfectadas con los tres receptores nucleares; sin embargo, el aumento se detectó después de 12 h y se mantuvo después de 24 h de inhibición de la ruta de degradación del proteasoma (**Figura 8B**). Estos resultados sugieren que PPAR α induce la degradación de HNF4 α a través de la ruta del proteasoma, un efecto que se potencia rápidamente en presencia de RXR α .

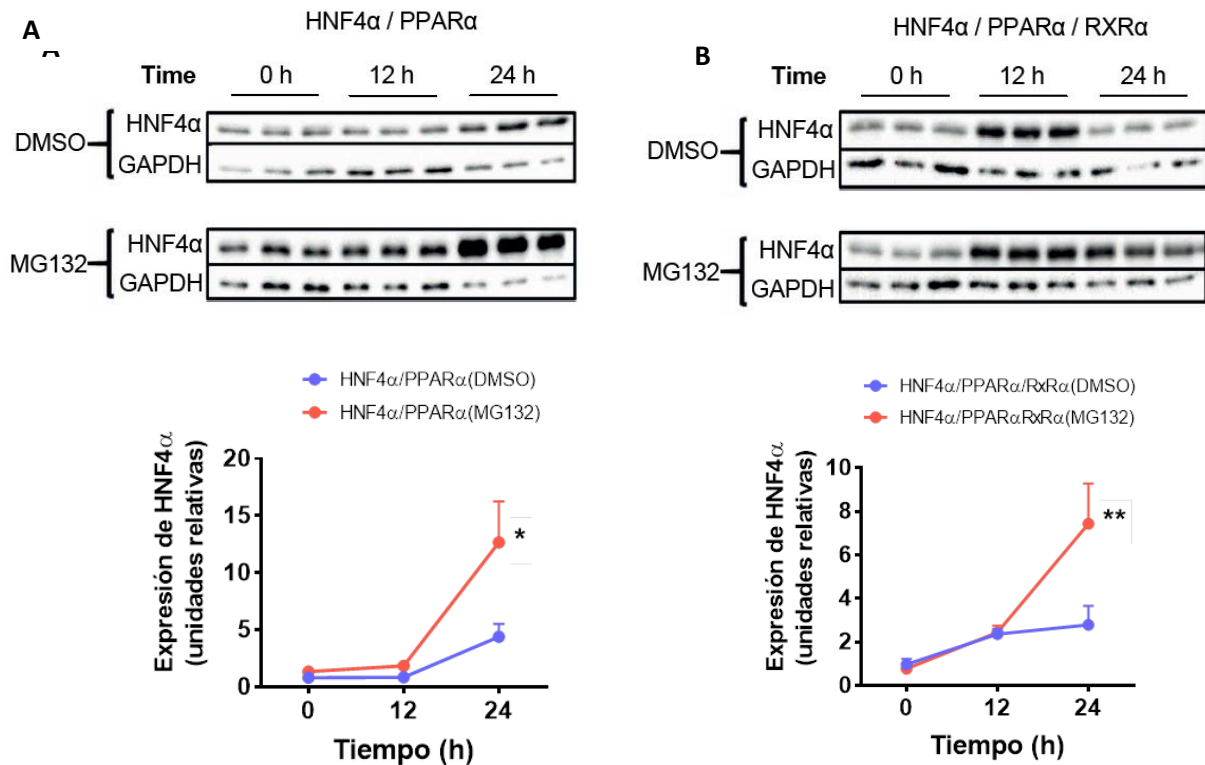


Figura 8: Degradación proteasomal de HNF4α por la coexpresión de HNF4α, PPARα y RXRα. Western blot y análisis densitométricos del efecto de (A) PPARα o (B) PPARα y RxRα sobre los niveles de proteína HNF4α en células HEK 293 después de 0, 12 o 24 horas de incubación con MG-132 o el vehículo (DMSO). HEK 293, Células embrionarias de riñón humano 293; HNF4α, Factor hepático nuclear 4 alfa, PPARα, Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; RxRα, Receptor x retinoico alfa; DMSO, Dimetil sulfoxido; GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; MG-132, inhibidor del proteosoma. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de dos colas no apareada (para A y B). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 3$.

6.3 Interacción entre HNF4α y el promotor de la SDS por la sobreexpresión de PPARα

Dado que se observó que la coexpresión de HNF4α, PPARα y RXRα disminuyó la cantidad de HNF4α, se investigó si esta interacción conduce a efectos funcionales a nivel

transcripcional en un gen blanco de HNF4 α . Por tanto, se llevó a cabo un análisis funcional utilizando un vector reportero cuya expresión está bajo el control del promotor del gen SDS (pGL3b-SDS). El análisis in silico de los promotores del gen de la SDS de rata reveló la presencia de un HRE con las correspondientes repeticiones directas DR1 y DR2 ubicadas de -6 a -30 pb y de -345 a -369 pb, respectivamente, del sitio de inicio de la transcripción de la hebra negativa (**Figura 9A**). Como era de esperar, la sobreexpresión de HNF4 α en células HepG2 indujo significativamente la actividad del promotor del gen de la SDS, mientras que el silenciamiento de este factor de transcripción utilizando un plásmido sh HNF4 α abolió este efecto (**Figura 9B**). La reducción en la cantidad de proteína total de HNF4 α después del silenciamiento selectivo fue validada por análisis de Western blot, que mostró una reducción de aproximadamente 77 % (**Figura 9C**). Para determinar el papel de PPAR α y RXR α en la modulación de la actividad transcripcional de HNF4 α , se cotransfectaron el plásmido SDS-Luc junto con vectores de expresión para HNF4 α , PPAR α y / o RXR α en células HepG2. De acuerdo con los resultados anteriores, la cotransfección del plásmido SDS-Luc con el vector que expresa HNF4 α aumentó significativamente la actividad de luciferasa en aproximadamente 2.1 veces, mientras que la cotransfección con PPAR α o RXR α no mostró un efecto sobre la actividad de luciferasa en comparación con el control (**Figura 9D**). Interesantemente, la cotransfección de SDS-Luc junto con HNF4 α y PPAR α o HNF4 α y RXR α en células HepG2 también aumentó la actividad del promotor del gen de la SDS en aproximadamente 2.1 veces (**Figura 9D**). En contraste, la cotransfección de SDS-Luc con HNF4 α , PPAR α y RXR α redujo significativamente la actividad de luciferasa en un 47 % en comparación con las células cotransfectadas con HNF4 α y PPAR α o HNF4 α y RXR α , lo que indica que la expresión de ambos, PPAR α y RXR α , es necesaria para reprimir la actividad transcripcional de HNF4 α al inducir su degradación (**Figura 9D**).

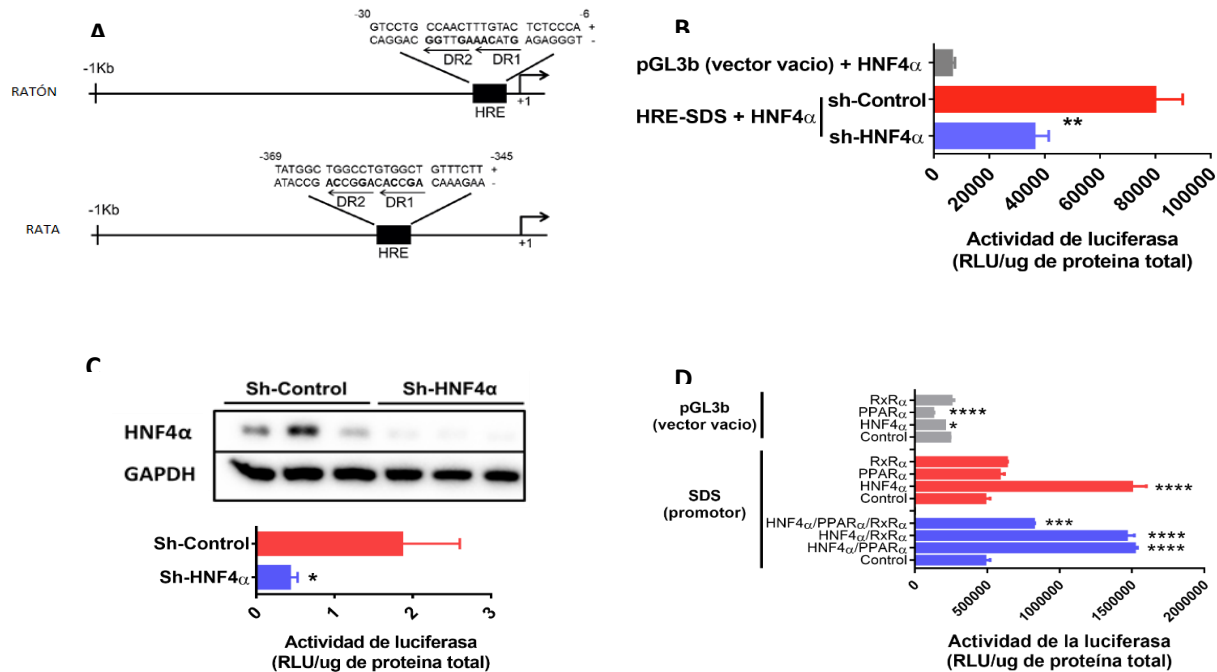


Figura 9: Regulación del promotor del gen de la SDS por la coexpresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α . (A) Representación esquemática de los promotores de del gen de la SDS de rata y ratón con sitios de unión putativos para la transcripción. La línea superior representa el promotor del gen de la SDS de ratón y la línea inferior representa el promotor del gen de la SDS de rata. El sitio de unión de HNF4 α propuesto en los promotores del gen de la SDS de ratón y rata está representado en negro y la numeración es relativa al sitio de inicio de la transcripción en los promotores de rata y ratón. (B) Se trataron células HepG2 con sh RNA-control y Sh HNF4 α durante 72 horas para un análisis funcional del promotor. (C) Western blot y análisis de densitometría de los niveles de proteína total de HNF4 α en células HepG2 después del tratamiento con sh RNA-control y Sh HNF4 α . (D) Se cotransfectaron células HepG2 con un plásmido indicador de luciferasa que contenía el promotor del gen de la SDS (SDS-pGL3b) junto con HNF4 α , PPAR α , HNF4 α o una combinación de estos genes. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron y analizaron para determinar la actividad luciferasa. Los datos muestran la relación entre la actividad luciferasa y la proteína total. Factor hepático nuclear 4 alfa, PPAR α , Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; RxR α , Receptor x retinoico alfa; DMSO, Dimetil sulfoxido; GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; Sh HNF4, Pequeños ARN de horquilla de HNF4 α ; HepG2, Línea celular de carcinoma hepatocelular. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc LSD de Fisher (para B y D) o la prueba t de dos colas no apareada (para C). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001 respecto al control (solo el promotor de la SDS). n = 3.

Para estudiar el papel de PPAR α en la regulación de los efectos mediados por HNF4 α sobre el metabolismo de aminoácidos *in vivo*, se utilizó un modelo de ratones *Ppara-null*. Tanto los ratones de la cepa silvestres (WT) y los *Ppara-null* fueron alimentados con dietas que contenían 6, 20 o 50% de PD durante 10 días.

6.4 Ganancia de peso e ingesta de proteína.

El estudio mostró que los ratones WT alimentados con diferentes concentraciones de PD no exhibieron un aumento de peso corporal significativamente mayor que el control, mientras que los ratones *Ppara-null* tuvieron menos aumento de peso a medida que aumentaba la cantidad de PD (**Figura 10A**). Los ratones *Ppara-null* y WT alimentados con 50% de PD mostraron un aumento significativo en la ingesta de proteína (**Figura 10B**), posiblemente como un mecanismo compensatorio del catabolismo de aminoácidos acelerado.

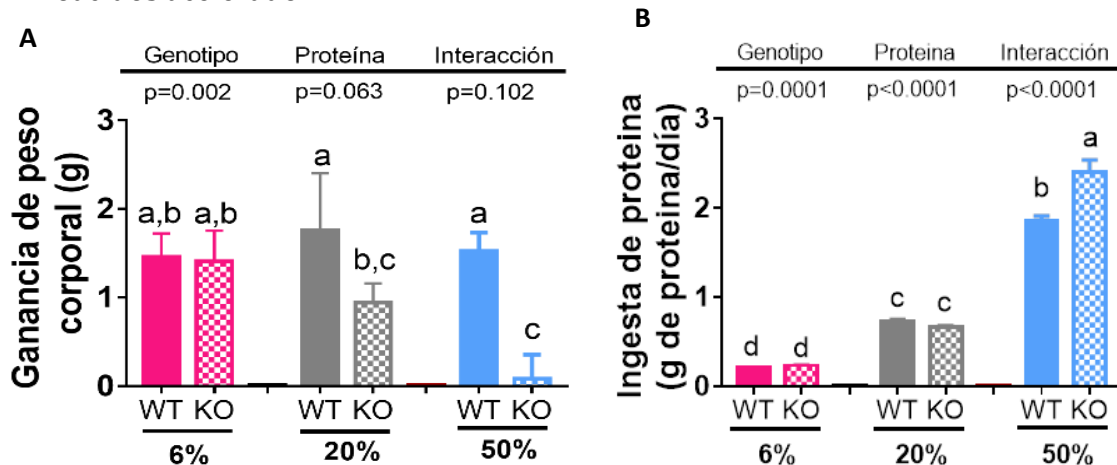


Figura 10: Ganancia de peso e ingesta de proteína. A) Ganancia de proteína de los ratones C57BL/6 y *Ppara-null* que consumieron 6, 20 y 50% de proteína en la dieta, así como B) la cantidad de proteína al día que consumieron durante el estudio. *Ppar-null* (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (WT), Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón.

Los resultados mostraron que en promedio todos los grupos consumieron la misma cantidad de alimento a excepción del grupo de ratones PPAR α que se alimentaron con

50% de proteína; sin embargo, este mismo grupo de ratones fue el que menos subió de peso.

6.5 Efecto de la carencia o sobreexpresión de PPAR α en ratones sobre su composición corporal mediante resonancia magnética.

El análisis de la composición corporal reveló que los ratones *Ppara*-null tenían un porcentaje más alto de masa grasa, pero una disminución significativa en la masa magra corporal en comparación con los controles WT (**Figura 11A, B**). Llama la atención que la masa de grasa en los ratones de ambos genotipos se redujo a medida que aumentaba la cantidad de PD (**Figura 11B**).

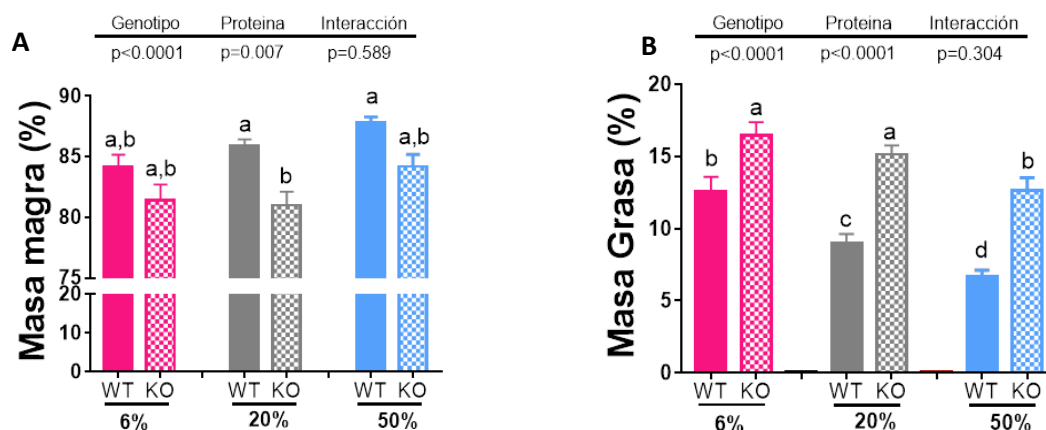


Figura 11: Composición corporal de la masa grasa y masa magra en los ratones C57BL/6 y *Ppara*-null. A) Masa magra y B) masa grasa después del consumo de una dieta proteica al 6, 20 y 50%. *Ppara*-null (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (WT), Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón.

6.6 Determinación de los parámetros bioquímicos

El análisis bioquímico del plasma mostró que los ratones *Ppara*-null tuvieron un nivel de glucosa en plasma más bajo que los ratones WT (**Figura 12A**), por otro lado, se midieron los triglicéridos plasmáticos en ayuno, pero no se encontró diferencia significativa entre los grupos (datos no mostrados). En particular, el colesterol plasmático fue significativamente más alto en los ratones *Ppara*-null, principalmente en los grupos alimentados con 6 o 20% de PD (**Figura 12B**). No obstante, aunque la urea plasmática en el estado de alimentación aumentó a medida que aumentaba la cantidad de PD, los ratones *Ppara*-null tuvieron concentraciones plasmáticas de urea más altas que en los ratones WT (**Figura 12C**), lo que sugiere un aumento en el catabolismo de aminoácidos.

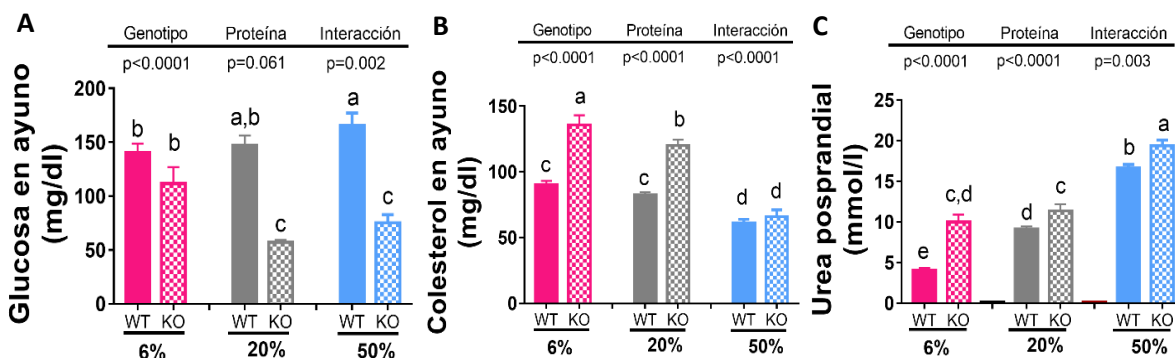


Figura 12: Parámetros metabólicos. A) Medición de glucosa en ayuno, B) Colesterol en ayuno y C) Urea postprandial. *Ppara*-null (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (WT), Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón.

Estos resultados mostraron que en los ratones que carecen de PPAR α funcional se altera significativamente el metabolismo de los aminoácidos, favoreciendo la degradación de proteínas, lo que atenuó el aumento de peso corporal y los cambios en la composición corporal en los ratones *Ppara*-null en comparación con los WT, efecto que se acentuó con el aumento de la proteína

6.7 Determinación del gasto energético y coeficiente respiratorio (RER)

El análisis de gasto energético obtenido por calorimetría indirecta mostró que, durante el estado de alimentación, el VO_2 aumentó tanto en ratones WT como en los *Ppara*-null, y que, a mayor cantidad de proteína en la dieta, mayor era el VO_2 (**Figura 13A-C**). Cuando los ratones consumieron una dieta que contenía 50% de PD, los ratones sin PPAR α tuvieron un menor gasto energético en comparación con los ratones de tipo silvestre (**Figura 13C**). El cociente de intercambio respiratorio (RER) de los ratones WT alimentados con un 6% de PD durante el período de alimentación fue de alrededor de 1.05, mientras que el RER de los ratones carentes de PPAR α fue de aproximadamente 0.94 (**Figura 13D**). El consumo de PD al 20% produjo un RER similar entre ambos tipos de ratones de aproximadamente 1 (**Figura 13E**). Interesantemente, el RER de los ratones WT alimentados con 50% de PD fue de 0.82, mientras que el RER de los ratones sin PPAR α fue de 0.93, lo que sugiere una mayor flexibilidad metabólica (**Figura 13F**). Estos resultados indican que el consumo de diferentes cantidades de proteína de la dieta impacta en la selección y utilización del combustible metabólico utilizado y que en la ausencia de PPAR α se reduce el gasto energético cuando hay un alto consumo de proteína, posiblemente como un mecanismo compensatorio para prevenir un mayor catabolismo de aminoácidos como fuente de energía.

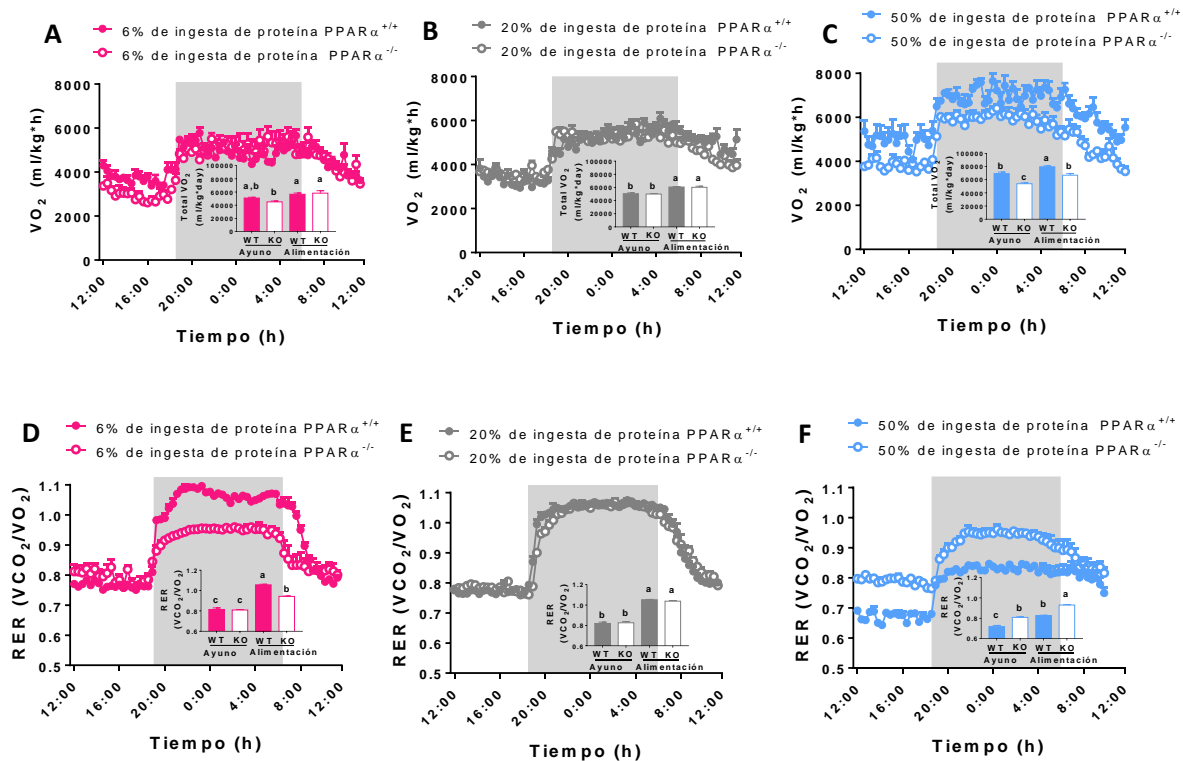


Figura 13: El genotipo de PPAR α y la cantidad de proteína de la dieta modifican diferencialmente el gasto energético y la tasa de intercambio respiratorio (RER). La calorimetría indirecta muestra el consumo de oxígeno (VO₂) y el VO₂ total durante el ayuno y la alimentación (a las 7:00 h los ratones se mantuvieron en ayuno y a las 19:00 h se alimentaron) (A, B, C). RER durante el ayuno y la alimentación de ratones WT y PPAR α - / - alimentados con diferentes concentraciones de proteínas en la dieta (D, E, F). *Ppar-null* (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón, WT). Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de LSD de Fisher (para A-F). Las comparaciones múltiples se resumen con una pantalla de letras compacta ($a > b > c$). $n = 6-7$.

En conjunto, estos resultados indican que el contenido de proteína de la dieta, la composición corporal y PPAR α modulan el gasto energético y la utilización de combustibles metabólicos. La ausencia de PPAR α reduce el gasto energético durante el

consumo elevado de proteínas, posiblemente como un mecanismo compensatorio para prevenir el catabolismo continuo de aminoácidos como fuente de energía.

6.8 Localización intracelular de HNF4 α y PPAR α y expresión de ECAs en el hígado de ratones WT y *Ppara*-null

Posteriormente se investigó la localización de HNF4 α y PPAR α en los hígados de ratones PPAR α WT alimentados con una dieta baja en proteínas (6%) y se comparó con aquellos alimentados con una dieta alta en proteínas (50%) para determinar si estos dos factores de transcripción colocalizaban. En los hígados de los ratones alimentados con un 6% de PD, se observó la coimmunoprecipitación de HNF4 α con PPAR α , lo que sugirió que había menos HNF4 α disponible para activar la transcripción de sus genes blanco (**Figura 14A**). Sin embargo, en los hígados de los ratones alimentados con 50% de PD, HNF4 α y PPAR α no colocalizaron, lo que sugiere que, en esta condición, HNF4 α pudo activar sus genes blancos (**Figura 14A**). Dado que se encontró que la inmunolocalización de HNF4 α dependía de la presencia de PPAR α , se evaluó si la expresión de las enzimas catabolizantes de aminoácidos inducida por HNF4 α se modificaba diferencialmente en los ratones WT y *Ppara*-null alimentados con concentraciones crecientes de proteína de la dieta. Primero se demostró que la abundancia hepática relativa de HNF4 α no cambió en los ratones WT alimentados con diferentes concentraciones de PD (**Figura 14B y C**). Sin embargo, los ratones *Ppara*-null exhibieron una mayor expresión de HNF4 α en el hígado, lo cual fue significativo para los grupos alimentados con 20% o 50% de PD (**Figura 14B y C**). Luego se determinó la cantidad de proteínas de varias enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos, incluida la enzima carbamoil fosfato sintetasa-1 (CPS-1) del ciclo de la urea y las enzimas catabolizantes de aminoácidos HAL y la SDS (**Figura 14B, D-F**). En los ratones WT, hubo una tendencia a que estas enzimas aumentaran su cantidad a medida que aumentaba la cantidad de proteína en la dieta (**Figura 14B, D, E y F**), mientras que en los ratones *Ppara*-null, la expresión de estas enzimas, particularmente HAL y SDS, fue significativamente mayor en los grupos alimentados al 20 y 50% con

respecto a los correspondientes controles WT (**Figura 14B, E y F**), lo que indica que la falta de PPAR α permitió al HNF4 α promover la transcripción de sus genes blanco.

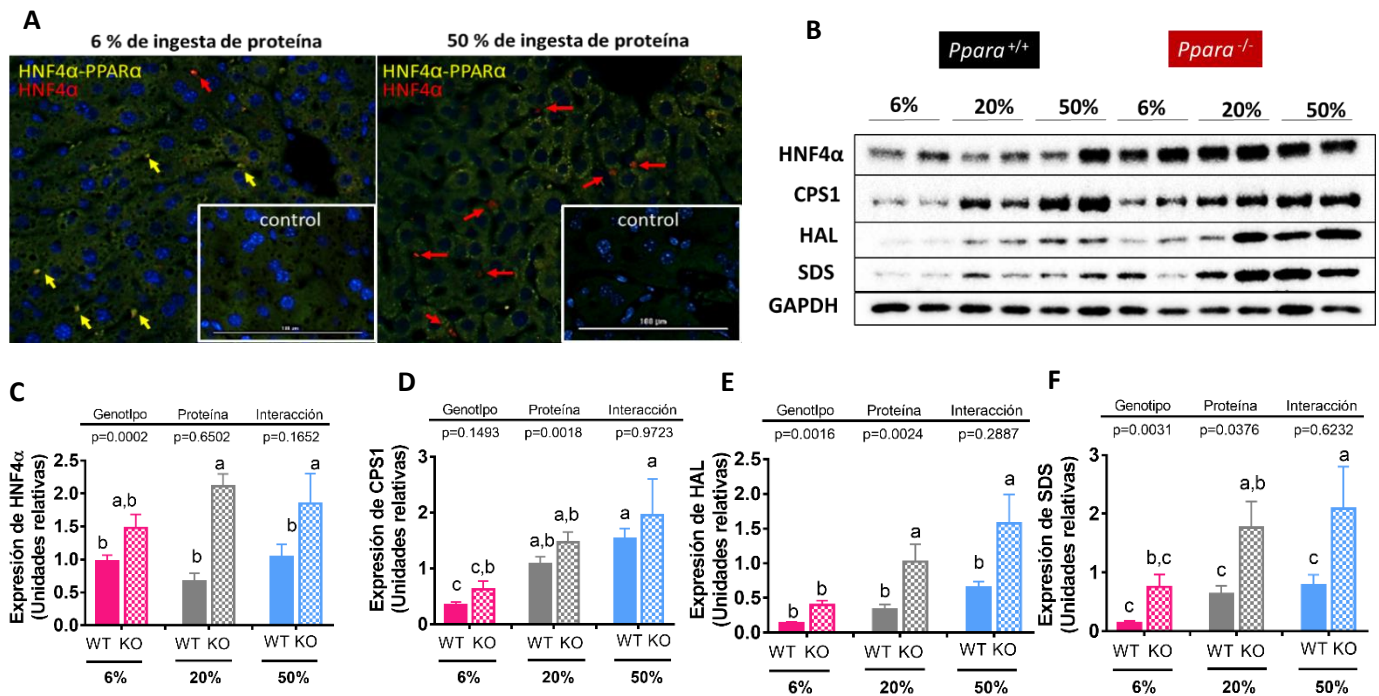


Figura 14: La localización intracelular de HNF4 α y PPAR α y la expresión de ECAs en el hígado de ratón dependen de la cantidad de proteína de la dieta y del genotipo PPAR α . (A) Coinmunolocalización de PPAR α y HNF4 α en los hígados de ratones WT alimentados con diferentes cantidades de PD. HNF4 α se tiñe de rojo y la inmunolocalización de PPAR α y HNF4 α se observa en amarillo. (B) Análisis de transferencia Western de HNF4 α , CPS1, HAL y SDS en los ratones WT y PPAR α - / -. GAPDH fue usado como control. Análisis densitométricos de la abundancia de proteínas de (C) HNF4 α , Factor hepático nuclear alfa; (D) CPS1, Carbamoil fosfato sintetasa 1; (E) HAL, Histidasa y (F) SDS, deshidratasa de serina. *Ppar-null* (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (WT), Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón; ECAs, Enzimas catabolizantes de aminoácidos; GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Los datos se presentan como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc LSD de Fisher (para C-F). Las comparaciones múltiples se resumen con letras minúsculas (a > b > c). n = 4.

6.9 Interacción entre HNF4 α y el promotor de la SDS.

Para demostrar que la unión de HNF4 α al promotor del gen de la SDS depende de la presencia de PPAR α , se realizaron ensayos de ChIP. La unión de HNF4 α al promotor del gen de la SDS se modificó *in vivo* en los ratones *Ppara*-null en comparación con los ratones WT. Los resultados demostraron claramente que HNF4 α se une *in vivo* al promotor del gen de la SDS. En los ratones WT, la unión de HNF4 α al promotor de la SDS aumentó entre un 6% y un 20% de PD; sin embargo, la alimentación con 50% de proteína en la dieta no aumentó más esta interacción (**Figura 15A y B**). Como se esperaba, la unión de HNF4 α al HRE en los ratones *Ppara*-null fue significativamente mayor que en los ratones WT, y este aumento en la unión se indujo con concentraciones crecientes de proteína de la dieta (**Figura 15A y B**). Esta evidencia sugirió que las condiciones que promueven un aumento en la cantidad total de HNF4 α resultaron en una mayor expresión de genes asociados con el metabolismo de los aminoácidos, una condición evidente tras el consumo de una dieta alta en proteínas o por la falta de represión por PPAR α , como se observó en los ratones *Ppara*-null.

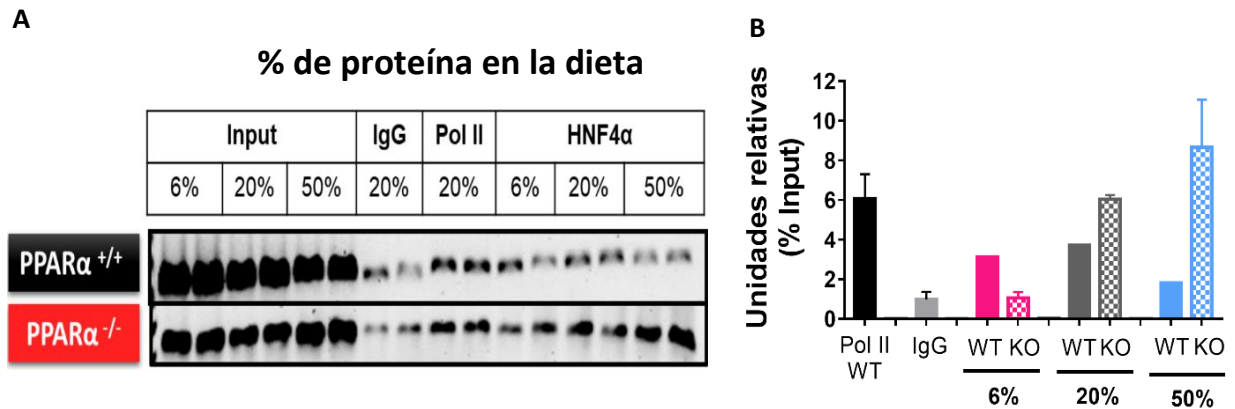


Figura 15: La ausencia de PPAR α aumentó la unión de HNF4 α al promotor del gen de la SDS *in vivo*. (A) Se preparó cromatina soluble a partir de hígados de ratones WT y *Ppara*^{-null} y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-HNF4 α . Las muestras de ADN inmunoprecipitadas y extraídas, así como el input se amplificaron usando un par de cebadores que cubrían los sitios de unión al gen de la SDS y usando IgG como control negativo y Pol II como control positivo. (B) Análisis de PCR en tiempo real de los productos amplificados correspondientes a la unión de HNF4 α a HRE-SDS (HRE, elemento de respuesta a HNF4 α - SDS, promotor de la deshidratasa de serina). *Ppar*^{-null} (KO), Receptor activado por proliferador del peroxisoma alfa; C57BL/6 (WT), Cepa silvestre C57BLACK6 de ratón; Pol II, RNA Polimerasa II; IgG inmunoglobulina G. Este gráfico es representativo de tres experimentos independientes (n = 3 ratas por grupo). Los datos se

7. DISCUSION

Los resultados del presente estudio demostraron que PPAR α disminuye la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos, promoviendo la degradación proteasomal de HNF4 α , pero sólo en presencia de RXR α . Este mecanismo indica que, en condiciones de ayuno, PPAR α favorece una reducción en la utilización de aminoácidos como fuentes de energía, permitiendo la activación de la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos para sostener las necesidades energéticas del organismo. Por otro lado, la ausencia de PPAR α resulta en un aumento del catabolismo de aminoácidos, y el consumo de una dieta alta en proteínas promueve la rápida regulación positiva de la cantidad total de HNF4 α , que es un mecanismo para eliminar el exceso de aminoácidos de la dieta.

El factor de transcripción PPAR α es un regulador clave durante la transición de los combustibles energéticos entre el estado de alimentación y el de ayuno que favorece el catabolismo de los ácidos grasos (Burri, 2010) como combustible energético y evita la utilización de los aminoácidos. Así, la ausencia o inactivación del factor de transcripción PPAR α representa un tratamiento farmacológico posible para el manejo de las fuentes de energía, que potencialmente cambia el peso corporal, la composición corporal y los niveles de metabolitos circulantes, tomando en consideración el costo-beneficio de las consecuencias de la represión de la expresión de este gen.

En el presente estudio, se observó que los ratones *Ppara-null* presentaban una reducción significativa en la ganancia de peso corporal tras consumir una dieta normal (20%) o alta (50%) en proteínas; sin embargo, la masa de grasa corporal en estos ratones estaba significativamente aumentada, probablemente debido a la reducción en la expresión de genes de oxidación de ácidos grasos. Estos resultados sugieren que los ratones *Ppara-null* acumulan grasa corporal, pero, al mismo tiempo, presentan una reducción de la masa corporal magra asociada a un aumento del catabolismo de aminoácidos. Como se reportó previamente, los ratones *Ppara-null* tenían niveles de glucosa en plasma más bajos que los ratones WT (Kopple, 1978) y este resultado se

asoció con la falta de oxidación de ácidos grasos libres en ausencia de PPAR α y la reducción de la gluconeogénesis, ya que PPAR α regula positivamente algunas enzimas gluconeogénicas, como la G6Pasa (Kwon, 2021). Los ratones *Ppara-null* también mostraron niveles más altos de colesterol plasmático, posiblemente porque PPAR α está involucrado en la regulación del metabolismo del colesterol, particularmente en la síntesis de ácidos biliares (Grygiel, 2014).

El gasto energético es el resultado de variables como el genotipo, la composición corporal, la composición de la dieta, el estado de alimentación y el ambiente de alojamiento (Contreras, Torres, & Tovar, 2013). En un hallazgo interesante, los ratones WT consumieron mayores niveles de oxígeno con mayores cantidades de ingesta de proteínas en la dieta. Sin embargo, este aumento en el consumo de oxígeno era dependiente de PPAR α , ya que los ratones *Ppara-null* tenían un menor consumo de oxígeno con una mayor ingesta de proteínas, lo que sugiere que la reducción de la capacidad de oxidar los ácidos grasos puede modificar el gasto energético, como indica el RER. El análisis de la RER también mostró que los ratones *Ppara-null* alimentados con una dieta baja (6%) o alta (50%) en proteínas mostraban un aumento de la oxidación de aminoácidos, tal como se confirmó con las mediciones de urea postprandiales (Figura 12C).

Se ha reportado que la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos está regulada en los ratones *Ppara-null*, en comparación con los controles WT (Kersten, y otros, 2001). Los resultados mostraron que, efectivamente, los ratones *Ppara-null* presentan un aumento en la expresión de algunos genes implicados en el catabolismo de aminoácidos, incluyendo los genes de CPS-1, HAL y SDS, en el hígado, de acuerdo con estudios anteriores (Kersten, y otros, 2001) (Contreras, y otros, 2015). El aumento de la cantidad de proteína en la dieta también condujo a una regulación positiva de los niveles hepáticos de proteína de las enzimas catabolizantes de aminoácidos en los ratones WT, lo que indica que el exceso de aminoácidos consumidos se degrada rápidamente, como demuestra el aumento de los niveles de urea circulante. Este efecto fue mayor en los ratones *Ppara-null*, en comparación con los ratones WT, como indica un mayor aumento de la urea postprandial incluso con el consumo de una

dieta baja en proteínas (6%) o normal (20%). Interesantemente, también se observó que la cantidad de la proteína total HNF4 α estaba significativamente aumentada en los hígados de los ratones *Ppara*-null, apoyando la idea de que la expresión o estabilidad de HNF4 α puede ser controlada por PPAR α .

En el presente estudio, se encontró que el promotor del gen de la SDS, una enzima típica del metabolismo hepático de aminoácidos, posee un HRE que tiene la capacidad de aumentar la actividad de la luciferasa en presencia de HNF4 α . Pruebas anteriores demostraron que la mayoría de las enzimas catabolizantes de aminoácidos contienen un HRE en los promotores de sus genes, lo que sugiere que este factor de transcripción es capaz de activar la expresión de estos genes (Nitsch, Boshart, & Schutz, 1993) (Velázquez, y otros, 2016) (Kamiya, Inoue, Kodama, & Gonzalez, 2004) (Mariko, Kim, Inoue, Kimura, & Gonzalez, 2006). Es interesante que, en el caso del promotor del gen de la SDS, el silenciamiento de HNF4 α produjo una represión de la actividad de la luciferasa, confirmando que HNF4 α promueve la transcripción de los genes de las enzimas catabolizantes de aminoácidos (Figura 9). Dado que los promotores de los genes de las enzimas catabolizantes de aminoácidos no se unen a PPAR α , se exploró el mecanismo por el cual PPAR α fue capaz de regular negativamente la expresión de los genes de las enzimas catabolizantes de aminoácidos y cómo este efecto se asoció con HNF4 α . Se encontró que la interacción entre PPAR α y HNF4 α requiere RXR α . PPAR α , al igual que otros miembros de la familia PPAR, forma heterodímeros con RxR (α , β , γ) y se une a un elemento de consenso cis, PPRE, en los promotores de los genes blanco (Han, Shen, Bittner, Kraemer, & Azhar, 2017). La interacción entre PPAR α y HNF4 α se ha estudiado previamente en el contexto del metabolismo de los lípidos (Jing, 2003). De hecho, las primeras pruebas demostraron que ambos factores de transcripción pueden corregular la expresión de la acil-CoA tioesterasa I. Otros estudios también establecieron que el HNF4 α es un regulador *in vivo* del metabolismo lipídico que modula la expresión de ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoB, ApoC-II, ApoC-III, ApoE (Yuan, Kardassis, & Kritis, 2001) (Marrapodi & Chiang, 2016) (Mogilenko, 2009) (Hertz, Bishara, & Bar, 1995) (Raspé, y otros, 2002)), la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos y la colesterol 7 α -hidroxilasa, entre otras (Jiang, y otros, 2003); (Laudet

& Gronemeye, 2002); (Grygiel, 2014)). Sin embargo, no se había descrito la interacción entre estos dos factores de transcripción en el contexto del metabolismo de los aminoácidos.

En este trabajo se demostró que la activación de PPAR α favorece su heterodimerización con RXR α para permitir su interacción con HNF4 α e inhibir la transcripción de las enzimas catabolizantes de aminoácidos. Interesantemente, se encontró que la cantidad total de HNF4 α disminuía cuando además de PPAR α las células se sobreexpresaban también con RXR α , sugiriendo que la presencia de estos dos receptores nucleares puede promover la degradación de HNF4 α . En consonancia con este hecho, se ha sugerido previamente pero no se había demostrado, que HNF4 α podía ser degradado a través de la vía del proteasoma [Kamiya, 2004]]. Además, la fosforilación de HNF4 α vía PKC puede inducir su degradación vía el proteasoma, en las células HepG2 [Nitsch, 1993]]. En este trabajo, se demostró que después de 12 h de incubación con cicloheximida, las células que co-expresan HNF4 α , PPAR α y RXR α mostraron una rápida disminución de la abundancia de la proteína HNF4 α en comparación con las células cotransfectadas sólo con HNF4 α y PPAR α , lo que indica que la desestabilización de la proteína HNF4 α está mediada por un mecanismo desconocido que requiere RXR α . Este efecto se esclareció posteriormente mediante el uso de un inhibidor del proteasoma, MG-132, que demostró que la cantidad total de HNF4 α disminuía modestamente con la coexpresión de HNF4 α /PPAR α /RXR α , sugiriendo que en presencia de los tres receptores nucleares, HNF4 α se libera y se somete a la degradación del proteasoma. De hecho, el análisis funcional del promotor del gen de la SDS, utilizando un vector reportero de luciferasa, mostró que sólo la co-expresión de HNF4 α , PPAR α y RXR α redujo la actividad del promotor del gen de la SDS.

Este mecanismo que incrementa la degradación de HNF4 α por parte de PPAR α y RXR α , sugiere que tras la activación de PPAR α y su heterodimerización, disminuye la unión de HNF4 α al promotor de las enzimas catabolizantes de aminoácidos. Estos resultados corroboran esta hipótesis, ya que el ensayo de ChIP en las células hepáticas de los ratones *Ppara*-null, mostró un aumento de la unión de HNF4 α al promotor del gen de la SDS en comparación con la observada en las células de los ratones WT.

No se puede asumir que los efectos observados en nuestros estudios *in vivo* sean exclusivamente causados por HNF4 α debido a la falta de un modelo de ratón con una pérdida de la función de HNF4 α ; sin embargo, este trabajo confirmó que PPAR α interactúa con HNF4 α . Además, el análisis de expresión mostró que los ratones *Ppara-null* perdieron la regulación preventiva de los genes del catabolismo de aminoácidos, incluso después del consumo de una dieta baja en proteínas, en paralelo con la regulación positiva de la proteína HNF4 α , lo que sugiere que PPAR α está involucrado en este mecanismo de regulación, que fue confirmado posteriormente por nuestros estudios mecanísticos (Figura 16).

En conjunto, este trabajo describe un mecanismo novedoso por el que PPAR α actúa como un interruptor negativo para atenuar el catabolismo de aminoácidos y aumentar la oxidación de ácidos grasos para proteger al organismo y evitar el catabolismo de aminoácidos, favoreciendo la conservación de las proteínas y por tanto manteniendo sus funciones específicas.

9. CONCLUSIONES

- Se encontró que el promotor de la SDS es regulado positivamente por HNF4 α y que PPAR α interacciona a nivel de proteína-proteína con HNF4 α a través de su heterodímero RxR α . Esta interacción favorece la degradación de HNF4 α vía el proteasoma.
- Se observó que PPAR α en presencia de su ligando sintético wy14643 o en presencia de RXR α provoca que no se active de la misma manera el promotor de la deshidratasa de serina.
- Se demostró que la unión de HNF4 α al promotor de la deshidratasa de serina incrementa con la cantidad creciente de PD en los ratones WT, pero esta unión se evidencia aún más en los ratones PPAR α con 50% de proteína. De manera similar se observó un incremento en la expresión de algunas enzimas que intervienen en la degradación de aminoácidos o ciclo de la urea conforme aumento la cantidad de PD, como es el caso de HAL, SDS y CPS1.

Por lo tanto, se concluye que PPAR α favorece la degradación proteosomal de HNF4 α mediante la interacción con su heterodímero RXR α y de esta manera reprime la expresión de las ECAs. Por otro lado, una dieta alta en proteínas o cuando PPAR α no se encuentra funcional induce a un incremento en la expresión de las ECAs.

10. RESUMEN GRÁFICO

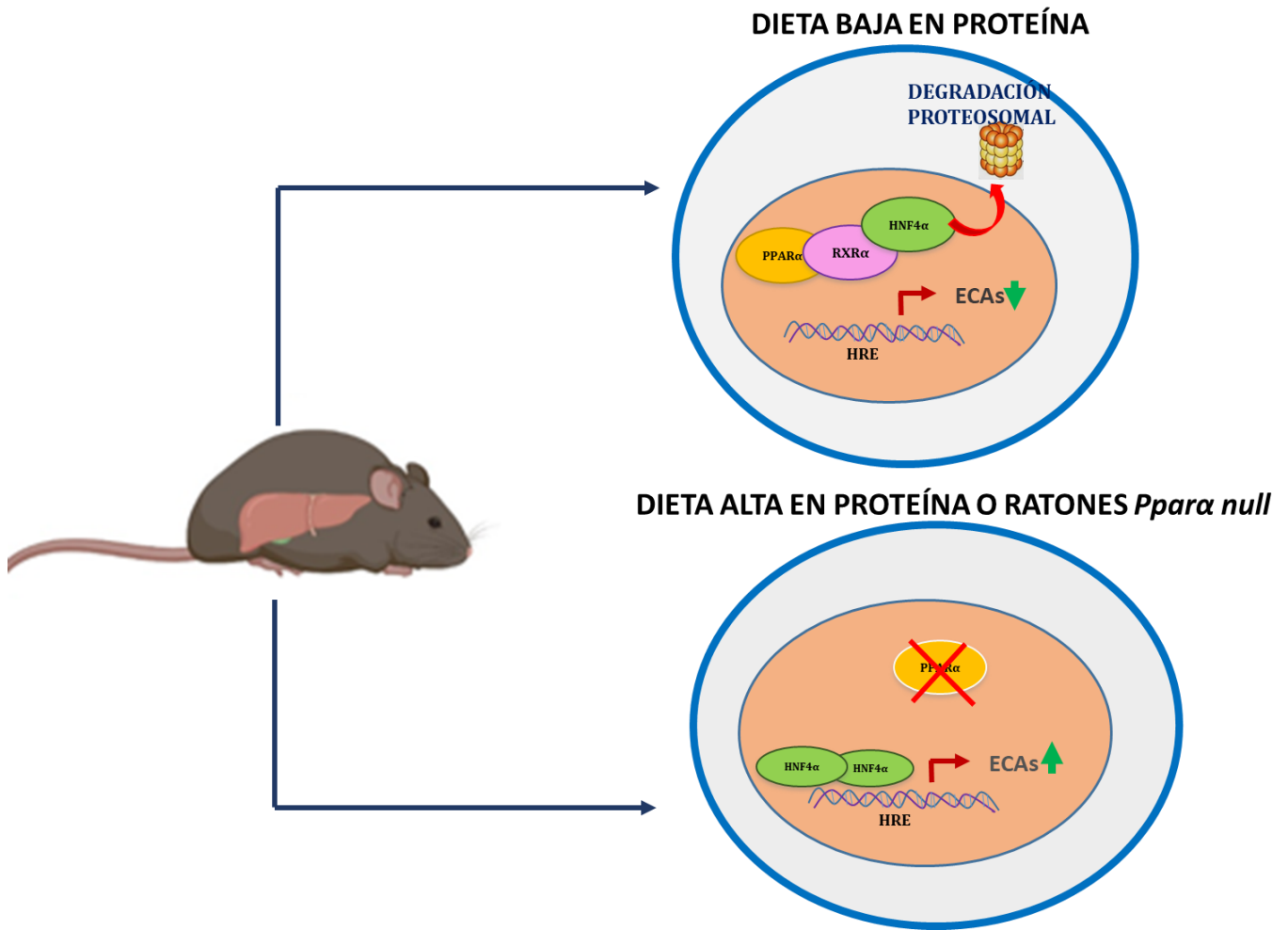


Figura 16. Regulación del catabolismo de aminoácidos en el hígado por la interacción de PPAR α Y HNF4 α . PPAR α favorece la degradación proteosomal de HNF4 α mediante la interacción con su heterodímero RXR α , de esta manera reprime la expresión de las ECAs. Por otro lado, una dieta alta en proteínas o cuando PPAR α no se encuentra funcional se ve incrementada la expresión de las ECAs.

11. PERSPECTIVAS

El conocimiento sobre la interacción entre PPAR α y HNF4 α a través de RXR α , heterodímero de PPAR α , puede generar nuevas estrategias para apoyar a los individuos en condiciones de catabolismo acelerado de los aminoácidos, que suele ser evidente en algunos trastornos metabólicos, plantea nuevos objetivos para el esclarecimiento de esta regulación, los cuales se enumeran a continuación:

- Ver el efecto de ligandos naturales de PPAR α sobre el catabolismo de los aminoácidos.
- ChIP seq del promotor de las ECAs.
- Dilucidar la formación del complejo transcripcional en el promotor de las ECAs.
- Potenciales co-activadores o co-represores en la regulación del catabolismo de aminoácidos
- Cuál es la región estructural de HNF4 α y RxR α involucrados en su interacción.

12. REFERENCIAS

- Albero, Sanz, & Playán. (2004). Metabolismo en el ayuno. *Endocrinología y Nutrición*, 51(4), 139-48.
- Aleman, Alemán, G., Ortiz, V., Contreras, A., Quiroz, G., Ordaz, G., . . . Tovar, A. (2013). Hepatic Amino Acid-Degrading Enzyme Expression Is Downregulated by Natural and Synthetic Ligands of PPAR α in Rats. *The Journal of Nutrition*, 143, 1211-1218.
- Alemán, G., Ortíz, V., Langley, E., Tovar, A., & Torres, N. (2005). Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 172-179.
- Angel, G. (2005). *Bases Fisiológicas y Bioquímica de la Nutrición* (Segunda Edición ed.). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Berger , J., & Moller, D. (2002). The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53, 409-435.
- Brosnan, J., Ewart, H., & Squires, S. (1995). Hormonal control of hepatic glutaminase. *Advanced in Enzyme Regulation*, 131-146.
- Burri, L. (2010). PPARs and Xenobiotic-Induced Adverse Effects: Relevance to Human Health. *PPAR Research*, 1-11.
- Cahill, J. (1970). Starvation in man. *The New England Journal of Medicine*, 668-675.
- Chakravarthy, Chakravarthy, M., Lodh , I., Yin, L., Malapaka, R., Xu, H., . . . Semenkovich, C. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR α in liver. *Cell*, 138, 476-88.
- Christowitz, D., Mattheyse, F., & Balinsky, J. (1981). Dietary and hormonal regulation of urea cycle enzymes in rat liver. *Enzyme*, 113-121.
- Chung , M., Vincent , N., Jhala , U., & Watford, M. (1997). Rat hepatic glutaminase: identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *Biochemical Journal*, 193-200.
- Contreras , A., Torres, N., & Tovar, A. (2013). PPAR- α as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. *Advances in Nutrition*, 4(4), 439-452.

- Contreras, A., Rangel, C., Torres, N., Aleman, G., Ortiz, V., Noriega, L., . . . Tovar, A. (2015). PPAR alpha via HNF4 alpha regulates the expression of genes encoding hepatic amino acid catabolizing enzymes to maintain metabolic homeostasis. *Genes & Nutrition, 10*(2), 452.
- Danesch, U., Hashimo, S., Renkawitz, R., & Shutz, G. (1983). Transcriptional Regulation of the Tryptophan Oxygenase Gene in Rat. *The Journal of Biological Chemistry, 4750-4753*.
- Devlin. (2004). *Bioquimica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverte.
- Dreyer, Krey, & Keller. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell, 68*(, Givel F. Helftenbein G, Wahli W.), 879–87.
- Ekhard , E., & Ziegler, L. J. (1997). *Conocimientos actuales sobre nutrición* (Septima edición ed.). Washinton D. C.: International Life Science Institute.
- Fang, B., Mane-Prados, D., Bolotin, E., Jiang, T., & Sladek, F. M. (2012). Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Research, 40*(12), 5343-5356.
- Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews, 20*(5), 689-725.
- Grygiel, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications –a review. *Nutrition Journal, 1-17*.
- Haas , M., & Pitot, H. (1994). Glucocorticoids stimulate CREB binding to a cyclic-AMP response element in the rat serine dehydratase gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 317-324*.
- Han, L., Shen, W., Bittner , S., Kraemer , F., & Azhar , S. (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Futuro Cardiology, 259–278*.
- Harper, A., Miller, R., & Block, K. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annual Review of Nutrition , 409-454*.
- Hertz, R., Bishara, J., & Bar, J. (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Supression of apolipoprotein C-III. *The Journal of Biological Chemistry, 13470-13475*.

- Hwang, J., & Curthoys, N. (1991). Effect of acute alterations in acid-base balance on rat renal glutaminase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Journal of Biochemistry*, 9392-9396.
- Inoue, Y., Hayhurst, G., Inoue, J., Mori, M., & Gonzalez, F. (2002). Defective Ureagenesis in Mice Carrying a Liver-specific Disruption. *The Journal of Biological Chemistry*, 25257-25265.
- Jia. (2012). The natural carotenoid astaxanthin, a PPAR-alpha agonist and PPAR-gamma antagonist, reduces hepatic lipid accumulation by rewiring the transcriptome in lipid-loaded hepatocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 878-88.
- Jiang, G., Nepomuceno, L., Hopkins, K., & Sladek, F. (1995). Exclusive Homodimerization of the Orphan Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 Defines a New Subclass of Nuclear Receptors. *Molecular and cellular Biology*, 5131-5143.
- Jiang, S., Tanaka, T., Iwanar, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., . . . Naito, M. (2003). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nuclear Receptor*, 1-12.
- Kamiya, A., Inoue, Y., Kodama, T., & Gonzalez, F. J. (2004). Hepatocyte nuclear factors 1 α and 4 α expression of proline oxidase liver. *FEBS Letters*, 578, 63-68.
- Kanamoto, R., Su, Y., & Pitot, H. (1991). Hormonal regulation of serine dehydratase gene expression in liver and kidney of the adrenalectomized rat. *Molecular Endocrinology*, 1661-1668.
- Kanamoto, R., Su, Y., & Pitot, H. (1991). Effects of glucose, insulin, and cAMP on transcription of the serine dehydratase gene in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 562-566.
- Kersten, S., Mandard, S., Escher, P., Gonzalez, F., Tafuri, S., Desvergne, B., & Wahl, W. (2001). The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15, 1971-1978.
- Kopple, J. (1978). Abnormal amino acid and protein metabolism in uremia. *Kidney International*, 340-348.
- Kwon, S. (28 de 08 de 2021). *PPAR- α increases gluconeogenesis via glucose 6-phosphatase gene expression in fasting liver*. Obtenido de Department of Medical

Science:

<https://ir.ymlib.yonsei.ac.kr/bitstream/22282913/123894/1/T010085.pdf>

- Laudet, V., & Gronemeye, H. (2002). HNF4. *The Nuclear Receptor FactsBook*, 8, 238-247.
- Lozano, A. B. (2011). *Bioquímica: metabolismo energético, conceptos y aplicación*. Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Mariko, S., Kim, I., Inoue, Y., Kimura, S., & Gonzalez, F. J. (2006). Regulation of Mouse Hepatic Amino-Carboxymuconate-Semialdehyde Decarboxylase, a Key Enzyme in the Tryptophan-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Pathway, by Hepatocyte Nuclear Factor 4 and Peroxisome Proliferator Activated Receptor. *Molecular Pharmacology*, 70, 1281-1290.
- Marrapodi, M., & Chiang, J. (2016). Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and agonist inhibit cholesterol 7 α hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *Journal of Lipid Research*, 514-520.
- Mogilenko, D. (2009). Role of the nuclear receptors HNF4 α , PPAR α , and LXRs in the TNF α -mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry*, 11950-11960.
- Nebes, V., & Morris, S. (1988). Regulation of messenger ribonucleic acid levels for five urea cycle enzymes in cultured rat hepatocytes. Requirements for cyclic adenosine monophosphate, glucocorticoids, and ongoing protein synthesis. *Molecular Endocrinology*, 444-451.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principios de Bioquímica*. USA: Palgrave Macmillan.
- Nitsch, D., Boshart, M., & Schutz, G. (1993). Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5479-5483.
- Ogawa, H., Miller, D., Dun, T., Su, Y., Burcham, J., Peraino, C., . . . Pitot, H. (1988). Isolation and nucleotide sequence of the cDNA for rat liver serine dehydratase mRNA and structures of the 5' and 3' flanking. *Biochemistry*, 5809-5813.
- Osada, S., Tsukamoto, T., Takiguchi, M., Mori, M., & Osumi, T. (1997). Identification of an extended half-site motif required for the function of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Genes to Cells*, 2, 315-27.

- Raspé, E., Duez, H., Mansén, A., Fontaine, C., Fiévet, C., Fruchart, J., . . . Staels, B. (2002). *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2172-2179.
- Sher, Sher, T., Yi, H., McBride, O., & Gonzalez, F. (1993). CDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, 32(21):5598-5604.
- Sladek, F. (1994). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), in Liver. *Gene expression*, 207-230.
- Sladek, F. (2002). Desperately Seeking...Something. *Molecular Cell*, 219-221.
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., & Darnell, J. E. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes & Development*, 4(12B), 2353-2365.
- Su, R., Kanamoto, D., Miller, D., Ogawa, H., & Pitot, H. (1990). Regulation of the expression of the serine dehydratase gene in the kidney and liver of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 892-899.
- Torres, N., Martínez, L., Alemán, G., Bourges, H., & Tovar, P. (1998). Histidase Expression Is Regulated by Dietary Protein at the Pretranslational. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*, 818-824.
- Velázquez, L., Charabati, T., Contreras, A., Alemán, G., Torres, N., & Tovar, A. (2016). PPAR α Downregulates Hepatic Glutaminase Expression in Mice Fed Diets with Different Protein:Carbohydrate Ratios. *The Journal of Nutrition*, 1634-1640.
- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., & Reddy, J. (2010). Coactivators in PPAR-regulated gene expression. *PPAR Research*, 2010:250126.
- Viswakarma. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Research*, 2010, 1-29.
- Walters, M., & Wallace, K. (2010). Urea cycle gene expression is suppressed by PFOA treatment in rats. *Toxicology Letters*, 46-50.
- Watford, M., Nadine, V., Zhan, Z., & Pannelli, J. (1993). Transcriptional Control of Rat Hepatic Glutaminase Expression by Dietary Protein Level and Starvation. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*, 493-499.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 1-17.

- Yuan, H., Kardassis, D., & Kritis, A. (2001). Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Frontiers in Bioscience*, 456-504.
- Yuan, Yuan, X., Chi Ta , T., Lin, M., Evans, J., Dong, Y., . . . Sladek, F. (2009). Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One*, 4(5), 1-11.