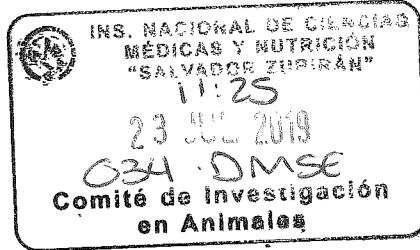




INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Ciudad de México, a 23 de julio de 2019.

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL
Presente.

Estimado Dr. Barrios:

Por medio de la presente anexo formato de cierre, informe final y del proyecto intitulado "Efecto del ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la histidasa (HAL) y la serina deshidratasa (SDH) en ratones PPAR alpha (-/-)" con numero de CINVA FNU-50-11-13-1, SEGUNDA FASE. Por lo que damos por terminado el cierre del protocolo.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente

Dra. Nimbe Torres y Torres
Investigadora en Ciencias Médicas F
Departamento de Fisiología de la Nutrición



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



2019

AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

Ciudad de México., a 23 de Julio del 2019

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Efecto del ayuno y de la concentración de proteínas dietaria en la regulación génica de la H₂Al y SDH en ratones PPAR α (-/-)" con registro CINVA: FNU-50-11-13-1 debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra Norma Bobadilla Sandoval

Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA CANTIDAD Y TIPO DE ÁCIDOS GRASOS SOBRE LA OXIDACIÓN
DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS GRASOS EN RATONES KNOCK-OUT DEL
RECEPTOR PPAR-ALFA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

• Maestra en Ciencias

PRESENTA:

CE

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

**Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador
Zubirán**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México, agosto 2016

Resultados

En estudios previos se ha demostrado que el PPAR α puede regular la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos y recientemente se ha reportado como un posible regulador de la homeostasis proteica ya que puede regular la expresión de genes involucrados en la degradación de aminoácidos. Por otra parte, se sabe que los ligandos de PPAR α son ácidos grasos o sus derivados y que los aceites vegetales son una fuente natural de ácidos grasos para el organismo. Por ello en este estudio se determinó la influencia del tipo y la cantidad de ácidos grasos de tres diferentes aceites en el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos.

Para trabajar con el modelo KO PPAR α se verificó el genotipo de todos los ratones incluidos en el estudio, obtenidos de las retrocruzás. La genotipificación se realizó utilizando DNA genómico extraído de la cola de los ratones y digerida con 120 μ l de NaOH 100mM durante 1 hora a 95°C. Posteriormente se añadió 12 μ l de Tris-HCl 1M para neutralizar la solución básica y se utilizan 10 μ l para la reacción de PCR.

Secuencias de los oligos utilizados:

Oligo sentido 5'-3': GAGAAGTTGCAGGAGGGGATTGTG

Oligo antisentido 5'-3': CCCATTTCCGGTAGCAGGTAGTCTT

Oligo NEO 5'-3': GCAATCCATCTTGTTCAATGGC

El oligo NEO reconoce el segmento de DNA que se insertó en la transfección de las células durante la generación de los ratones KO PPAR α y produce un amplicón de aproximadamente 650 pb (Figura 2).

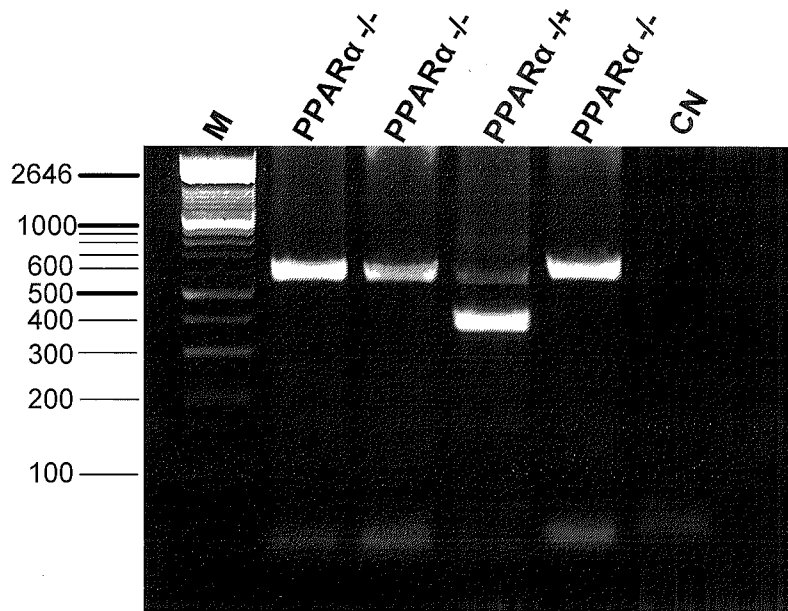


Figura 2. Genotipificación por PCR del gen PPAR α en ratones PPAR α ^{-/-} y PPAR α ^{+/-}. A partir de un fragmento de cola de los ratones (aproximadamente 0.5 cm) se extrajo el DNA genómico y se realizó la genotipificación por PCR utilizando los oligos sentido, antisentido (alelo WT~400 pb) y NEO (alelo KO PPAR α ~650 pb).

Los ratones WT y KO PPAR α se alimentaron con una de las seis diferentes dietas preparadas con aceite de soya, de coco u oleico a una de las dos concentraciones 7% o 21%. Debido a que en el postprándio se lleva a cabo la digestión de los alimentos y en particular la absorción de los ácidos grasos dietarios, se determinó evaluar este estado metabólico para las determinaciones bioquímicas en este trabajo.

Para establecer el tiempo de postprandio óptimo se realizó una curva temporal de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL en ratones WT. Se observó que a la hora después de iniciar el periodo postprandial no decaen los niveles de glucosa, colesterol, HDL y LDL. Además fue el tiempo en el que se alcanzó el pico más alto en el nivel de triglicéridos (Figura 3).

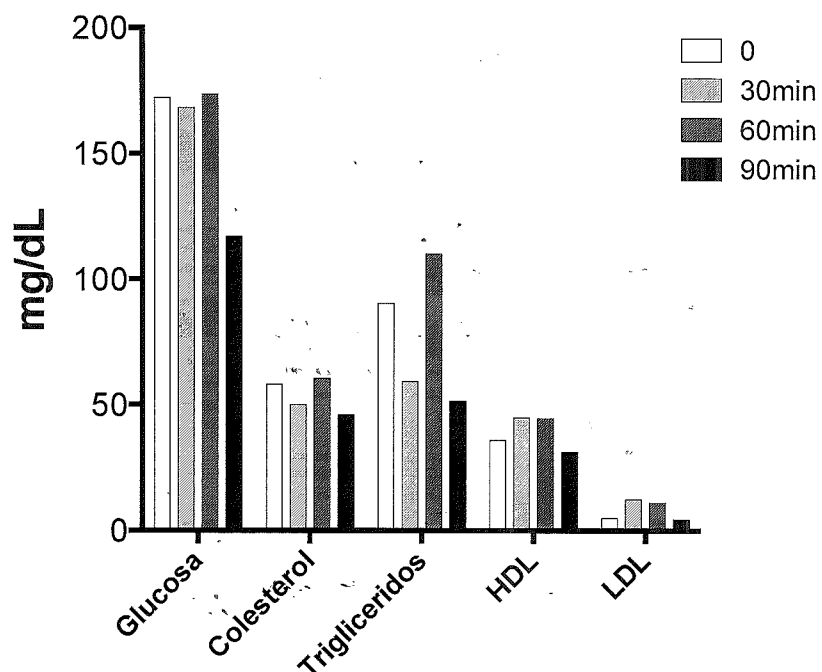


Figura 3. Efecto del postprandio sobre las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL. A partir del suero de ratones C57BL6 se midió la glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL al minuto 0, 30, 60 y 90 después de iniciado el postprandio.

Considerando estos resultados se determinó usar una hora de postprandio y para sincronizar su consumo de alimento y evitar variabilidad hormonal y metabólica, los ratones se alimentaron en un esquema de horario restringido de 9 horas de período postprandial (de 8 am a 5 pm). Además, con el propósito de evaluar el efecto a largo plazo en el fenotipo metabólico de los ratones WT y KO PPAR α alimentados con aceite de soya, de coco u oleico a una de las dos concentraciones 7% o 21%, el período de alimentación tuvo una duración de tres meses (Figura 4).

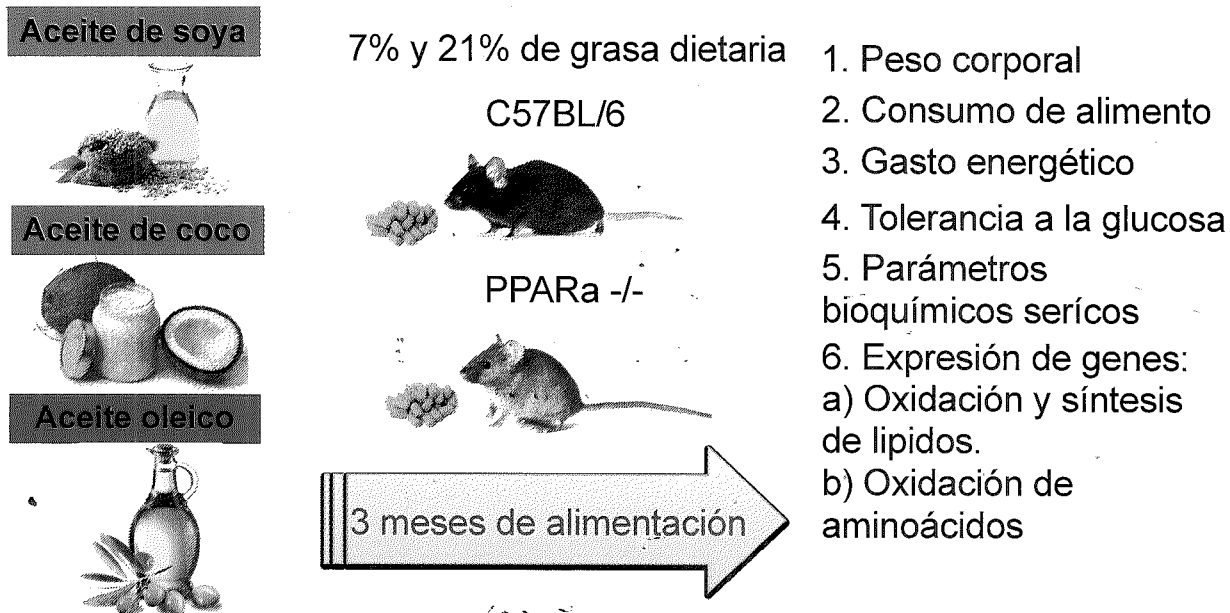


Figura 4. Diseño del estudio para evaluar el efecto de la cantidad y tipo de ácido graso mediado por el PPAR α en el metabolismo de lípidos y oxidación de aminoácidos en hígado. Los ratones WT y KO PPAR α se alimentaron con dietas con dos diferentes concentraciones de grasa dietaria 7% y 21% durante tres meses en un horario restringido con un periodo postprandial de 9 horas.

Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios

Para evaluar el efecto del tipo de aceite dietario en la expresión de genes participantes en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y en la degradación de aminoácidos, la composición de ácidos grasos de los aceites utilizados fue analizada. Se utilizó al aceite de soya, de coco y oleico como fuentes de grasa debido a que estos aceites tienen diferente composición de ácidos grasos. Nuestros análisis validaron que el aceite de soya es rico en ácidos grasos poliinsaturados (AGP), el oleico en ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y el de coco en ácidos grasos saturados (AGS). En particular el aceite de soya es rico en ácido linoleico ($\omega 6$) (~63%), el aceite oleico en ácido oleico (~71%) y el aceite de coco en ácido láurico (~58%). Mientras que la proporción AGS/AGM+AGP es mínima para el aceite de soya y oleico (0.2 y 0.03, respectivamente), la del aceite de coco es muy alta con un valor de 7.0 (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de ácidos grasos en los aceites dietarios.

Ácido graso (% de la cantidad total)		Aceite de soya	Aceite oleico	Aceite de coco
AGS				
Esteárico	C18:0	3.08	2.26	5.56
Palmítico	C16:0	12.38	-	-
Mirístico	C14:0	0.25	0.64	23.84
Laúrico	C12:0	0.78	-	58.09
Suma		16.49	2.90	87.49
AGM				
Oleico	C18:1	13.59	71.06	10.33
Palmitoleico	C16:1	-	3.83	-
Suma		13.59	74.89	10.33
AGP				
Araquidónico	C20:4	-	0.47	-
α -Linolenico	C18:3 (ω 3)	7.29	1.85	-
Linoleico	C18:2 (ω 6)	62.63	19.79	2.18
EPA	C20:5	-	-	-
DHA	C22:6	-	0.10	-
Suma		69.92	22.21	2.18
AGS/AGM+AGP		0.20	0.03	6.99
ω6/ω3		8.59	10.70	2.18

AGS, ácidos grasos saturados; AMS, ácidos grasos monosaturados; AGP, ácidos grasos poli-insaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosaheptaenoico

Peso y composición corporal

El peso y el consumo de alimento se registró cada dos días. Al término del estudio, los ratones KO PPAR α presentaron una tendencia a ganar menos peso corporal en comparación con los ratones WT. Entre el grupo de ratones WT y KO PPAR α los ratones alimentados con aceite de soya (AS) al 21% ganaron más peso corporal con una ganancia promedio de 10g y 9g, lo que representa el 50% y 39% de ganancia en peso, respectivamente. Por otra parte, los ratones KO PPAR α alimentados con aceite oleico (AO) al 21% fueron los que significativamente ganaron menor peso con sólo 3g, un 12% de ganancia con respecto a su peso inicial. La presencia o ausencia de PPAR α (Genotipo) y el tipo de ácido graso en cada una de las concentraciones (Dieta) tuvieron un efecto significativo sobre el peso de los ratones, ($p=0.0014$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta (Genotipo X Dieta) fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son

consistentes en la presencia o ausencia del PPAR α ($p < 0.0001$) (Figura 5 A-D). Sin embargo, el alimento consumido (kcal/ratón/día) fue similar entre los grupos dietarios, así como entre los ratones WT y KO PPAR α (Figura 5 E). El contenido calórico de las dietas con 21% de grasa se ajustó de manera isocalórica con un porcentaje determinado de carbohidratos (Tabla 2), por lo que la dieta con 21% de grasa fue una dieta con menor proporción de carbohidratos.

Adicionalmente, los ratones KO PPAR α presentaron una ligera tendencia a tener menor cantidad (% del peso corporal) de tejido adiposo blanco epididimal y retroperirenal comparado con los grupos WT. En particular el peso relativo de estos tejidos fue significativamente mayor en el grupo WT alimentado con AS 21% comparado tanto con ratones WT como con ratones KO PPAR α . Los efectos del genotipo y la dieta sobre el peso del tejido epididimal y retroperirenal fueron significativos ($p=0.0003$ y $p < 0.0001$, para el tejido epididimal; y $p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, para el tejido retroperirenal) (Figura 6 A y B).

Por otra parte, los ratones KO PPAR α registraron en su mayoría un aumento significativo en el peso del hígado. Mientras que, dentro del grupo de ratones WT los hígados del grupo alimentado con AS 21% registró el peso más bajo con respecto al peso corporal. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre el peso del hígado ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p=0.0021$) (Figura 6 C).

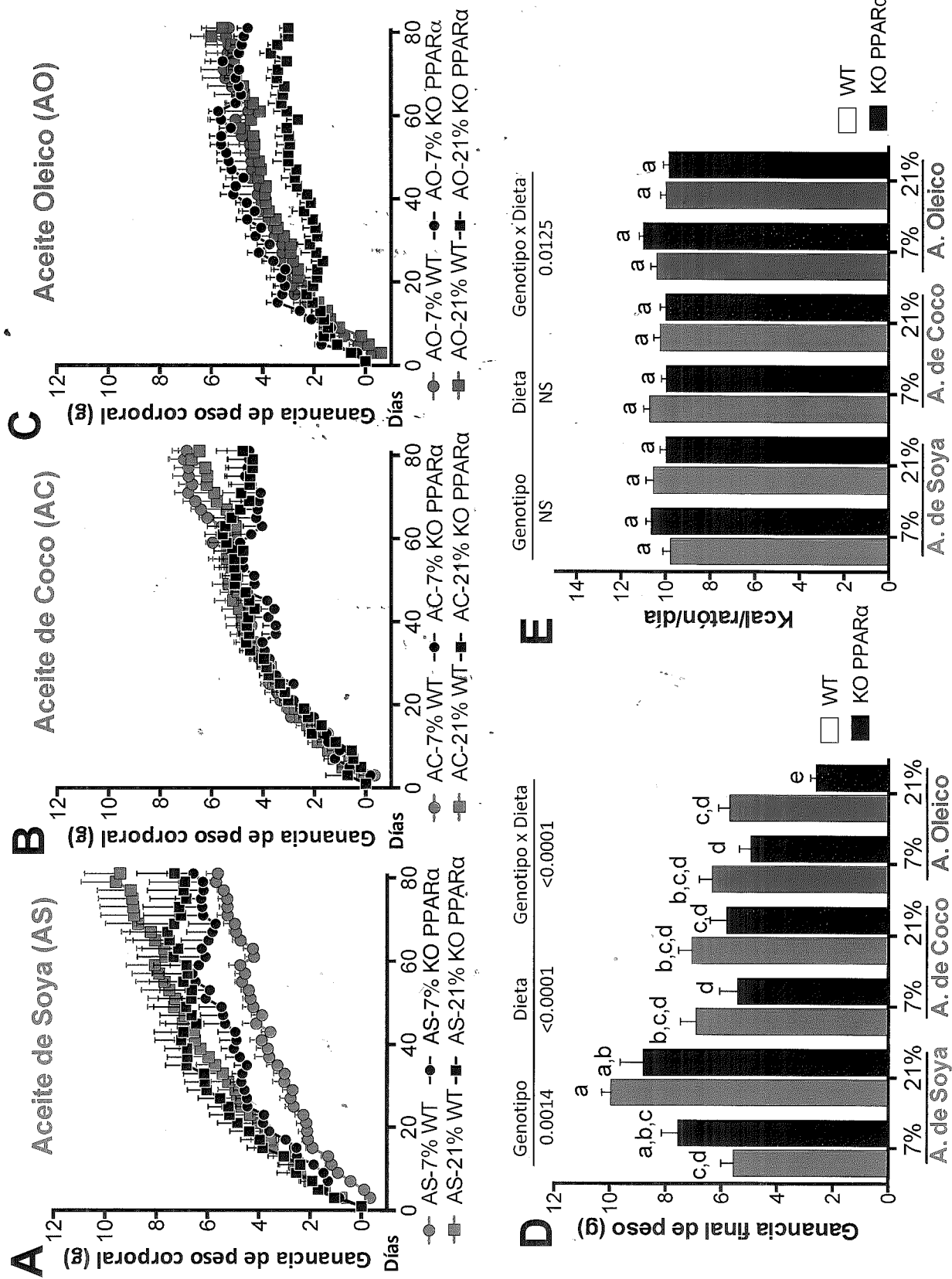


Figura 5. Determinaciones del peso corporal (A, B, C), ganancia final de peso corporal (D) e ingesta media diaria de energía por individuo normalizada por el peso corporal (E). Los valores representan la media \pm S.E.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P < 0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

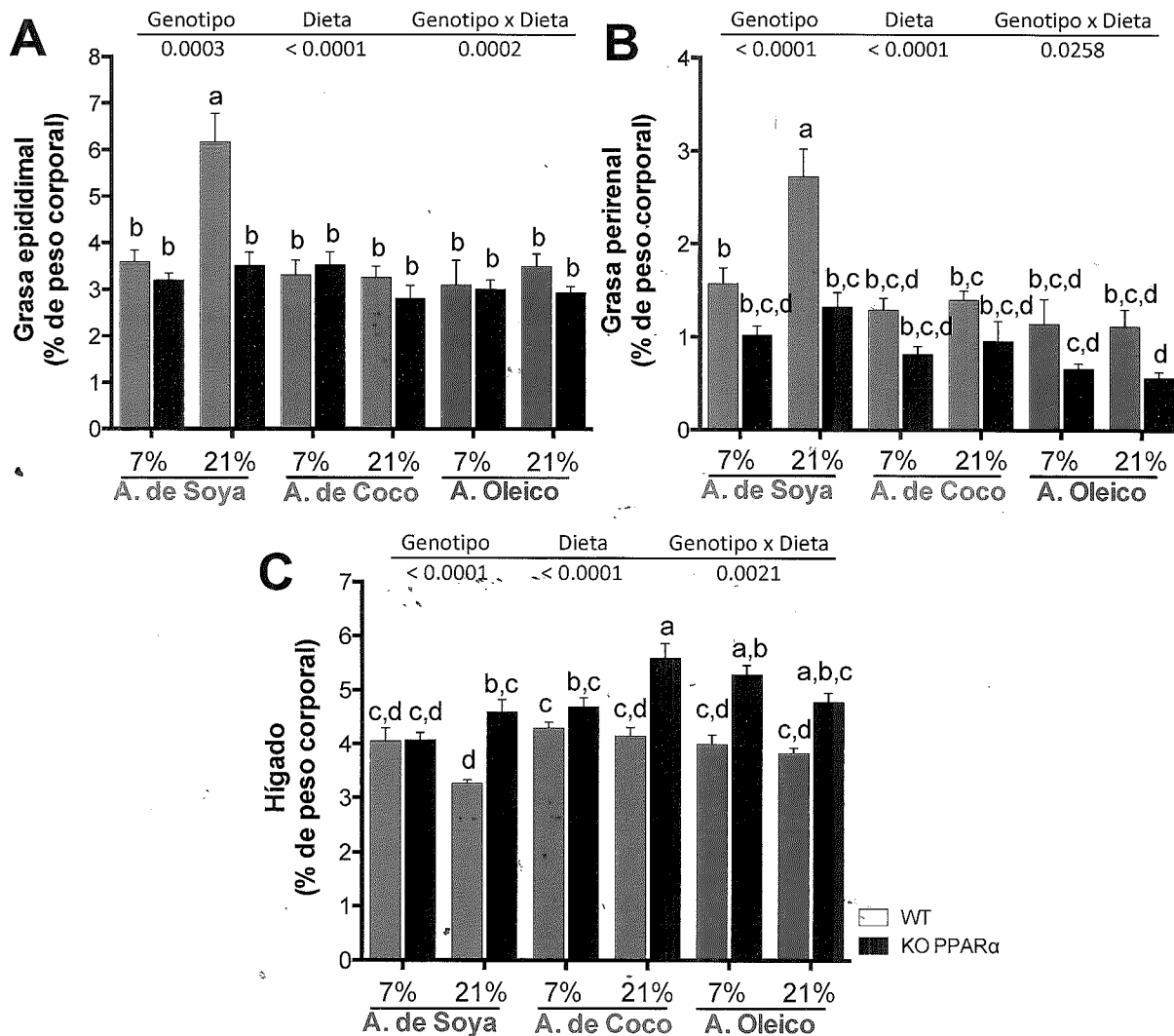


Figura 6. Determinaciones del porcentaje de peso corporal del tejido adiposo epididimal (A), perirenal (B) e hígado (C). Los valores representan la media \pm S.E.M. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P < 0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPAR α .

Alteraciones en el metabolismo de la glucosa

En el postprandio (después del consumo de alimento) la insulina predomina y favorece la captura de glucosa y lípidos en el tejido hepático, esquelético y adiposo. Por otro lado, se ha reportado que en los ratones KO PPAR α los niveles de glucagon se encuentran alterados y la secreción de esta hormona favorece procesos catabólicos y la movilización de glucosa. Por ello, en nuestro estudio determinamos la concentración de glucosa,

insulina y glucagon, y el efecto de la presencia o ausencia de PPAR α y la dieta sobre la concentración glucosa y de ambas hormonas.

La concentración de insulina durante el postprandio presenta una ligera tendencia a ser más baja en los ratones KO PPAR α comparado con el grupo WT, aunque fue un poco mayor en el grupo alimentado con AO 7% y casi igual con AC 7%. Por otra parte, los ratones WT alimentados con AS 7% y AC 21% presentaron los niveles más altos de insulina. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la concentración sérica de insulina en el postprandio ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente) (Figura 7 A). Los ratones KO PPAR α evidenciaron un aumento de glucagon de hasta 40% en comparación con los ratones WT. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la concentración sérica de glucagon ($p < 0.0001$ y $p = 0.0011$, respectivamente) (Figura 7 B). Además, se determinó el efecto del genotipo y la dieta sobre la proporción glucagon/insulina, ya que esta razón aumenta cuando hay actividad de gluconeogénesis y disminuye cuando la glucosa es abundante durante el postprandio. La proporción glucagon/insulina fue significativa solamente entre los diferentes tipos de dieta ($p < 0.0001$) y no para el genotipo (Figura 7-C).

Adicionalmente, se determinó la concentración sérica de glucosa además de las concentraciones de insulina, glucagon y la razón insulina/glucagon. Los ratones WT tuvieron una concentración sérica de glucosa en el postprandio de 1.1 a 1.4 veces más elevada en comparación con los ratones KO PPAR α , registrando diferencias significativas por el genotipo ($p < 0.0001$). Aunque no hubo una diferencia significativa por el tipo de dieta; se observó que los ratones KO PPAR α alimentados con AO tanto al 7% como al 21% tuvieron una tendencia a aumentar los niveles séricos de glucosa (Figura 7 D).

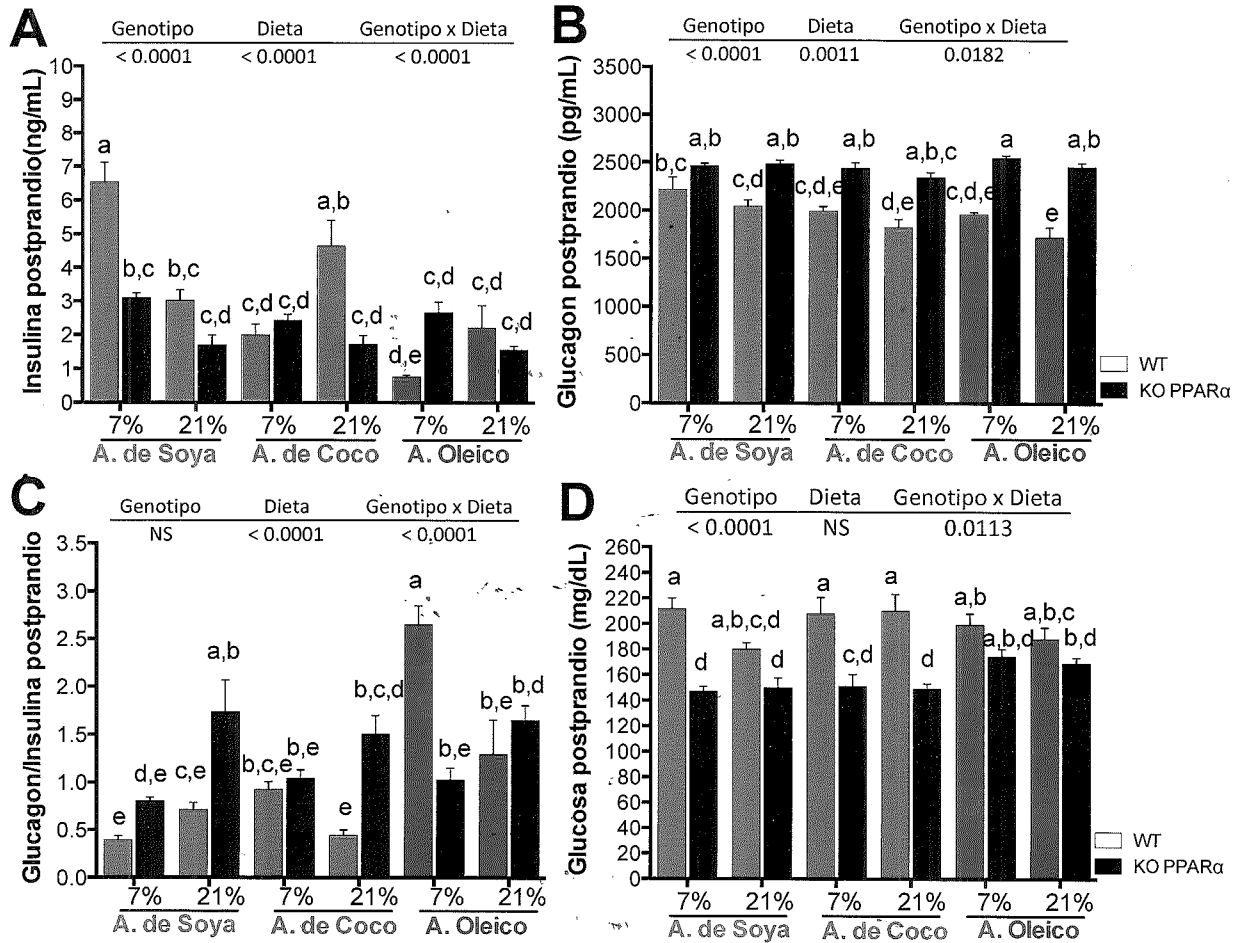


Figura 7. Determinaciones en suero de los niveles séricos de insulina, glucagon y glucosa. La concentración de insulina (A), glucagon (B) y glucosa (C) se determinaron en suero de los ratones WT y KO PPAR α alimentados con dos concentraciones de AGD después de 1 h después del postprandio. Se determinó la razón glucagon/insulina (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Captación de la glucosa

Los datos anteriores (niveles anormales de glucagon/insulina y glucosa durante el postprandio) sugieren que los ratones KO PPAR α presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Para determinar cambios en la asimilación de glucosa en cuerpo completo, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa. Al final de los tres meses de estudio se llevaron a cabo las pruebas de tolerancia a la glucosa, administrándola de manera intraperitoneal y se determinaron los niveles de glucosa a los minutos 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120.

Para distinguir los cambios entre grupos, se determinó el área bajo la curva (AUC) de la concentración de glucosa a los diferentes tiempos de la prueba de tolerancia a la glucosa. Los ratones WT tuvieron un área bajo la curva más elevada en comparación con los ratones KO PPAR α . Por otra parte, dentro del grupo WT se observó una ligera tendencia a tener mayor área bajo la curva en los grupos de ratones alimentados con 21% de grasa dietaria, excepto en el grupo alimentado con AO. Dentro del grupo KO PPAR α se observó que los ratones alimentados con AO tenían niveles de área bajo la curva más elevados en comparación con los demás grupos KO PPAR α , incluso las mediciones se encontraban dentro del mismo rango que los ratones WT.

La presencia o ausencia de PPAR α y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre la asimilación de glucosa en cuerpo completo, ($p < 0.0001$ y $p=0.0002$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta (Genotipo X Dieta) fue significativa, es decir que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes en la presencia o ausencia del PPAR α ($p=0.0002$) (Figura 8 A-D).

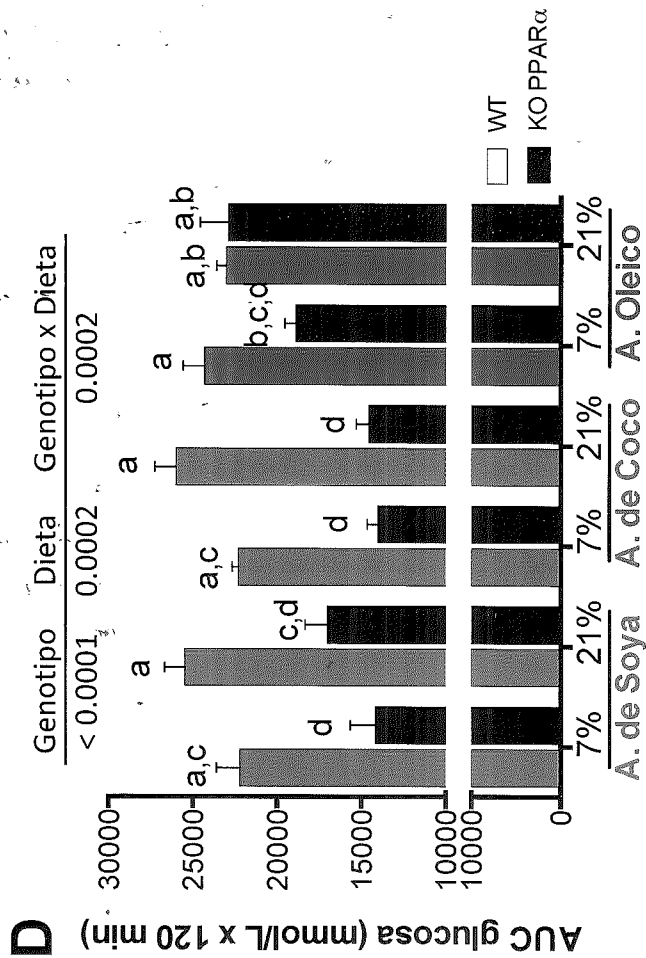
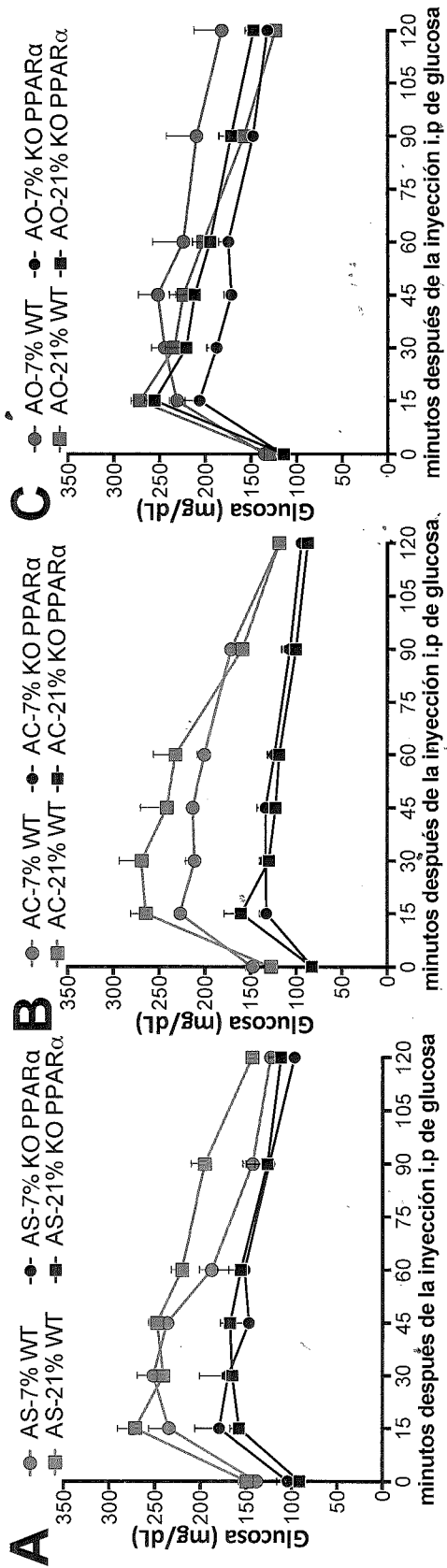


Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO (C) con 12 horas de ayuno, niveles de glucosa en sangre después de una carga de glucosa intraperitoneal (2 g/kg). Área bajo la curva (AUC) (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Gasto energético y modificación del uso de sustratos

Para determinar el efecto de PPAR α sobre el gasto energético y el uso de sustratos, se realizó un ensayo de calorimetría indirecta. Los ensayos de calorimetría indirecta permiten la evaluación del metabolismo respiratorio que determina el volumen de oxígeno (VO_2) consumido y de dióxido de carbono (VCO_2) producido, parámetros con los que se determina el coeficiente de intercambio respiratorio (RER).

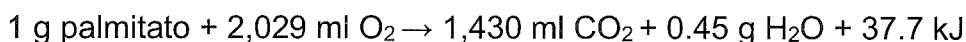
$$RER = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

La relación entre el VCO_2/VO_2 es un indicador del tipo de sustrato (carbohidrato o grasa) metabolizado por el organismo como fuente de energía. Los hidratos de carbono, lípidos, y proteínas son los tres principales sustratos energéticos que son oxidados para producir energía. Así, las proporciones de VO_2 , VCO_2 y la cantidad de energía liberada es diferente para cada uno de los tres sustratos.

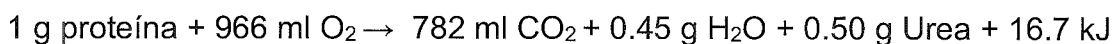
Para los carbohidratos, la proporción de VCO_2 a VO_2 es 1.0 y la ecuación general es:



Para los lípidos, la proporción de VCO_2 a VO_2 es 0.705 y la ecuación general es:



Para las proteínas, a pesar de su variabilidad en la composición de aminoácidos se utiliza una ecuación general para la oxidación aproximada de una proteína estándar en la cual la proporción de VCO_2 a VO_2 es 0.81 asumiendo que la urea es el principal producto de desecho es:



Entonces, un RER de 0.7 es indicador de que las grasas son la fuente de energía predominante, mientras que un RER de 0.85 sugiere que esta siendo metabolizada una mezcla de grasa y carbohidratos, mientras que un valor de 1 o mayor indica que los carbohidratos están siendo utilizados como la fuente de energía predominante.

Para realizar la calorimetría indirecta, los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con AS, AC y AO en ambas concentraciones de grasa dietaria (7% y 21%), se colocaron en cajas metabólicas individuales durante un periodo de 48 horas. Durante el tiempo que duro el estudio se mantuvo a los ratones con el mismo horario de alimentación de 8 am a 5 pm (10 horas) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Para distinguir los cambios entre grupos sobre el fenotipo metabólico referente a la calorimetría indirecta, se determinó el área bajo la curva (AUC) del VO₂ y del RER. En particular, tanto en el ayuno como en el postprandio los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con grasa dietaria al 21% presentaron una ligera tendencia a aumentar su consumo de oxígeno en comparación con los grupo alimentados con 7% de grasa, siendo ésta mayor para los grupos alimentados con AO y menor para los alimentados con AS. En ambos periodos metabólicos los ratones KO PPAR α no presentaron cambios significativos en el VO₂ en comparación con los ratones WT. Sin embargo, el tipo de dieta o ácido graso en las concentraciones dadas tuvo un efecto significativo sobre el VO₂ ($p=0.003$ y $p <0.0001$, respectivamente para ayuno y postprandio) (Figura 9 A-D).

Los valores de RER no se vieron modificados en el ayuno a pesar de los cambios en el consumo de O₂, por lo que los efectos del genotipo y dieta sobre el RER no fueron significativos. En el postprandio, las dietas al 21% de grasa dietaria favorecieron valores de RER menores tanto en los grupos WT como KO PPAR α . En particular los grupo alimentados con AO fueron los que tuvieron valores de RER menores, lo que indica una mayor utilización de lípidos como sustratos energéticos, datos que concuerdan con el VO₂. Los efectos del genotipo y de la dieta sobre el RER fueron significativos ($p=0.003$ y $p <0.0001$, respectivamente). Además, los resultados revelaron una interacción significativa entre el genotipo y la dieta (<0.0001).

Los resultados anteriores demostraron que el efecto sobre el valor del RER es influenciado principalmente por el tipo de dieta y por el genotipo, ya que la ausencia de PPAR α modifica el gasto energético y el uso de carbohidratos y lípidos como sustratos energéticos (Figura 10 A-D).

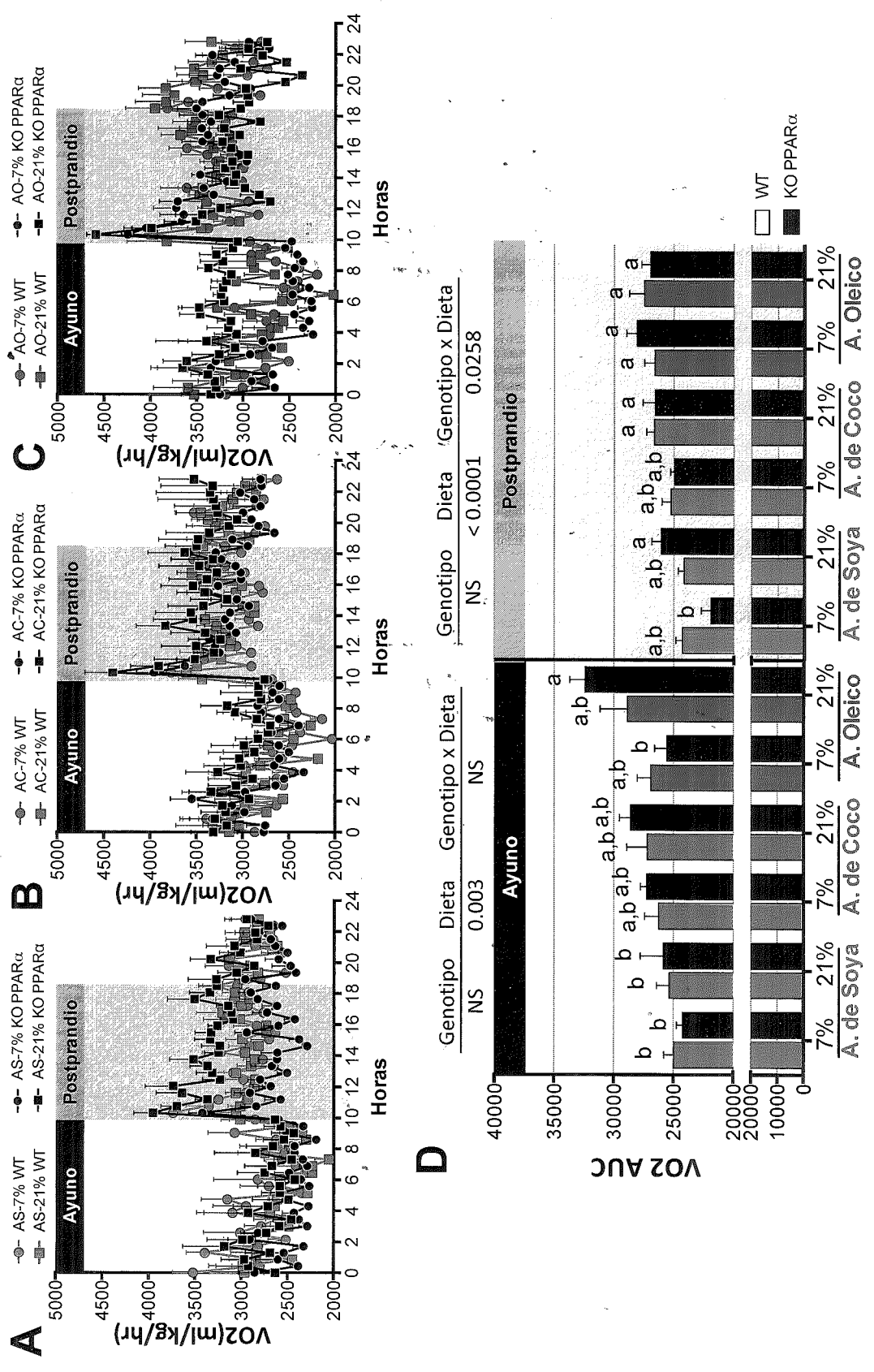


Figura 9. Niveles del consumo de oxígeno (VO₂) en el periodo postprandial y ayuno. Gráfica de los niveles VO₂ con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO (C) al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

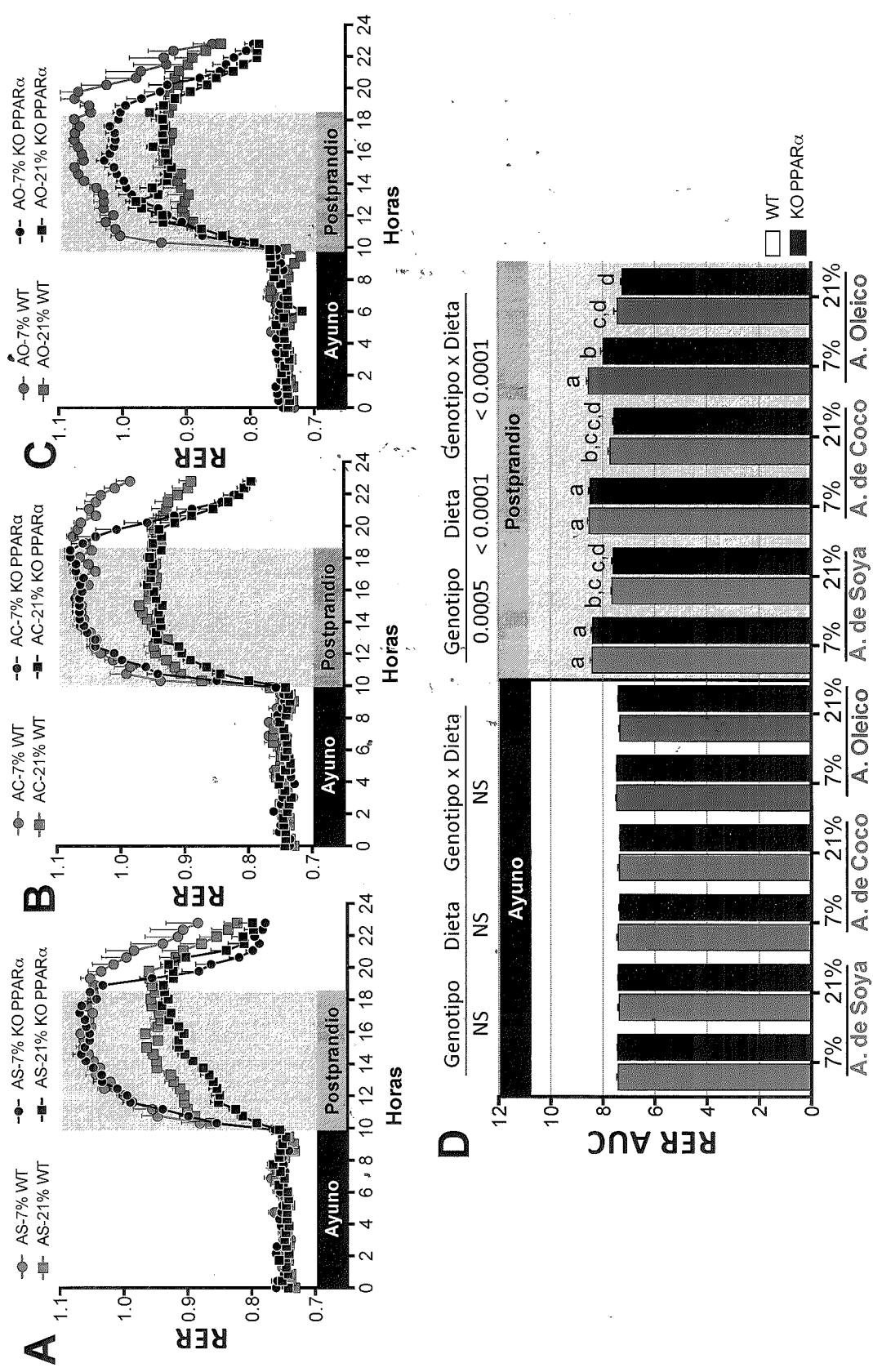


Figura 10. Niveles del RER en el postprandio y ayuno. Gráfica de los niveles RER con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($a>b>c>d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Análisis de la oxidación de carbohidratos y lípidos

La calorimetría indirecta también nos proporciona una estimación del gasto energético (producción de calor) a partir de la tasa de consumo de oxígeno que se transforma en el gasto de energía derivado de carbohidratos o lípidos, y se expresa como la relación entre la energía (Kcal) por el marco de tiempo de la medición (hr). El gasto energético se calcula a partir del "valor calorífico" (VC) que relaciona el volumen de oxígeno consumido con las kilocalorías que se queman por litro de O₂. El VC se deriva de datos empíricos obtenidos por Graham Lusk en "The Elements of the Science of Nutrition" (Tabla 5) (Lusk 1968). Para distinguir los cambios entre grupos sobre el gasto energético, se determinó el área bajo la curva (AUC).

En el ayuno, los ratones KO PPAR α presentaron una tendencia a tener valores más altos del gasto energético en comparación con los ratones WT. En particular los ratones KO alimentados con 21% de AO presentaron los mayores niveles de gasto energético. De hecho, el efecto sobre el gasto energético resultante del genotipo fue principalmente por el genotipo ($p < 0.0001$) y en menor medida por la dieta ($p = 0.0395$), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 11A-D).

En el postprandio, disminuyó la tendencia de los ratones KO PPAR α de tener valores más altos del gasto energético comparados con los WT. Sin embargo, los ratones KO PPAR α alimentados con 7% y 21% de AO presentaron nuevamente los mayores niveles de gasto energético. El efecto del genotipo y la dieta sobre el gasto energético en el postprandio fueron significativos ($p < 0.0001$ y $p = 0.0005$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 11 A-D).

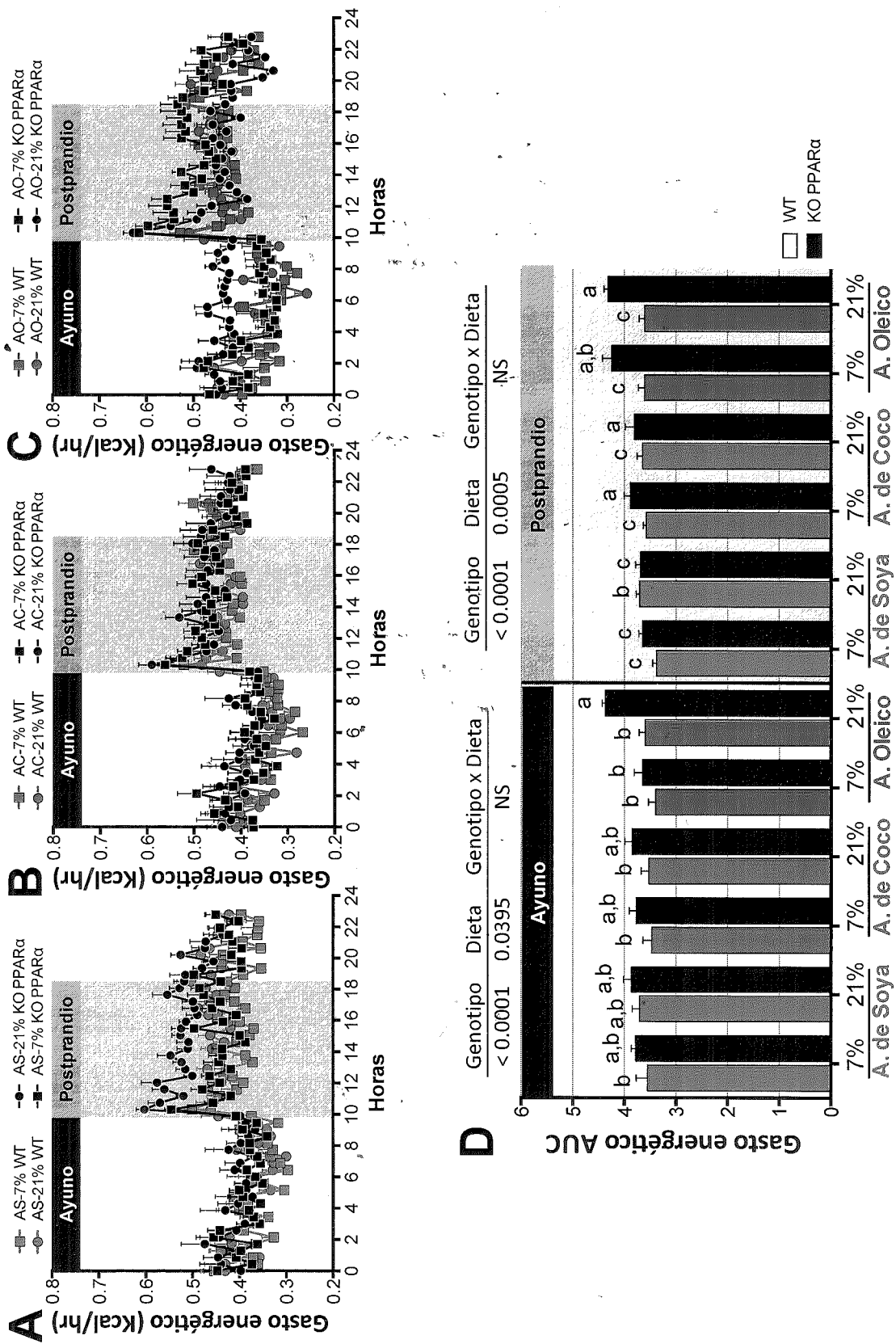


Figura 11. Niveles del gasto energético en el periodo postprandial y ayuno. Gráfica de los niveles de gasto energético con aceite de soya-AS (A), aceite de coco-AC (B) y aceite oleico-AO al final de los tres meses de alimentación con las diferentes dietas. Los valores representan la media \pm S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Tabla 5. Oxidación de mezclas de carbohidratos y lípidos

RER	Porcentaje del oxígeno total consumido por		Porcentaje del gasto calórico total producido por		Calorías por litro de O ₂	
	Carbohidratos	Lípidos	Carbohidratos	Lípidos	Número	Logaritmo
0.707	0	100.00	0	100.00	4.686	0.67080
0.71	1.02	99.00	1.10	98.90	4.690	0.67117
0.72	4.44	95.60	4.76	95.20	4.702	0.67228
0.73	7.58	92.20	8.40	91.60	4.714	0.67339
0.74	11.30	88.70	12.00	88.00	4.727	0.67459
0.75	11.47	85.50	15.60	84.40	4.739	0.67569
0.76	18.10	81.90	19.20	80.80	4.751	0.67679
0.77	21.50	78.50	22.80	77.20	4.764	0.67797
0.78	24.90	75.10	26.30	73.70	4.776	0.67906
0.79	28.30	71.70	29.90	70.10	4.788	0.68015
0.8	31.70	68.30	33.40	66.60	4.801	0.68133
0.81	35.20	64.80	36.90	63.10	4.813	0.68242
0.82	38.60	61.40	40.30	59.70	4.825	0.68350
0.83	42.00	58.00	43.80	56.20	4.838	0.68467
0.84	45.40	54.60	47.20	52.80	4.850	0.68574
0.85	48.80	51.20	50.70	49.30	4.862	0.68681
0.86	52.20	47.80	54.10	45.90	4.875	0.68797
0.87	55.60	44.40	57.50	42.50	4.887	0.68904
0.88	59.00	41.00	60.80	39.20	4.899	0.69011
0.89	62.50	37.50	64.20	35.80	4.911	0.69117
0.9	65.90	34.10	67.50	32.50	4.924	0.69232
0.91	69.30	30.70	70.80	29.20	4.936	0.69338
0.92	72.70	27.30	74.10	25.90	4.948	0.69443
0.93	76.10	23.90	77.40	22.60	4.961	0.69557
0.94	79.50	20.50	80.70	19.30	4.973	0.69662
0.95	82.90	17.10	84.00	16.00	4.985	0.69767
0.96	86.30	13.70	87.20	12.80	4.998	0.69880
0.97	89.30	10.20	90.40	9.58	5.010	0.69984
0.98	93.20	6.83	93.60	6.37	5.022	0.70088
0.99	96.60	3.41	96.80	3.18	5.035	0.70200
1.00	100.00	0	100.00	0	5.047	0.70303

Para determinar el efecto del PPAR α sobre el tipo de sustratos oxidados, se determinaron los valores del gasto energético obtenidos a partir de la calorimetría indirecta y de las tablas de Lusk (Tabla 5). Los valores obtenidos del gasto energético se relacionaron con los porcentajes de carbohidratos o lípidos oxidados en los diferentes tratamientos.

En el ayuno no se vieron modificaciones en el porcentaje de oxidación de carbohidratos y lípidos, ya que en promedio los ratones oxidaron entre un 12-16% de carbohidratos y entre un 84-88% de lípidos. Durante el postprandio los ratones WT y KO PPAR α alimentados con 7% de grasa dietaria oxidaron principalmente carbohidratos. Por otra parte, las diferencias más evidentes con respecto al tipo de dieta se observaron entre los grupos alimentados con 21% de grasa dietaria. Los ratones WT y KO PPAR α alimentados con AS 21% oxidaron en promedio un 77% de carbohidratos y un 23% de lípidos; los alimentados con AC 21% oxidaron un 81%(WT) y 75% (KO PPAR α) de carbohidratos, además de un 19% (WT) y 26% (KO PPAR α) de lípidos. Por último, los ratones alimentados con AO 21% son los que presentaron un mayor porcentaje de oxidación de lípidos, ya que oxidaron un 29%(WT) y 39% (KO PPAR α) de lípidos, además de un 71% (WT) y 61% (KO PPAR α) de carbohidratos (Figura 12).

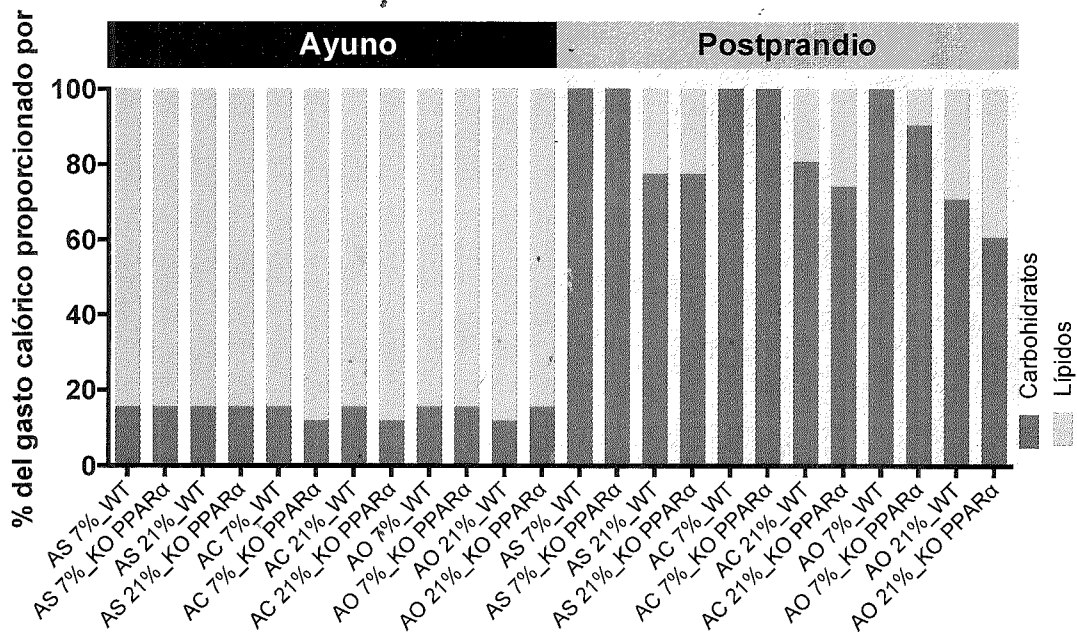


Figura 12. Porcentaje del valor promedio del gasto calórico proporcionado por carbohidratos y lípidos para cada uno de los tratamientos dietarios.

Parámetros lipídicos y lipoproteicos en plasma

Debido a que la composición de ácidos grasos de los aceites y el contenido de grasa dietaria son factores importantes en la modulación del metabolismo de lípidos, y afectan directamente el perfil de lípidos y lipoproteínas en suero, se determinaron los niveles séricos de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL en el postprandio.

Después de la alimentación, los niveles de colesterol total fueron mayores en los ratones KO PPAR α en comparación con los ratones WT. Mientras que los grupos alimentados con AC en ambas concentraciones 7% y 21%, tanto en ratones WT como ratones KO PPAR α , registraron los niveles más altos de colesterol en suero, siendo mayores para el grupo con 21% que para el grupo al 7% de grasa dietaria. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 A).

Los ratones KO PPAR también evidenciaron un aumento en las concentraciones de LDL en comparación con los ratones WT. De manera similar a los niveles de colesterol total, los niveles de LDL en los grupos de ratones WT y KO PPAR α alimentados con AC registraron los niveles más altos de LDL en suero, en concentraciones similares entre los grupos alimentados con 7% y 21% de grasa. Es interesante que, los grupos WT y KO PPAR α alimentado con AS 21% registraron los niveles más bajos de LDL. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de LDL ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), aunque no se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 B).

Las concentraciones de HDL al igual que el LDL y el colesterol total, también se mantuvieron aumentadas en los ratones KO PPAR α . Dentro de los grupos WT, los niveles más elevados los registraron los grupos alimentados con AC tanto al 7% como al 21%. Mientras que, entre los grupos KO PPAR α los grupos alimentados con AC y AO registraron los niveles más elevados de HDL. El genotipo y la dieta tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de HDL ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), tampoco se observó interacción entre ambas variables (Figura 13 C).

Al igual que las variables bioquímicas anteriores, la concentración de triglicéridos también fue sensible al genotipo ($p=0.004$), los ratones KO PPAR α mostraron una tendencia a tener niveles más altos de triglicéridos en comparación con los grupos WT, con excepción del grupo alimentado con AS 21% donde el efecto fue inverso. Por otro lado, entre los grupos WT los alimentados con 21% de grasa muestran una tendencia a tener niveles más elevados de triglicéridos en comparación con los grupos alimentados con 7% de grasa, exceptuando al grupo ambientado con 21% de AO. La dieta no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de triglicéridos, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa, el efecto en las diferencias según el tipo de dieta son consistentes ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p < 0.0001$) (Figura 13 D).

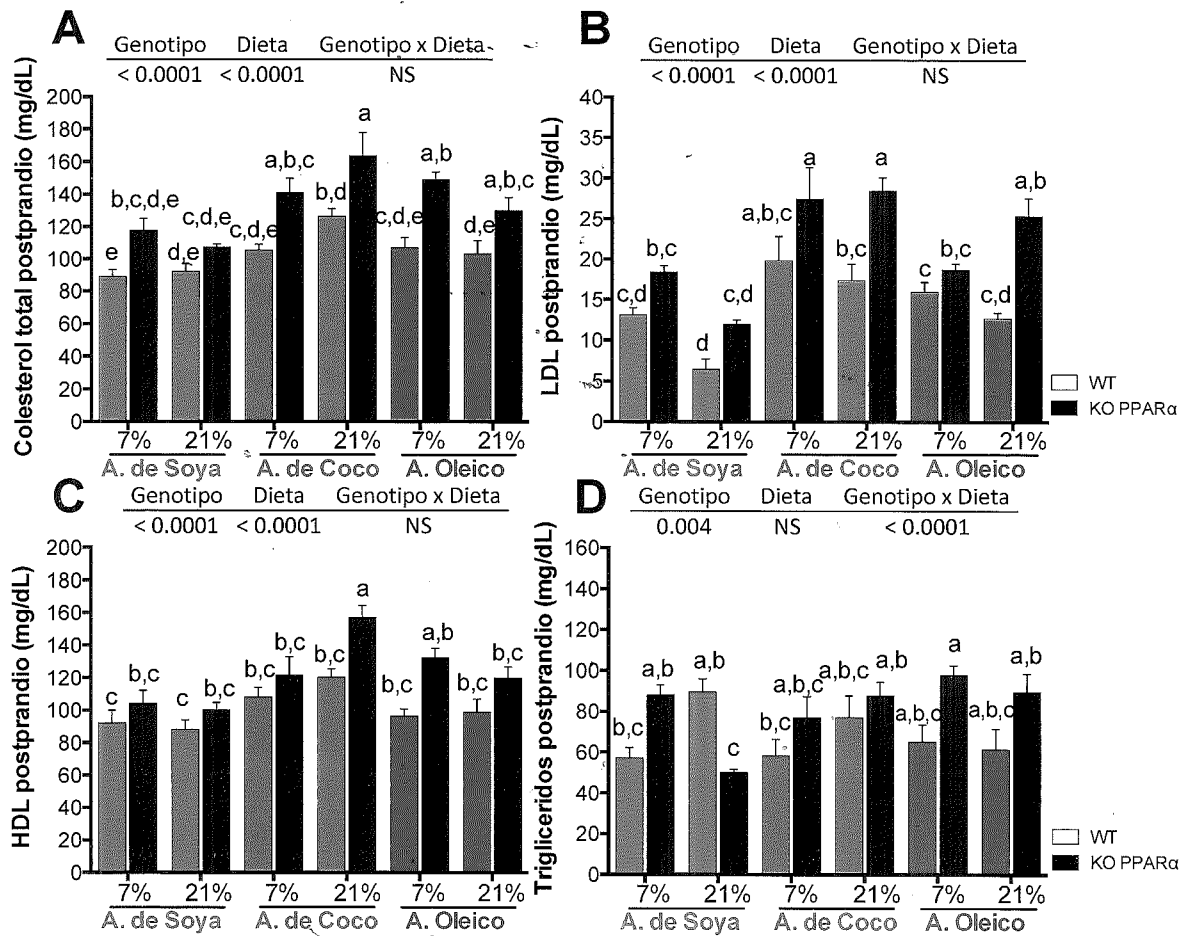


Figura 13. Determinaciones en suero de los niveles de colesterol total (A), LDL (B), HDL (C) y triglicéridos (D). Los valores representan la media \pm S.E.M.. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($a > b > c > d$, $P < 0.05$); $n = 6$ WT y $n = 7$ KO PPAR α .

Vías metabólicas reguladas por el PPAR α , el tipo y la cantidad de ácidos grasos

El PPAR α tiene un papel clave en la regulación de las vías metabólicas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos (principalmente en la oxidación) y también en la degradación de aminoácidos, recientemente descrito. Además, se sabe que los ácidos grasos dietarios juegan un papel importante como reguladores de la expresión génica, ya que son ligandos exógenos de PPAR α como lo son los AGP. Por lo anterior y a partir de los cambios observados en los ratones KO PPAR α en cuanto al uso de sustratos energéticos, se identificaron las alteraciones en las vías metabólicas reguladas por el PPAR α y por el tipo de ácido graso. Para ello se determinó en el hígado el patrón de expresión de los genes involucrados en degradación de ácidos grasos (PPAR α , PPAR δ , PGC1 α , ACOX1 y CPT1 α), síntesis de ácidos grasos (SREBP1, PPAR γ , SCD1, ACC y FAS) y de la degradación de aminoácidos (HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa).

Oxidación de ácidos grasos

La expresión de PPAR α registró niveles despreciables en los ratones KO PPAR α , mientras que, entre los grupos WT el efecto por el tipo de dieta fue mayor para los grupos alimentados con AO en ambas concentraciones 7% y 21%, y menor para los grupos alimentados con AS (Figura 14 A). La expresión del PPAR α estuvo influenciada por el genotipo ($p < 0.0001$) y por el tipo de dieta ($p < 0.0001$), junto con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). En particular, el PGC1 α se encontraba principalmente sobre-expresado en los grupos de ratones KO PPAR α alimentados con AS al 7% y 21%, a diferencia de los grupos alimentados con AC o AO, que tuvieron niveles de expresión menores que los grupos WT, por ello el genotipo no tuvo un efecto significativo sobre la expresión del PGC1 α . En los grupos WT se observó que los ratones alimentados con AO, seguidos por los alimentados con AC fueron los que tuvieron mayores niveles de PGC1 α en comparación con los alimentados con AS. La dieta tuvo un efecto significativo sobre la expresión del PGC1 α ($p < 0.0001$). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa ($p < 0.0001$) (Figura 14 B).

Es interesante que, a pesar de que los ratones KO PPAR α carecen de PPAR α funcional

se observó un nivel de expresión considerable en el grupo de genes que se encuentran regulados río abajo de PPAR α . Por un lado, los niveles de expresión de ACOX1 se vieron influenciados por el genotipo y la dieta ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Además, la interacción entre genotipo y el tipo de dieta fue significativa ($p < 0.0001$). De este modo, los ratones KO PPAR α alimentados con AS al 7% y 21% fueron los grupos que tuvieron mayor expresión de ACOX1, seguidos por el grupo alimentado con AC al 7%. Por otro lado, entre los ratones WT se encontró que los grupos alimentados con AO al 7% y 21%, además del grupo de AC 21% son los que tienen mayormente expresado a ACOX1. Mientras que, los grupos alimentados con AS presentaron los niveles más bajos de expresión de ACOX1 (Figura 14 C). Además, la expresión de CPT1 α también se vio influenciada por el genotipo y la dieta ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$, respectivamente), con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). La expresión de CPT1 α fue mayor en los grupos WT alimentados con AO al 7% y 21%, seguido por el grupo alimentado con AC 21% y en menor cantidad por los grupos alimentados con AS en ambas concentraciones. Un comportamiento similar se mostró en los grupos KO PPAR α , con la particularidad que los grupos alimentados con AS y AC tuvieron una mayor expresión de esta enzima, principalmente en el grupo con 7% de grasa (Figura 14 D).

Por último, en ratones KO PPAR α se observó la expresión de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos lo que sugería la activación de mecanismos alternativos que compensaron la ausencia de PPAR α . Por ello, se determinaron los niveles de expresión de PPAR δ , el candidato más plausible de la familia de los PPARs que pudiera estar ocupando el lugar de PPAR α en la regulación del catabolismo de ácidos grasos. De manera interesante, se observó que los grupos KO PPAR α tuvieron una tendencia a tener más expresión de PPAR δ en comparación con los ratones WT. En particular los ratones KO PPAR α ratones alimentados con AS al 7% y 21% al igual que el AC al 7% fueron los grupos con los niveles más elevados de expresión de PPAR δ (Figura 14 E).

Oxidación de ácidos grasos

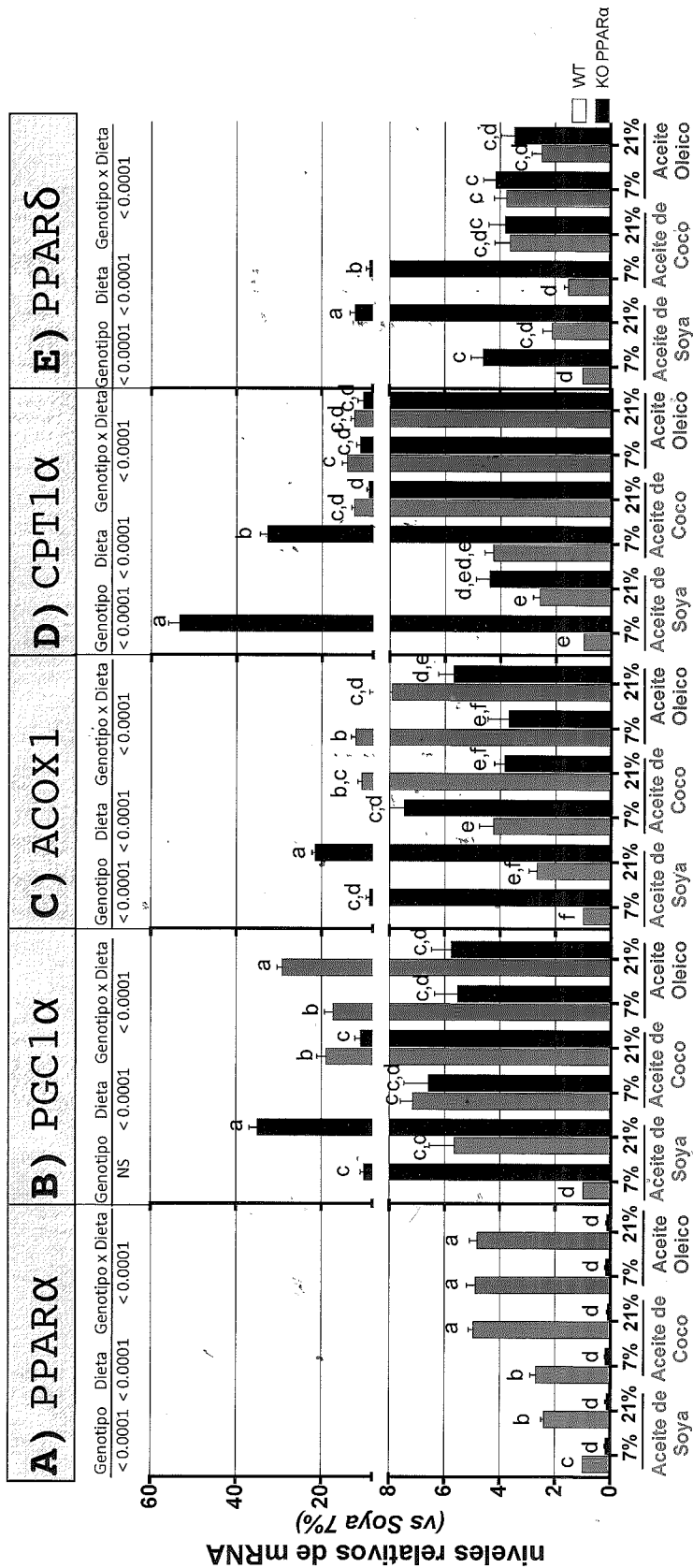


Figura 13. Niveles relativos de mRNA de los genes PPARα, PGC1α, ACOX1, CPT1α y PPARδ normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β2microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media ± S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P <0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPARα.

Degradación de aminoácidos

Se determinó la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos en tejido hepático, debido a que los ratones KO PPAR α presentaron alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, además del incremento en los niveles de glucagon independiente del tipo de ácido graso. En reportes previos se ha relacionado que el glucagon estimula la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos (Alemán et al. 1998).

En los ratones KO PPAR α los genes que codifican para las enzimas degradadoras de aminoácidos (HAL, SDH y glutaminasa) y de HNF4 α incrementaron su expresión en comparación con los grupos WT, exceptuando los grupos alimentados con AO y los grupos alimentados con AC al 21% quienes presentaron niveles muy cercanos de expresión a los del grupo WT correspondiente. La expresión de HNF4 α , HAL, SDH y glutaminasa estuvo influenciada por el genotipo ($p < 0.0001$) y por el tipo de dieta ($p < 0.0001$), junto con una fuerte interacción entre ambas variables ($p < 0.0001$). Es decir, que el efecto en las diferencias según el tipo de dieta es consistente ya sea para los ratones WT y KO PPAR α ($p = 0.0021$) (Figura 16 A-D).

La expresión de HNF4 α se encontró particularmente alta en los ratones KO PPAR α , siendo los grupos alimentados con AS al 7% y 21% y AC al 7% los grupos con los niveles más altos de expresión (Figura 16 A). De igual modo, aunque en menor grado la expresión de HAL presentó una tendencia a ser mayor en los grupos KO PPAR α , con los mayores niveles de expresión en los grupos alimentados con AS al 7% y con AC al 7% (Figura 16 B). De manera semejante los grupos alimentados con AS al 7% y 21% y AC al 7% tuvieron los niveles más altos de expresión de SDH y glutaminasa (Figura 16 C,D). Entre los ratones WT, es interesante observar que los grupos alimentados con AO en ambas concentraciones (7% y 21%) presentan un ligero incremento en la expresión de HAL, SDH y glutaminasa, seguido por los grupos alimentados con AC y por último en menor cantidad los grupos alimentados con AS. (Figura 16 A-D).

Degradación de aminoácidos

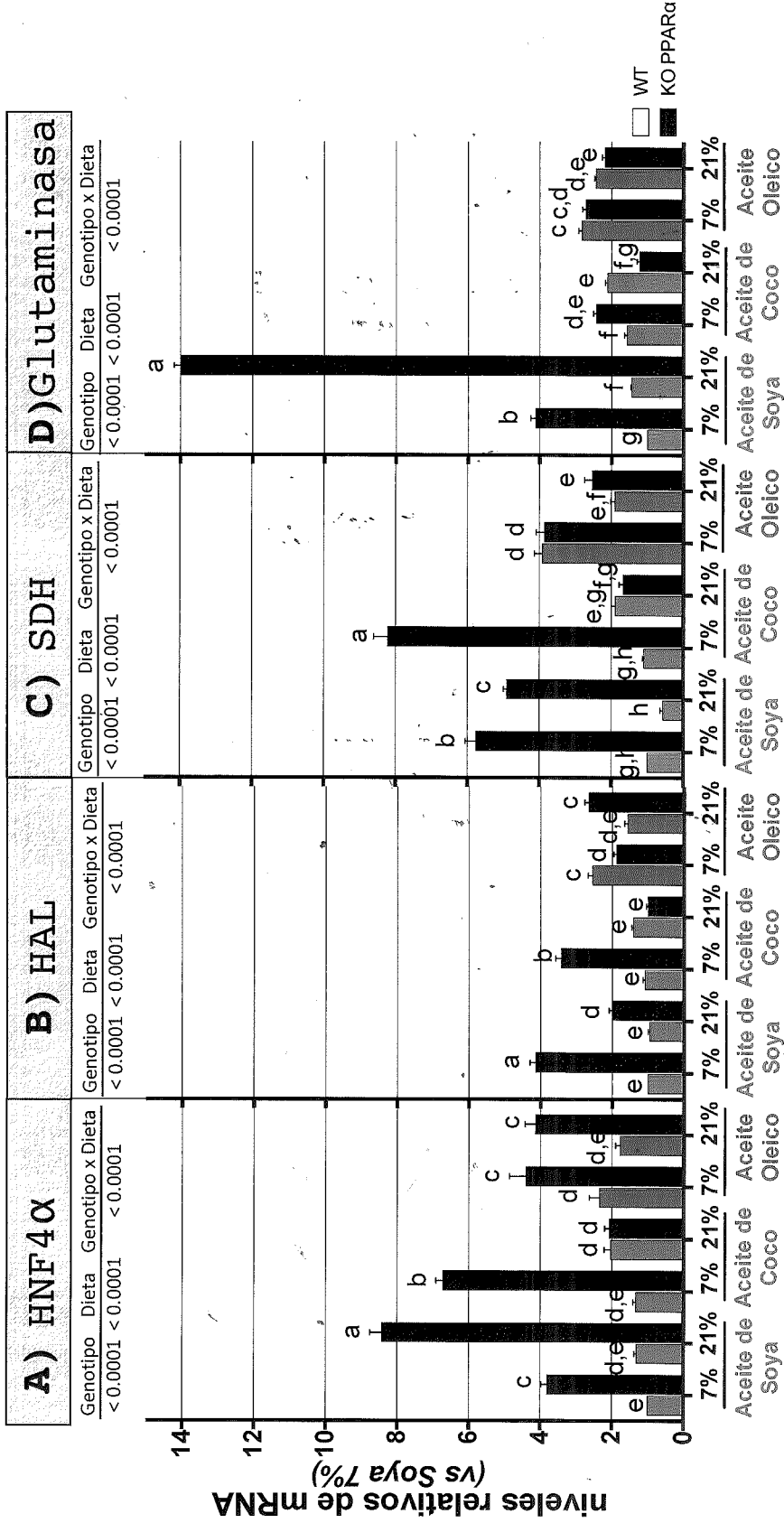


Figura 16. Niveles relativos de mRNA de los genes HNF4α, HAL, SDH y glutaminasa normalizados con los genes constitutivos m36B4 y β2microglobulina. Los ratones alimentados con soya 7% son el control biológico (valor de 1). Los valores representan la media ± S.M.E. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (a>b>c>d, P <0.05); n = 6 WT y n = 7 KO PPARα.

A continuación se presenta el mapa de color de la expresión de genes involucrados en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y degradación de aminoácidos en los ratones WT y KO PPAR α en el postprandio alimentados previamente con las dos concentraciones de aceites dietarios (AS, AC y AO). Los mapas de color se utilizaron como una herramienta para facilitar la visualización de los niveles de expresión de los genes. De esta manera, se pueden identificar los genes con valores de expresión más altos o más bajos con respecto al control biológico (grupos alimentados con AS al 7%). En los ratones KO PPAR α , los genes que codifican para las enzimas degradadoras de aminoácidos incrementaron su expresión en comparación con los grupos WT (Figura 17).

Conclusiones

El PPAR α es un factor de transcripción que puede unirse a ácidos grasos provenientes de la dieta y modular el uso de los sustratos energéticos. En ratones WT se concluye que el consumo de AO estimula en mayor grado la oxidación de ácidos grasos y mantiene niveles bajos de expresión de EDAA, además de una proporción glucagon/insulina más alta que posiblemente este estimulando procesos gluconeogénicos.

Por otro lado, el consumo de AS reduce la expresión de genes involucrados en lipogénesis en hígado y reprimir el catabolismo de aminoácidos; por mecanismos poco claros el consumo de AS al 21% parece estar promoviendo ganancia de peso y aumento del tejido adiposo aunque con una importante reducción en los niveles de LDL.

El consumo de AC parece promover alteraciones en el perfil de lípidos en el suero y una desregulación en el metabolismo hepático de lípidos (alta oxidación y síntesis de ácidos grasos) con un patrón no muy claro en el catabolismo de aminoácidos.

Finalmente, un alto consumo de grasa dietaria independientemente del tipo de aceite (21%) promueve la disminución de la lipogénesis hepática.

Interesantemente, aún en ratones KO PPAR α se observó una alta oxidación de ácidos grasos estimulada por el consumo de AO y de manera semejante aunque en menor grado, los grupos KO PPAR α alimentados con AS o AC también mostraron expresión de enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos.

Al no estar PPAR α presente se propone que PPAR δ puede estar ocupando el lugar de PPAR α en la regulación del catabolismo de ácidos grasos.

Adicionalmente, en ratones KO PPAR α también observamos alteraciones en el perfil de lípidos en suero (altos niveles de triglicéridos, LDL y HDL). De igual manera que en los grupo WT el alto consumo grasa dietaria parece disminuir la lipogénesis hepática.

Aparentemente, las altas concentraciones de glucagon en los ratones KO PPAR α están influyendo en el catabolismo de aminoácidos, sin embargo en ratones KO PPAR α alimentados con AO no pasa esto, ya que al elevar la concentración de glucosa parece inhibir el aumento en los niveles de expresión de EDAA. Contrario a lo que podría suponerse, el fenotipo de los ratones KO PPAR α parece no estar propiamente asociado con un fenotipo obeso.

Nuestros resultados resaltan la importancia que tiene la composición de ácidos grasos provenientes de tres de los aceites más utilizados para consumo humano en la utilización de los sustratos energéticos, ya que son ligandos y reguladores de PPAR α . Se concluye que el aceite oleico fue el aceite que en incluso en altas concentraciones mostró mejores cambios metabólicos en la presencia o ausencia del PPAR α , una mayor oxidación de ácidos grasos en ambos genotipos y la disminución en la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos en ratones KO PPAR α . Además se enfatiza la importancia del PPAR α en la homeostasis metabólica al ser un interruptor metabólico que promueve la conservación del nitrógeno corporal al favorecer la oxidación de ácidos grasos en hígado.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

Ciudad de México a 28 de junio de 2019

No. Oficio CICUAL-137-19



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA



ACUSE

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
Fisiología de la Nutrición.
Presente.

Estimada Dra. Torres:

Por este conducto informo que el proyecto intitulado: "EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-)" con registro FNU-50-11-13-1 finalizó en junio de 2017. Este protocolo que en un inicio tenía como investigador responsable a la Dra. Gabriela Alemán y que en un oficio sin número con fecha de 25 de julio de 2018, nos informa que el protocolo se dividió en dos fases y nos entrega los productos finales de la primera fase en la que ella fue responsables, nos indica que la responsable de la segunda fase será Usted; es por ello que le solicitamos nos apoye con el llenado del formato de cierre, especificando que es la segunda fase, y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

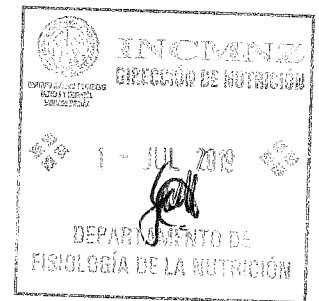
1. Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Le reitero la importancia que tiene que nos entregue esta documentación a la brevedad ya que el Comité tiene que informar sobre los protocolos cerrados al Sistema de Portales de Obligaciones de Transparencia (SIPOT).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



2482 9:50
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

01 JUL 2019
DMSE
INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMNSZ

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/bdr



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

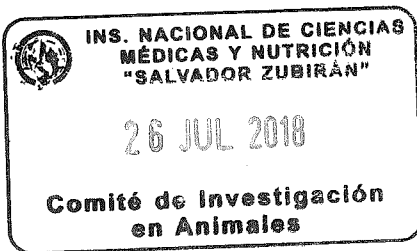
México Cd. Mx., a 27 de junio del 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval,
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Efecto del ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la histidasa (HAL) y la serina deshidratasa (SDH) en ratones PPAR alpha_o(-/-)" con registro CINVA: FNU-50-11-13-1, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.



Atentamente,

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

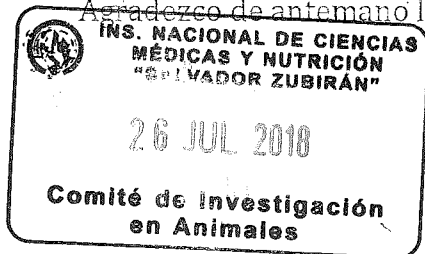
México Cd. Mx., a 25 de Julio de 2018

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que el protocolo titulado "Efecto del ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la histidasa (HAL) y la serina deshidratasa (SDH) en ratones PPAR alpha (-/-)" con registro CINVA FNU-50-11-13-1 se dividió en dos partes. La primera parte se desarrolló del año 2011 al 2014 y posteriormente se solicitó una extensión hasta junio del 2017. En un inicio se planeó que yo estaría involucrada en la realización de esta segunda parte del proyecto por lo que permanecí como responsable del mismo ante la CINVA, sin embargo por diversos factores, ya no me involucré en el mismo. La responsable de dirigirlo fue la Dra. Nimbe Torres y Torres del Depto. de Fisiología de la Nutrición por lo que ella se hará cargo de entregar todos los productos generados de esa parte del proyecto. Cabe mencionar que en el informe final agregué un resumen que ella me proporcionó de los resultados obtenidos de esa parte del protocolo.

Agradezco de antemano la atención brindada a la presente.



Atentamente,

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx

INFORME FINAL

PROYECTO CINVA No. FNU-50-11-13-1

TÍTULO: EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: DRA. GABRIELA ALEMÁN ESCONDRILLAS

PRODUCTOS GENERADOS:

• CONGRESOS:

Metabolic Signaling and Disease: From Cell to Organism. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. USA (2013)

Alejandra V Contreras, Claudia Rangel, Victor Ortiz, Gabriela Aleman, Lilia Noriega, Ivan Torre-Villalvazo, Elizabeth Tejero-Barrera, Nimbe Torres, Armando R Tovar

DIETARY PROTEIN REGULATES GENE EXPRESSION OF AMINO ACID-DEGRADING ENZYMES THROUGH PPAR α (PÓSTER)

XVIII Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud, Acapulco, Guerrero. México (2013)

Tovar Palacio Armando Roberto, Contreras Alejandra V., Rangel Claudia, Ortiz Víctor, Alemán Gabriela, Recillas Targa Félix, Palacios Berenice, Tejero Elizabeth, Torre Iván, Noriega Lilia, Granados Omar, Torres Nimbe

LA PROTEÍNA DIETARIA REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE AMINOÁCIDOS A TRAVÉS DE PPAR-ALFA (ORAL)

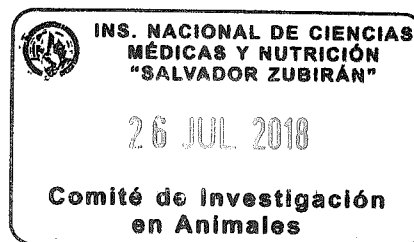
American Society of Human Genetics, Annual Meeting. San Francisco CA. USA (2012)

A.V. Contreras, C. Rangel, V. Ortiz, G. Aleman, B. Palacios, E. Tejero, N. Torres, A.R. Tovar

DIETARY PROTEIN REGULATES GENE EXPRESSION OF AMINO ACID-DEGRADING ENZYMES THROUGH PPAR-ALPHA (PÓSTER)

PUBLICACIONES:

Contreras, A.V., Rangel-Escareño, C., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., Ortiz, V., Noriega, L.G., Torre-Villalvazo, I., Granados, O., Velázquez-Villegas, L.A., Tobón-Cornejo, S., González-Hirschfeld, D., Recillas-Targa, F., Tejero-Barrera, E., González, F.J., Tovar, A.R. PPAR α via HNF4 α regulates the expression of genes encoding hepatic amino acid catabolizing enzymes to maintain metabolic homeostasis. Genes Nutr. 2015; 10 (2): 452.



RESULTADOS:

PRIMERA PARTE:

Se evaluó el efecto de tres ligandos naturales de PPAR alfa, los ácidos grasos palmítico, linoleico y oleico, y se midió su efecto sobre la expresión del gen de la Serina Deshidratasa (SDH) en cultivos primarios de hepatocitos. Se observó que estos ligandos reprimieron la activación de la SDH por forskolina, y estimularon la expresión de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1).

También alimentamos ratones PPAR alfa (-/-) con dietas que contenían diferentes concentraciones de proteína (baja, adecuada y alta). Se midieron parámetros metabólicos en suero e hígado, y en muestras de hígado se evaluó la expresión génica y se realizaron ensayos histológicos.

Los ratones PPAR alfa (-/-) mostraron mayor expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos (EDAA) en hígado, que afectó el metabolismo de aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono. También presentaron una razón glucagon/insulina mayor (7:2 veces), mayor concentración de urea sérica (73.1%), menor contenido de proteína corporal (19.7%), y menor concentración de diversos aminoácidos en suero en una dieta alta en proteína al compararlo con los ratones silvestres. A partir del análisis de enriquecimiento funcional de los genes diferencialmente expresados por el consumo de la proteína dietaria se observó una relación funcional entre el PPAR alfa y el HNF4 alfa. Finalmente, nuestros resultados mostraron que PPAR alfa puede disminuir la expresión de EDAA a través de la atenuación transcripcional de HNF4 alfa, como se observó en la región promotora de SDH. Los resultados obtenidos demostraron que además de regular el metabolismo de lípidos, la activación de PPAR alfa también regula el catabolismo de los aminoácidos en hígado, promoviendo así la homeostasis metabólica.

SEGUNDA PARTE.

(PUBLICACIÓN EN PREPARACIÓN)

Se evaluaron tres diferentes tipos de aceites en dos concentraciones en la dieta (7 y 21%)

Aceite de soya (70% de ácidos grasos poliinsaturados)

Aceite oleico (71% de ácidos grasos monoinsaturados)

Aceite de coco (88% de ácidos grasos saturados)

Se concluye que el consumo de aceite oleico en ratones WT y PPAR alfa (-/-) estimula la oxidación de ácidos grasos y mantiene niveles bajos de expresión de EDAA. El consumo de aceite de soya redujo la expresión de genes involucrados en la lipogénesis en hígado y reprimió los del catabolismo de aminoácidos.

El consumo de aceite de soya al 21% promovió la ganancia de peso y aumentó el tejido adiposo aunque se observó una disminución en la concentración de LDL. El consumo de aceite de coco promovió altas concentraciones de colesterol total, LDL y HDL en suero, cambios en la regulación del metabolismo

hepático de lípidos, con un patrón poco claro en lo referente al catabolismo de aminoácidos. En los ratones PPAR alfa (-/-) se observó que a pesar de la ausencia de PPAR alfa, se expresaron proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos, lo que sugiere la activación de mecanismos alternativos que compensaron la ausencia de PPAR alfa. Probablemente PPAR delta sea el encargado de tomar ese papel.

Los ratones knockout presentaron altas concentraciones de triglicéridos, LDL y HDL en suero.



Se observó una disminución en la lipogénesis hepática tanto en ratones WT como PPAR alfa (-/-) al consumir las dietas altas en grasa. La ausencia de PPAR alfa aumentó la concentración de glucagón y estimuló el catabolismo de aminoácidos, excepto en aquellos ratones alimentados con la dieta que contenía ácido oleico. El consumo de aceite oleico restableció en ellos la concentración de glucosa sérica a nivel normal e inhibió el incremento en la expresión de EDAA. El fenotipo de los ratones PPAR α (-/-) no se asocia con un fenotipo obeso.

Nuestros resultados resaltan la importancia de las diferentes fuentes de ácidos grasos, particularmente del ácido oleico, en la regulación del metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, y de estos últimos como ligandos y reguladores de PPAR alfa. También reafirma la importancia de PPAR alfa como un interruptor metabólico que modula el uso de sustratos energéticos.

Dietary protein regulates gene expression of amino acid-degrading enzymes through PPAR α

Alejandra Contreras, Claudia Rangel, Victor Ortiz, Gabriela Aleman, Berenice Palacios-Gonzalez, Elizabeth Tejero, Nimbe Torres, and Armando Tovar

Published Online: 1 Apr 2013

 Tools  Share

Abstract

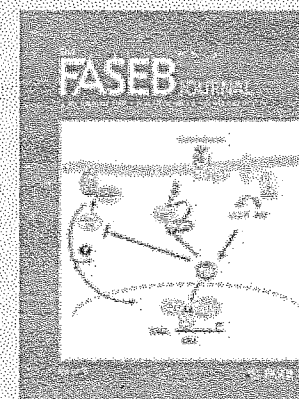
The effects of PPAR α ligands, such as fatty acids, have been demonstrated in several tissues, particularly in liver, modulating the expression of enzymes for fatty acid oxidation, but recent evidence also suggest that PPAR α regulates amino acid oxidation. The amino acid catabolism is regulated by hepatic amino acid-degrading enzymes (AADE); therefore the aim of this work was to study whether PPAR α regulates the expression of AADE. Male PPAR α null mice were used and age-matched with C57BL6 mice (Wild type, WT) as control group, and were fed diets containing increased amounts of dietary protein (6, 20 or 50 %). RNA was extracted from liver to assess the whole genome expression using microarrays (Mouse Gene 1.0 ST Array, Affymetrix). We found that in WT mice, the gene expression of AADE, such as *Hal*, *Got1*, *Ass1*, *Sdh* and *Uroc1*, was proportional to the increase in dietary protein concentration. In contrast, in PPAR α null mice this effect was absent, even more, we did not observe significant differential gene expression between groups fed with 6 and 50% of protein. Moreover, some AADE such as *Kynu*, *Oat* and *Acmsd*, as well as the transcription factor *Hnf4 α* showed higher gene expression in KO than WT. Network analysis suggest that PPAR α regulates the expression of AADE genes through *Hnf4 α* interaction. Thus, PPAR α functions as a metabolic sensor to preserve amino acids by stimulating fatty oxidation.

 Figures

 References

 Related

 Details



Vol. 27, No. 1 supplement
April 2013

Metrics

Downloaded 0 times

Publication History

Published online 1 April 2013

Dietary protein regulates gene expression of amino acid-degrading enzymes through PPAR α . A. V. Contreras¹, C. Rangel¹, V. Ortiz², G. Aleman², B. Palacios², E. Tejero¹, N. Torres², A. R. Tovar² 1) Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), México DF, México; 2) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, México.

Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α), which is a member of the PPAR family, is a nuclear receptor that functions as a ligand-activated transcription factor in response to dietary signals. The effects of PPAR α ligands, such as fatty acids, have been demonstrated in several tissues, particularly in liver, modulating the expression of enzymes for fatty acid oxidation, but recent evidence suggests that also regulates amino acid oxidation. The amino acid catabolism is regulated by hepatic amino acid-degrading enzymes (AADE), however it is not known whether PPAR α regulates the expression of AADE. Thus, the aim of this work is to study whether PPAR α controls the gene expression of AADE. With this purpose, we use PPAR α null mice and age-matched male C57BL6 mice that were fed diets with 3 different dietary protein concentrations (6, 20 or 50%) in a restricted feeding scheme for 8 days. RNA was extracted from liver to assess the whole genome expression using microarrays (Mouse Gene 1.0 ST Array, Affymetrix), and serum was used to measure glucose, free fatty acids, insulin and glucagon. We found that in WT mice the gene expression of AADE, such as *Histidine ammonia-lyase*, *Glutamic-oxaloacetic transaminase 1*, *Argininosuccinate synthase 1*, *Serine dehydratase* and *Urocanase domain containing 1*, was proportional to the increase in dietary protein concentration. In contrast, in PPAR α null mice this effect was absent, even more, for these genes we did not observed significant differential expression between groups fed 6 and 50% of protein. Moreover, some AADE such as *Kynureninase*, *Ornithine aminotransferase* and *Aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase*, and the *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)* showed higher gene expression on PPAR α null mice than C57BL6 mice. Network analysis suggests that PPAR α regulates the expression of AADE genes through HNF4 α interaction. PPAR α functions as a metabolic sensor to preserve amino acids by stimulating fatty acid oxidation. Amino acids may be spared differently in the body depending of the dietary fat, as well as the type of fatty acids mobilized from adipose tissue.

You may contact the first author (during and after the meeting) at acontreras@inmegen.gob.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

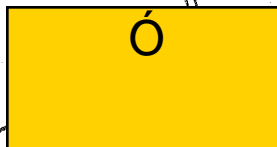
awse

México Cd., Mx a 26 de abril de 2018.

No. Oficio CINVA 050-18

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas

Depto. Fisiología de la Nutrición
Presente.



Estimada Dra. Alemán.:

Por este conducto le informo que su proyecto con título "EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-).", con registro CINVA FNU-50-11-13-1 finalizó en junio 2017. Debido a que el periodo de realización y la prórroga han concluido, le solicito de la manera más atenta favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. Informe final.
2. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



1791 BDE
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

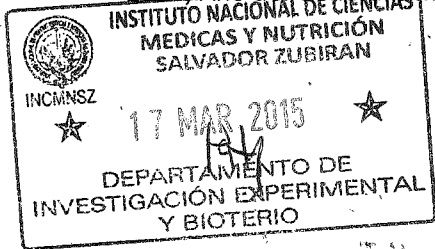
27 ABR 2018

INST. NAL. CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN INCMYN "S.Z."



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"



Acuse

México, D.F., a 12 de Marzo del 2015.

DRA. GABRIELA ALEMÁN ESCONDRILLAS
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente.

REF.: CINVA 50, CLAVE FNU-50-11-13-1

Estimado Dra. Alemán:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-

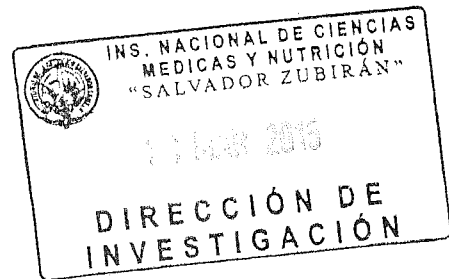
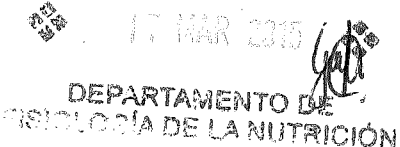
Este comité ha dictaminado **aprobar** la prórroga solicitada hasta el 30 de junio del 2017.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

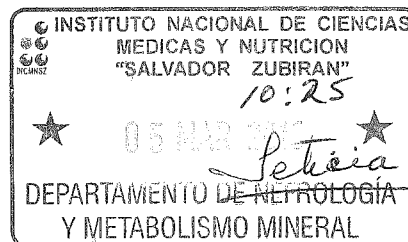
México, D.F. a 5 de Marzo del 2015.

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Presente

Por medio de este conducto me dirijo a usted de la manera más atenta, en respuesta a la carta que me fue enviada el día 4 de marzo de 2015, en la cual se me informa sobre el cierre del proyecto **“EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA DIETARIA EN LA REGULACION GENICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA(-/-)”** con registro CINVA 50 y Clave FNU-50-11-13-1. El motivo de la presente es para solicitar la prórroga para la ampliación del proyecto, quisiera hacer de su conocimiento que no enviamos la debida respuesta a su solicitud ya que dicho documento fue extraviado.

Solicitamos la prórroga para la extensión del proyecto ya que no se cuenta con la cantidad necesaria de ratones knock out del receptor PPAR alpha (PPAR alpha -/-) con la que se esta realizando el proyecto. La falta de producción de ratones se debe a que la colonia se empezó con un corto número de parejas en 2011, y la cantidad de ratones que se obtenían por camada eran de 4, y en el año 2013 se obtuvo una producción casi nula ratones. Por lo que se inicio una retro cruce con los ratones C57BL6 que son el fondo genético de los ratones PPAR alpha (-/-). Se logró extender el número de pies de cría de la colonia pero aún nos encontramos en la etapa de producción, y el inicio del protocolo en estos ratones. Es por esta razón que solicito tome en consideración esta solicitud ya que ha sido un trabajo arduo el obtener nuevamente la producción de ratones y nos es necesario culminar el proyecto con estos ratones.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

Sin más por el momento, aprecio de antemano su apoyo a esta solicitud.

Atentamente,

**Dra. Gabriela Alemán Escondrillas,
Investigador en Ciencias Médicas C
Departamento de Fisiología de la Nutrición**



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Ause

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 4 de Marzo del 2015.

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente

Estimada Dra. Alemán:

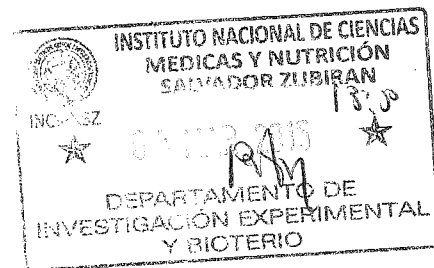
Debido a que no hemos recibido respuesta a la carta que le enviamos el 28 de octubre del 2014, en la cual le informamos que debía solicitar una prórroga o el cierre de su proyecto: "EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-)", con registro CINVA 50, hacemos de su conocimiento que el próximo lunes 9 del presente mes, será cerrado de manera automática.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten signature]

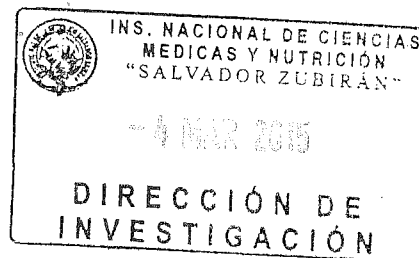
Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



INCMNSZ
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

4 MAR 2015
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN
[Handwritten signature]

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio





Aause

"2014, Año de Octavio Paz"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 28 de Octubre del 2014

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente

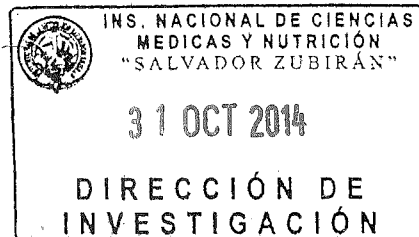
Estimada Dra. Alemán:

Por este conducto le informo que su proyecto: "EFECTO DEL AYUNO Y DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DIETARIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA (HAL) Y LA SERINA DESHIDRATASA (SDH) EN RATONES PPAR ALPHA (-/-) ", con registro CINVA 50 finalizó en el año 2013. Por lo que le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente.

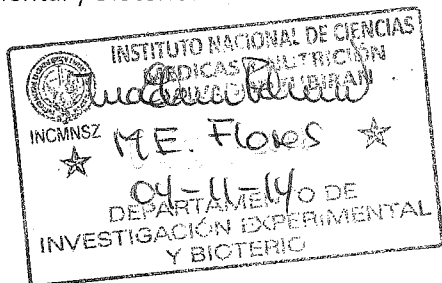
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
c.c.p. Dra. María Elena Flores Carrasco, Encargada del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio.



Nov-3, 2014

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

“2014, Año de Octavio Paz”

Aense

México, D. F., a 23 de Mayo del 2014

INCMSZ
DIRECCIÓN DE NUTRICIÓN

23 MAY 2014

DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN

Graciela P.A.

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas
Investigador en Ciencias Médicas C
Depto. de Fisiología de la Nutrición
Presente.

Estimada Doctora Alemán:

En la pasada reunión de la CINVA se revisó su solicitud para la ampliación del proyecto "Efecto del ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la Histidasa (HAL) y la Serina Deshidratasa (SDH) en ratones PPAR alpha (-/-)", con número de registro CINVA 50M y Clave FNU-50-11-13-1. Para poder proceder con la resolución es necesario que nos indique el tiempo que solicita de la prórroga para la realización de este objetivo, así como una descripción detallada del número de animales que se requerirá, incluyendo edad y sexo, así como, la conformación de los grupos de experimentación, el tipo de alojamiento, duración, tipo de alimento y disposición de cadáveres.



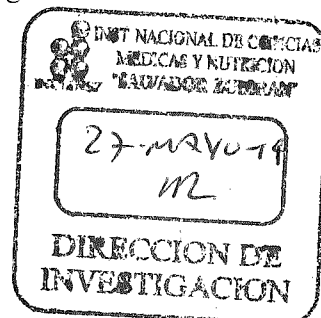
Sin otro particular me despido de usted enviándole un cordial saludo.

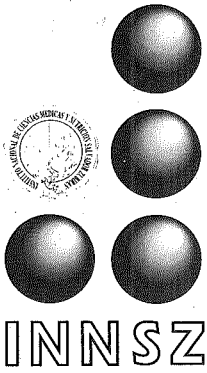
Atentamente,

Norma A. Bobadilla Sandoval

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

ccp: Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpan
México, D. F. 14000
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

24 junio, 2011

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas
Investigador en Ciencias Médicas C
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: "Efecto del Ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la Histidasa (HAL) y la Serina Deshidratasa (SDH) en ratones PPAR Alpha (-/-)"

Registro CINVA: 50
Clave: FNU-50-11-13-1

La Comisión de Investigación en Animales (CINVA), revisó la respuesta a la observaciones emitidas por esta Comisión y se decidió la **APROBACIÓN** para su desarrollo.

Atentamente

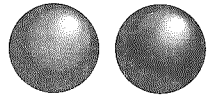
MVZ., M. Sc. Rafael Hernández González
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

ccp. Dr. Rubén Lisker Y.- Director de Investigación
MVZ., M.en C. Octavio Villanueva Sánchez.- Secretario CINVA
Dr. Patricio Santillán Doherty.- Comisión de Investigación en Animales.
MVZ.M.enC. Ma. de la Luz Streber J.- Comisión Investigación en Animales
Dra. Nimbe Torres y Torres.- Comisión de Investigación en Animales

Investigación

Tradición Servicio
Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



INNSZ

"2011, Año del Turismo en México"

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

Abril 08, 2011

Dra. Gabriela Aleman Escondrillas
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.

Estimada Dra. Alemán:

En referencia al proyecto de investigación: "Efecto del Ayuno y de la Concentración de Proteína Dietaria en la Regulación Génica de la Histidasa (HAL) y la Serina Deshidratasa (SDH) en Ratones PPAR Alpha (-/-)".

Registro: **CINVA: 50**
CLAVE:FNU-50-11-13-1

Le solicito amablemente dar respuesta electrónica en el Sistema de Evaluación de Proyectos a las observaciones emitidas por la Comisión de Investigación en Animales (CINVA) para llevar a cabo el dictamen correspondiente.

Atentamente

MVZ. M.Sc. Rafael Hernández González

Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales (CINVA)

Guillermo Ochoa N
14-Abril-2011

Investigación

Tradición

Servicio

Asistencia

Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

No invada las zonas sombreadas

CLAVE: - - / -

FECHA DE RECEPCIÓN: 2011-03-11

TÍTULO: Efecto del Ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la Histidasa (HAL) y la Serina Deshidratasa (SDH) en ratones PPAR Alpha (-/-)

INVESTIGADOR RESPONSABLE: GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS

DEPARTAMENTO O SERVICIO: FISILOGIA DE LA NUTRICION

TIPO DE INVESTIGACIÓN:

- 1. Investigación Clínica
- 2. Investigación Experimental
- 3. Investigación Documental
- 4. Desarrollo Tecnológico
- 5. Investigación Epidemiológica
- 6. Otros

(incluye seres humanos o sus productos biológicos)
(incluye animales de investigación o sus productos biológicos)
(revisión de expedientes, revistas bibliográficas, informe de casos, etc.)
(instrumental, equipo, métodos diagnósticos, drogas nuevas, etc.)
(estudios en poblaciones, en comunidad o en hospital)
(organización de eventos, asistencia a reuniones, congresos, etc.)

PATROCINADORES:

Cantidad:

0	0
0	TOTAL
0	0

Fuente de Apoyo

PERÍODO DE UTILIZACIÓN DE LOS RECURSOS: de mes: 01 año: 2011 a mes: 01 año: 2013

FORMA EN LA QUE SE RECIBIRÁN LOS FONDOS:

Primer año:	0	0	0	0
Segundo año:	0	0	0	0
Tercer año:	0	0	0	0
Cuarto año:	0	0	0	0
Quinto año:	0	0	0	0
	primer trimestre	segundo trimestre	tercer trimestre	cuarto trimestre

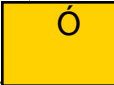
COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN

(ver instrucciones al reverso)

1. Personal:	0
(sueldos y sobresueldos al personal)	
2. Equipos:	0
(de laboratorio, computo, transporte, etc.)	
3. Materiales:	0
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)	
4. Animales:	0
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)	
5. Estudios:	0
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)	
6. Viáticos:	0
(reuniones científicas y trabajo de campo)	
7. Publicaciones:	0
(costos directos de publicación, sobretiraje)	
8. Suscripción:	0
(libros, revistas, software, periódico, etc.)	
9. Varios:	0
(teléfono, fax, fotocopias, mensajería, etc.)	
10. Fondo de Apoyo:	0
(15% de la cantidad total del proyecto)	
TOTAL:	0

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

FIRMAS



Investigador
Responsable

Jefe del Departamento

Comité de
Investigación en Humanos

Comité de
Investigación en Animales

Director de
Investigación

Director General

Fecha de Recepción

CLAVE DEL PROYECTO: FNU-50-11-13-1

NO. DE REGISTRO CINVA: 50

1. TÍTULO DEL PROYECTO:

Efecto del Ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la Histidasa (HAL)

y la Serina Deshidratasa (SDH) en ratones PPAR Alpha (-/-)

2a. IDENTIFICACIÓN DE INVESTIGADORES:

Investigador: GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS

Posición institucional: Investigador en Ciencias Médicas C

Posición en el proyecto: Responsable técnico

Teléfono (ext): 2802

Correo-e: [REDACTED]

Investigador: ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

Posición institucional: INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS F

Posición en el proyecto: Investigador Asociado

Teléfono (ext): 2802

Correo-e: [REDACTED]

Investigador: Guillermo Ordaz Nava

Posición institucional: Químico

Posición en el proyecto: Técnico de laboratorio

Teléfono (ext): 2802

Correo-e: [REDACTED]

Investigador: [REDACTED] OE

Posición institucional: Estudiante de Doctorado

Posición en el proyecto: Estudiante

Teléfono (ext): 2802

Correo-e: [REDACTED]

Investigador: [REDACTED] OE

Posición institucional: Estudiante de Doctorado

Posición en el proyecto: Estudiante

Teléfono (ext): 2802

Correo-e: [REDACTED]



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

SALIR

Clave: FNU-50-11-13-1

Registro: 50

Título del proyecto: Efecto del Ayuno y de la concentración de proteína dietaria en la regulación génica de la Histidasa (HAL) y la Serina Deshidratasa (SDH) en ratones PPAR Alpha (-/-)

INVESTIGADOR	POSICIÓN INSTITUCIONAL	POSICIÓN EN EL PROYECTO	EXTENSIÓN	CORREO-E
GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS	Investigador en Ciencias Médicas C	Responsable técnico	2802	
ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MEDICAS F	Investigador Asociado	2802	
Guillermo Ordaz Nava	Químico	Técnico de laboratorio	2802	
	Estudiante de Doctorado	Estudiante	2802	
	Estudiante de Doctorado	Estudiante	2802	

2b. PERTINENCIA DEL GRUPO DE INVESTIGADORES CON RESPECTO DEL PROYECTO

Dra. Gabriela Alemán Escondrillas: Doctorado en Ciencias Biomédicas, 17 años de experiencia en investigación. Nivel en Sistema Nacional de Investigadores (SNI): 1. Investigadora en Ciencias Médicas "C" del Depto. de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ. Dr. Armando R. Tovar Palacio: Doctorado en Ciencias, 30 años de experiencia en investigación. SNI 3 Investigador en Ciencias Médicas "F" y jefe del Depto. de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ.

3. INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ). Vasco de Quiroga No. 15, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, México, D.F., C.P. 14000.

4. PATROCINIO

4a. ORGANISMOS PATROCINADORES

El proyecto será sometido a la convocatoria de Investigación Científica Básica 2011 de Conacyt.

4b. ESPECIFICAR SI LOS INVESTIGADORES RECIBEN PAGO(MONETARIO O EN ESPECIE) POR SU PARTICIPACIÓN ESPECÍFICA EN LA INVESTIGACIÓN

No aplica

5. MARCO TEÓRICO

a) ANTECEDENTES : El consumo de proteína en la dieta tiene como propósito principal el proveer aminoácidos que son utilizados principalmente para sintetizar proteínas en el organismo las cuales tienen múltiples funciones. Los aminoácidos son utilizados para sintetizar moléculas pequeñas como pueden ser algunos neurotransmisores, síntesis de compuestos como los grupos hemo, bases nitrogenadas, aminoácidos dispensables, entre otros (39, 43). Debido a que no existe un almacén "verdadero" de proteínas, el exceso de aminoácidos consumidos a través de la dieta debe eliminarse. Por otro lado, todas las proteínas tienen funciones biológicas específicas, por lo que el catabolismo de las proteínas es una actividad no deseable en el organismo debido a que destruir a una proteína significa destruir funcionalidad celular. Se conoce que existe un recambio continuo de proteínas, que en algunos casos es rápido mientras que en otros es lento (20). Sin embargo, bajo condiciones de restricción alimentaria, se podría acelerar el catabolismo de aminoácidos provenientes de las proteínas intracelulares, pero este proceso debe disminuir para no catabolizar las proteínas corporales. Estos hallazgos sugieren que deben existir mecanismos en el organismo capaces de eliminar el exceso de proteína cuando ésta se consume en cantidades por arriba de lo requerido, ya que no se almacena, mientras que por otro lado se debe prevenir el catabolismo de aminoácidos cuando el consumo de proteína dietaria está restringida o el organismo se encuentra en estado de ayuno. Se conoce que en la primera etapa del ayuno, se reduce la síntesis de proteínas musculares y se incrementa la proteólisis que permite la liberación de los aminoácidos, especialmente alanina y glutamina. Los mamíferos se adaptan a la falta de alimento movilizándolo sus reservas de lípidos y limitando la velocidad de utilización de la proteína corporal. Durante un ayuno prolongado esta adaptación termina con un incremento progresivo en la utilización de proteína [3, 4]. Este estado metabólico es reversible si los animales vuelven a alimentarse, si no lo hacen estarán próximos a la muerte [1]. Cabe mencionar que diversos estudios realizados en ratas y en humanos muestran que entre más tejido adiposo haya en el organismo, mayor será su capacidad de conservar proteína y sobrevivir por un tiempo más prolongado al ayuno [3-5]. ¿Qué provoca la reducción de la proteólisis muscular para dar paso a la oxidación de ácidos grasos como fuente de energía en el ayuno prolongado? ¿Qué señal es la encargada de "comunicar" al músculo esquelético que debe reducir su catabolismo? Hasta el momento no existe información clara al respecto. El control del catabolismo de los aminoácidos lo ejercen las enzimas involucradas en su oxidación, a quienes se les conoce como enzimas degradadoras de aminoácidos. Existe una enzima degradadora para cada aminoácido con la excepción de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). La mayor parte de las enzimas degradadoras de aminoácidos se localizan principalmente a nivel del hígado; y estudios previos han demostrado que la actividad de estas enzimas aumenta cuando se consumen dietas con un alto contenido de proteína (39). Sin embargo pocos hallazgos se han obtenido sobre la regulación de la expresión de estas enzimas. Estudios en nuestro grupo han tomado como modelo de estas enzimas a la histidina amonio liasa, también conocida como histidasa (HAL), la cual cataliza la desaminación oxidativa de la histidina para formar ácido urocánico. Este compuesto es posteriormente metabolizado formando formimino tetrahidrofolato y glutamato. La histidasa es una enzima cuya expresión génica aumenta cuando la concentración de proteína en la dieta incrementa (40), o cuando se consume una dieta desequilibrada en su patrón de aminoácidos (38), y por otro lado disminuye cuando ocurren cambios en el estado nutricional, como en la desnutrición energético-proteica (41), o en estados catabólicos (5). Se ha demostrado que los cambios en la expresión y actividad de la histidasa correlacionan positivamente con la concentración de proteína en la dieta y con la concentración plasmática de glucagón. El tratamiento con hormonas como glucagón y glucocorticoides (2) regulan la expresión del gen de la HAL. Recientemente la región promotora del gen de la HAL fue aislada, y los estudios funcionales mostraron que ésta contiene elementos de respuesta para su activación via Protein cinasa A (PKA) o protein cinasa C (PKC). Se determinó la posible presencia de dos elementos de respuesta para el factor de transcripción denominado receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Recientemente, estudios hechos en nuestro laboratorio mostraron que al alimentar ratas con 0.1% de Wy 14643, ligando del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) disminuye la expresión del gen de la HAL. Más aún, se probó que uno de los PPAR α presentes en este gen es funcional in vivo (fig.2) (datos no publicados). Por otro lado, se observó por medio de un análisis computacional que en las regiones 5' de varios genes de otras enzimas degradadoras de aminoácidos (serina deshidratasa, tirosina aminotransferasa, alanina aminotransferasa, fenilalanina hidroxilasa) tienen PPAR α s. También,

Edgar y cols. (12) encontraron que en ratones tratados con fibratos, ligandos de PPAR α , se regula el metabolismo de aminoácidos reprimiendo la expresión de genes como el de la alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa. Además, Kersten y cols. (17) utilizando la técnica de microarreglos para localizar genes que estuvieran regulados por PPAR α , encontraron que en ratones PPAR α (-/-) en ayuno se incrementa la expresión de ARNm de genes involucrados en las principales rutas del metabolismo de aminoácidos (16). Todos estos datos nos indican que es probable que PPAR α sea en parte el responsable del "interruptor" metabólico entre lípidos y proteínas en condiciones de ayuno.

RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS: Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (que incluyen a los receptores de hormona tiroidea (TR), ácido retinoico (AR), vitamina D) (14). Los PPARs reconocen preferencialmente una secuencia AGGTCA como elemento de respuesta en el ADN donde se unen y activan su transcripción. Los PPARs se caracterizan por su capacidad para formar heterodímeros con el receptor de ácido retinoico 9-cis (RXR). De hecho, los PPARs no se unen al ADN como homodímeros o monómeros sino que dependen de RXR como pareja para lograr la unión a los elementos de respuesta para PPARs (PPRE) (11). Existen tres isotipos de PPARs que se conocen en la actualidad, el PPAR α que se expresa principalmente en hígado, el PPAR γ que se expresa preferencialmente en tejido adiposo y el PPAR δ está distribuido en varios tejidos, pero se localiza principalmente en el músculo. En el hígado de las ratas, la expresión de PPAR α se regula positiva y negativamente por glucocorticoides e insulina, respectivamente (22, 35). Se ha observado que la concentración de ARNm y proteína se relaciona directamente con el ritmo circadiano de los glucocorticoides circulantes. Situaciones de estrés o ayuno, que inducen la secreción de glucocorticoides, también incrementan la concentración de PPAR α en hepatocitos (21). Se ha reportado recientemente que los ratones transgénicos deficientes en PPAR α desarrollan obesidad e hipertrigliceridemia en ausencia de hiperfagia (10). En este mismo tipo de ratones (PPAR α -/-) se probó que un período corto de ayuno produce esteatosis, acumulación miocárdica de lípidos e hipoglicemia, con una respuesta cetogénica inadecuada, además de que no se activa la expresión de genes de enzimas mitocondriales como la acil-CoA deshidrogenasa, carnitina palmitoil transferasa I) y extramitocondriales como la acil-CoA oxidasa, citocromo P450 4A3, mientras que en ratones (PPAR α +/+) en condiciones de ayuno los genes de estas enzimas son inducidas de manera importante (23). Por lo tanto PPAR α también juega un papel importante en los cambios adaptativos durante el ayuno. PPAR α se activa principalmente por ácidos grasos que actúan como ligandos endógenos que inducen la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos para mantener el balance de lípidos celulares en el hígado. Además, durante el ayuno también ocurre una inducción de la expresión de PPAR α para oxidar los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo (17, 23). PPAR α regula la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la proliferación peroxisomal y en la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas y mitocondrias. Algunos de los genes que responden a PPAR α incluyen a la Acil-CoA sintetasa, la acil-CoA oxidasa, acil-CoA deshidrogenasa y la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1) (4), así como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) (33, 37) y la piruvato cinasa (PK), aunque el mecanismo de este último aún se desconoce debido a que PPAR/RXR no interactúa directamente con el gen de PK (28). Además, genes que codifican para apolipoproteínas AI, AII y CIII también son alterados por PPAR α sugiriendo un papel de PPAR α en la regulación del metabolismo de lipoproteínas (30). También se conoce que la actividad de PPAR depende de la presencia de coactivadores y corepresores específicos. Los más descritos son PGC1 α y β (coactivador de PPAR 1- α y β), SRC-1 (coactivador del receptor de esteroides 1), PBP (Proteína de unión a PPAR), CBP/p300 (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc/p300), entre otros. Los complejos de coactivadores y corepresores poseen diferentes actividades enzimáticas (como acetilasa, desacetilasa, metilasa, desmetilasa y cinasa) cuyo blanco es la cromatina, componentes de la maquinaria basal de transcripción y otros coactivadores y corepresores. El reclutamiento y desplazamiento orquestado de los coactivadores y corepresores lleva a la descompactación de la cromatina y al ensamblaje del complejo de preiniciación en los promotores. La respuesta de la transcripción está influenciada por la estructura del ligando, el PPRE, la estructura del promotor y la expresión de coactivadores y corepresores en cada tipo celular (Lefebvre, 2006). PPAR α también interfiere negativamente con otras rutas de señalización como AP1, NF- κ B y C/EBP (Delerive 1999, Staels 1998, Cervois 2001). Recientemente, se encontró que la sobreexpresión del factor de transcripción FoxO1 (forkhead box 1) incrementa la expresión de genes de la oxidación de aminoácidos como HAL y TAT, al realimentar ratones con una dieta alta en hidratos de carbono después de 24 horas de ayuno (Zhang, 2006). Qu y cols. (Qu, 2006) mostraron que PPAR α

interactúa físicamente, pero antagonizando con FoxO1 en la expresión hepática de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. Se ha reportado la posible interacción directa entre PGC-1 y FoxO1 en la regulación de genes gluconeogénicos, pero esta información es controvertida (Shilling, 2006; Puigserver, 2003). Estos datos nos sugieren que es probable que la capacidad de PPAR α de regular positivamente a los genes propios de la oxidación de ácidos grasos y negativamente a los de la oxidación de aminoácidos, se deba a una diferente combinación de coactivadores, corepresores e interacción con las rutas de señalización dependiendo de la señal recibida por la célula. b) Definición del problema: Los mamíferos se adaptan a la falta de alimento movilizándolo sus reservas de lípidos y limitando la velocidad de utilización de la proteína corporal. Durante un ayuno prolongado esta adaptación termina con un incremento progresivo en la utilización de proteína. Este estado metabólico es reversible si los animales vuelven a alimentarse, si no lo hacen estarán próximos a la muerte. Cabe mencionar que diversos estudios realizados en ratas y en humanos muestran que entre más tejido adiposo haya en el organismo, mayor será su capacidad de conservar proteína y sobrevivir por un tiempo más prolongado al ayuno. Los mecanismos y señales moleculares involucradas en la utilización de nutrimentos en condiciones de estrés (como el ayuno) no están bien descritos. c) Justificación: Los estudios relacionados con la regulación del metabolismo de aminoácidos son muy escasos. Se sabe que PPAR α es capaz de regular positivamente la oxidación de ácidos grasos, y existen datos que sugieren que este factor de transcripción regula negativamente la oxidación de aminoácidos durante el ayuno. Por lo tanto, resulta interesante saber el efecto de diferentes tipos de dieta y del ayuno en ratones que carecen del factor de transcripción PPAR α , ya que esto puede ayudar a entender de qué manera se regula la utilización de nutrimentos durante el ayuno, y particularmente si este factor es el responsable de dar la señal que indica que el organismo debe conservar la proteína corporal y utilizar los ácidos grasos como fuente de energía.

6a. HIPÓTESIS

La expresión de genes involucrados en la oxidación de aminoácidos incrementará conforme se incrementa la concentración de proteína dietaria, así como con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados en ratones PPAR α (-/-). Después de un periodo de 6 horas de ayuno, la expresión de genes involucrados en la oxidación de aminoácidos se verá disminuida en el hígado de ratones PPAR α (-/-).

6b. OBJETIVOS

Determinar los cambios metabólicos que ocurren en la oxidación de aminoácidos en el hígado de ratones PPAR α (-/-) en respuesta a diferentes concentraciones de proteína dietaria y/o una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados o saturados, así como en ayuno de 6 horas. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1. Evaluar el efecto de una dieta rica en grasa saturada o poliinsaturada y/o con diferentes concentraciones de proteína en la expresión de genes involucrados en la oxidación de aminoácidos regulados por PPAR α . 2. Evaluar el efecto del ayuno en la expresión de genes involucrados en la oxidación de aminoácidos regulados por PPAR α .

7. METODOLOGÍA: DISEÑO GENERAL

a) Diseño del estudio: El estudio será controlado, y se utilizarán un total de 126 ratones transgénicos macho (PPAR α (-/-)) y 126 ratones de la cepa C57BL6 como control que serán mantenidos en el Bioterio del INCMNSZ a una temperatura de 22 °C y ciclos de luz - oscuridad de 12 horas cada uno. La humedad relativa requerida, en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (27) será de 40 a 70%. Se dividirán en 3 grupos de 42 ratones transgénicos y 42 ratones C57BL6 cada uno, con diferencia de 3 semanas entre cada grupo. Los ratones se mantendrán en microaisladores con cama de aserrín y acceso a agua y alimento ad libitum a una densidad de no más de 5 ratones por cada uno. Para el desarrollo de este protocolo se formarán los siguientes grupos: 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 alimentados por 2 semanas con una dieta con un contenido de 6% de caseína (baja en proteína), 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 20% de caseína (adecuada en proteína) y 10 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 50% de caseína (alta en proteína). las 3 dietas con un contenido de grasa de 5% en forma de aceite de maíz (adecuado). Una vez terminado el tiempo de alimentación, se dividirá cada uno de los grupos

en 2 subgrupos de 7 ratones cada uno el primero seguirá recibiendo su misma alimentación y el segundo se mantendrá en ayuno por 6 horas. • 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 por 3 semanas con una dieta con un contenido de 6% de caseína (baja en proteína), 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 20% de caseína (adecuada en proteína) y 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 50% de caseína (alta en proteína), las 3 dietas con un contenido de 10% de grasa saturada (manteca de cerdo) y 5% de aceite de maíz. Una vez terminado el tiempo de alimentación, se dividirá cada uno de los grupos en 2 subgrupos de 7 ratones cada uno: el primero seguirá recibiendo su misma alimentación y el segundo se mantendrá en ayuno por 6 horas. • 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 alimentados por 3 semanas con una dieta con un contenido de 6% de caseína (baja en proteína), 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 20% de caseína (adecuada en proteína) y 14 ratones PPAR α (-/-) y 14 ratones C57BL6 con 50% de caseína (alta en proteína), las 3 dietas con un contenido de 10% de grasa poliinsaturada (aceite de soya) y 5% de aceite de maíz. Una vez terminado el tiempo de alimentación, se dividirá cada uno de los grupos en 2 subgrupos de 7 ratones cada uno: el primero seguirá recibiendo su misma alimentación y el segundo se mantendrá en ayuno por 6 horas. Para cada grupo, se utilizarán dietas que contengan la proporción adecuada de hidratos de carbono simples y complejos en una relación 1:1. Las vitaminas y minerales serán cubiertos de acuerdo a los requerimientos del ratón. Todos los grupos serán alimentados ad libitum. Brevemente, ratones macho de la cepa C57BL6, así como ratones transgénicos PPAR α (-/-) de 6 semanas de edad corporal se alimentarán con la dieta correspondiente a su grupo durante 2 semanas. Se obtendrá el hígado de cada uno de las ratones para aislar el ARN total para cuantificar por análisis de PCR en tiempo real la expresión de los genes: TAT, HAL, PPAR α , CPT-1, PEPCCK, PGC-1 α y -1 β . Por otro lado, se obtendrá el suero de cada uno de los animales para cuantificar los niveles de insulina, glucagón, glucosa, y urea. También se determinarán cambios en la cantidad de proteína presente con cada tratamiento para PPAR α y PGC-1 α y -1 β mediante la técnica de Western Blot. b) Descripción de la maniobra o intervención: Durante las dos semanas de estudio se registrará diariamente el consumo de alimento y el peso corporal de los animales. Para la obtención de muestras tejidos, se practicará eutanasia por exanguinación por punción cardíaca previa inmovilización con dióxido de carbono. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (27), los gases nitrógeno y argón, al igual que el dióxido de carbono (CO₂) son eutanásicos, no anestésicos, los cuales producen hipoxia cerebral y consecuente inconciencia. La posterior exanguinación se llevará a cabo una vez que se haya cerciorado de la real inconciencia del animal. La fuente de CO₂ es un cilindro de gas comprimido y se liberará en una pequeña cámara cerrada, pues se desea obtener tejidos que no tengan contaminación química que alteren los resultados de nuestras determinaciones, así como para obtención de un volumen adecuado de sangre para determinaciones de glucagón, insulina y glucosa y urea, ya que según la norma mencionada es un medio para obtener tejidos y fluidos corporales libre de contaminación química y/o tejido cerebral íntegro. Se obtendrá el volumen total de sangre, del cual se separará el suero por centrifugación y se almacenará a -80° C para futuras determinaciones de niveles de glucagón, insulina, glucosa y urea. Después de la obtención de sangre, se obtendrán muestras de hígado mediante una excisión quirúrgica una vez practicada la eutanasia del ratón. Todos los tejidos se mantendrán a -80° C hasta la fecha de su utilización, para extracción de RNA total y de extractos nucleares para western blot. c) Tamaño de la muestra: Se utilizarán un total de 126 ratones transgénicos (PPAR α (-/-)) y 126 ratones C57BL6. El cálculo del número de muestra n se realizó según la ecuación de muestras independientes: $n = 2S^2 (\alpha + \beta)^2 / \Delta^2$ En donde: S= Desviación estandar. Se utilizaron datos obtenidos en un estudio previo realizado en el Departamento de Fisiología de la Nutrición usando la concentración de colesterol en suero en ratones control y alimentados con una dieta alta en colesterol (2%) con un valor de +39 mg/dl. Δ = Diferencia mínima entre la concentración de colesterol en suero esperada entre los grupos control y alimentados con una dieta alta en colesterol con un valor de 60 mg/dl. α = 0.05 (Tasa de error) β = 0.8= 80% (Poder de la prueba) $Z\alpha + Z\beta$ = 1.96 + 0.84 (Constantes) $n = 2(39)^2 (1.96 + 0.84)^2 (60)^2 / n \geq 6.6$ Con base en lo anterior se necesita utilizar un número promedio de 7 ratones por grupo. d) Mecanismos de asignación del tratamiento: Los animales se dividirán en 3 grupos de 42 ratones transgénicos y 42 ratones C57BL6 cada uno, con diferencia de 3 semanas entre cada grupo. La distribución se hará de manera aleatoria. e) Grupos de tratamiento: Los grupos se encuentran descrito dentro del diseño del estudio, y aquí describiremos las diferentes dietas que se utilizarán durante el estudio: Las dietas están compuestas en porcentaje por: caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad) 6, 20, o 50%, aceite de maíz 5%, o aceite de soya 10%, o manteca (10%), mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Teklad) 5%, mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan-Teklad) 1%,

citrato de colina (Harlan-Teklad) 0.165 % y dextrosa anhidra y almidón de maíz (Droguería Cosmopolita) en una proporción 1:1 para completar el 100% de la dieta. A las dietas con un contenido de 6% caseína (baja proteína), se les agregarán 0.9% de metionina y 1.8% de treonina, ya que éstos son aminoácidos limitantes en las ratas. Los animales tendrán libre acceso a la dieta y al agua. Las dietas balanceadas están basadas en las recomendaciones reportadas (Nutrition Research Council, 1995) sobre los requerimientos nutricionales de los ratones de laboratorio, incluyendo vitaminas y nutrimentos inorgánicos. A continuación se muestran las "recetas" para cada una de las dietas que serán utilizadas durante el estudio, así como la composición de las mezclas de vitaminas y nutrimentos inorgánicos utilizadas.

Ingredientes	g/Kg	g/Kg	g/Kg
CASEINA	66.08	220.26	550.66
VITAMINAS	10	10	10
MINERALES	50	50	50
ACEITE MAIZ	50	50	50
COLINA	1.65	1.65	1.65
ALMIDON	408.14	334.04	168.84
DEXTROSA	408.14	334.04	168.84
METIONINA	2	0	0
TREONINA	4	0	0

Ingredientes 6% 20% 50% g/Kg g/Kg g/Kg CASEINA 66.08 220.26 550.66 VITAMINAS 10 10 10 MINERALES 50 50 50 Ac. SOYA o MANTECA 100 100 100 COLINA 1.65 1.65 1.65 ALMIDÓN 383.14 309.04 143.84 DEXTROSA 383.14 309.04 143.84 METIONINA 2 0 0 TREONINA 4 0 0 1000.00 1000.00 1000.00 Mezcla de nutrimentos inorgánicos (g/kg) Calcio 5.914 Fósforo 3.943 Potasio 4.929 Sodio 4.929 Cloro 7.607 Azufre 0.676 Magnesio 0.492 Yodo 0.002 Hierro 0.052 Cobre 0.0311 Molibdeno 0.0197 Zinc 0.0006 Flúor ----- Mezcla de vitaminas (g/kg) Ácido nicotínico 3 Pantoteinato de Calcio 1.6 Piridoxina 0.7 Tiamina 0.6 Riboflavina 0.6 Acido fólico 0.2 Biotina 0.02 Cianocobalamina 2.5 Acetato de DL-alfa tocoferilo 15 Palmitato de vitamina A 0.8 Colecalciferol 0.2 Filoquinona (vitamina K) 0.075 Sacarosa 974.705 Las dietas se administrarán durante 2 semanas, con vía de administración oral, empleando comederos individuales de acero inoxidable con tapadera con una capacidad de 200 g. Con estas dietas se cubren los requerimientos de proteína y de grasa de los ratones en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, pues el porcentaje de proteína que contienen es del 20% (los valores mostrados ya están ajustados de acuerdo a la pureza del producto que se emplea como fuente de proteína), mientras que el de grasa es del 5%. Las dietas experimentales contendrán un bajo contenido de proteína (6%), o un alto contenido de proteína (50%), además del adecuado (20%). El alimento cumplirá con las siguientes características: a) Estará libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. b) Estará dentro de su periodo de caducidad. c) Se almacenará en un lugar seco y ventilado en un contenedor especial. Agua: potable, en bebederos individuales de cristal con capacidad de 500 ml. Se mantendrán las 24 horas del día y durante las 2 semanas de estudio, para que los animales tengan acceso a ella a libre demanda. La cantidad a mantener en cada bebedero será de 250 ml diariamente. f) Duración del seguimiento individual: El seguimiento será de 2 semanas de estudio.

8. METODOLOGÍA: CRITERIOS DE SELECCIÓN

Se eliminarán del estudio los animales cuyo consumo y ganancia de peso sean insuficientes comparando con los demás integrantes del mismo grupo, o bien presenten pérdida rápida de peso, así como aquellos que presenten problemas de salud corroborado por el médico veterinario encargado del Bioterio, tales como diarrea debilitante o letargia y recumbencia persistentes.

9. METODOLOGÍA: DESEÑOS Y VARIABLES

a, b y c) Se registrará diariamente el peso corporal y consumo de alimento de los animales. Una vez terminado el estudio y después de llevar a cabo la eutanasia de los animales, obteniéndose el hígado y la sangre se realizarán las siguientes mediciones: La concentración de insulina y glucagon en suero se determinarán por medio de un kit ELISA (Alpco diagnosis) y el producto colorimétrico generado durante la reacción será cuantificado en un espectrofotómetro de placas a 450 nm con una lectura de referencia de 650 nm. La concentración de glucosa se determinará por el método de la glucosa oxidasa por medio de un autoanalizador YSI 2700. Extracción de ARN total: Se aislará RNA total de hígado por homogenización en tiocianato de guanidina y ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (13). Para comprobar integridad, 10µg de RNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1%/formaldehído 2,2 M. Cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real: A partir de 300 ng de ARN total se cuantificará la concentración relativa de ARNm de HAL, TAT, CPT-1, PEPCCK, PPARα, PGC-1α y -1β usando la combinación de reactivos para RT-PCR y PCR en un paso (One-Step RT-PCR, Master Mix) con ensayos fluorogénicos TaqMan en un equipo de detección de secuencias (SDS ABI PRISM 7000, Applied Biosystems). Se determinará el umbral de corte (Ct) en la

curva de amplificación y se analizará con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores obtenidos serán normalizados dividiéndolos entre el valor de amplificación del ARN 18S en cada reacción. Inmunoprecipitación y Western Blot. Los hígados obtenidos serán homogenizados con un buffer de lisis para obtener las proteínas citoplasmáticas. 250 µg de las proteínas hepáticas serán inmunoprecipitadas con 3 µg del anticuerpo específico para PPAR α , acoplados a un conjugado de proteína A por toda la noche. El inmunoprecipitado será lavado tres veces con buffer de lisis y se calentará por 5 min con Buffer Laemmli. El sobrenadante obtenido será separado en un gel SDS-PAGE al 10% y transferido a una membrana de nitrocelulosa. El western blot se realizará empleando anticuerpos específicos para PPAR α , PGC-1 α y -1 β . d) Se eliminarán del estudio los animales cuyo consumo y ganancia de peso sean insuficientes comparando con los demás integrantes del mismo grupo, o bien presenten pérdida rápida de peso, así como aquellos que presenten problemas de salud corroborado por el médico veterinario encargado del Bioterio, tales como diarrea debilitante o letargia y recumbencia persistentes. e) Los resultados se expresarán como la media de cada grupo. Las diferencias entre los valores de ganancia de peso, ingestión de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales, serán evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un nivel de significancia de $p < 0.05$. La diferencia significativa entre los grupos control y problemas será determinada mediante la prueba de Fisher usando el programa StatView (Abacus Concepts) para Macintosh.

10. RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO

No aplica

11. COSTOS

No aplica

12. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alemán G, Ortiz VM, Laagley E, Torres N, and Tovar AR. Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat hepatocytes and human hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 172-179, 2005.
2. Alemán G, Torres N, Bourges H, and Tovar AR. Regulation of histidase gene expression by glucagon, hydrocortisone and protein-free/high carbohydrate diet in the rat. *Life Sci* 63: 16663-11672, 1998.
3. Alemán G, Tovar AR, and Torres N. Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina. *Revista de Investigación Clínica* 56: 351-367, 2004.
4. Aoyama T, Peters JM, Iitani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, and Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α deficient mice. *J Biol Chem* 273: 5678-5684, 1998.
5. Ascencio C, Tovar AR, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, and Torres N. Hepatic histidase and muscle branched chain aminotransferase gene expression in experimental nephrosis. *Life Sci* 67: 2775-2784, 2000.
6. Ausubel FM, Bret R, and Kingston RE. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, 1994.
7. Barish CD, Narkar VA, and Evans RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 591-597, 2006.
8. Chomczynski P and Sacchi N. Single step method for RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
9. Clarke SD, Thuillier P, Baillie R, and Sha X. Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr* 70: 566-571, 1999.
10. Costet P, Legendre C, More J, Edgar A, Galtier P, and Pineau T. Peroxisome proliferator-activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem* 273: 29577-29585, 1998.
11. Desvergne B and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Nuclear Control of Metabolism*. *Endocrine Rev* 20: 649-688, 1999.
12. Edgar AD, Tomkiewicz C, Costet P, Legendre C, Aggerbeck M, Bouguet J, Staels B, Guyomard C, Pineau T, and Barouki R. Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor α -dependent pathway. *Toxicol Lett* 98: 13-23, 1998.
13. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, and Puigserver P. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183, 2001.
14. Issemann I and Green S. Activation of a member of the steroid receptor hormone superfamily by peroxisome

- proliferators. *Nature* 347: 645-650, 1990. 15. Jungas RL, Halperin ML, and Brosnan JT. Quantitative analysis of amino acid oxidatin and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* 72: 419-448, 1992. 16. Kersten S, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B, and Wahli W. The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB J* 15: 1971-1978, 2001. 17. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498, 1999. 18. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Ryosuke N, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita R, Ezaki, O., Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, and Kadowaki T. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell* 4: 597-609, 1999. 19. Lawrence JW, Li Y, Chen S, DeLuca JC, Berger JP, Umbenhauer DR, Moller DE, and Zhou C. Differential gene regulation in human versus rodent hepatocytes by peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Biol Chem* 276: 31521-31527, 2001. 20. Lehninger AL, Nelson DL, and Cox MM. *Amino Acids and Peptides*. In: *Principles of Biochemistry* (Second ed.). New York: Worth Publishers, 1993. 21. Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, and Auwerx J. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 271: 1764-1769, 1996. 22. Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, and Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene by glucocorticoids. *J Biol Chem* 269: 24527-24530, 1994. 23. Leone TC, Weinheimer CJ, and Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: The PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7473-7478, 1999. 24. Lin J, Handschin C, and Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism* 1: 361-370, 2005. 25. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta (PGC1 beta), a novel PGC-1 related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* 277: 1645-1648, 2002. 26. Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, and Spiegelman BM. PGC-1 beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* 278: 30843-30848, 2003. 27. Munro HN. Free amino acid pools and their regulation. In: *Mammalian Protein Metabolism*, edited by Munro HN. New York: Academic Press, 1970, p. 299-386. 28. Pan DA, Mater MK, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, and Jump DB. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription. *J Lipid Res* 41: 742-751, 2000. 29. Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Soon Tan N, Havekes LM, Koenig W, Marz W, Tafuri S, Wahli W, Muller M, and Kersten S. PPAR α governs glycerol metabolism. *J Clin Invest* 114: 94-103, 2004. 30. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, and Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α deficient mice. *J Biol Chem* 272: 27307-27312, 1997. 31. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, and Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998. 32. Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, and Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPAR-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4012-4017, 2003. 33. Schoonjans K, Staels B, and Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 905-925, 1996. 34. Shay NF, Ponder TM, Reddy BA, McCracken BA, and Gaskins HR. Regulation of glucagon synthesis by nutrients in the aTC9 pancreatic alpha cell line. *FASEB J* 8: A55-A60, 1994. 35. Steineger HH, Sorensen HN, Tugwood JD, Skrede S, Spydevold O, and Gaurvik KM. Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells - hormonal modulation of fatty acid induced transcription. *Eur J Biochem* 225: 967-974, 1994. 36. Tabor H and Mehler AH. Histidase and Urocanase. In: *Methods in Enzymology*, edited by Colowick SP and Kaplan NO. New York: Academic Press, 1955, p. 228-231. 37. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, and Spiegelman BM. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15: 351-357, 1995. 38. Torres N, Berstein L, Bourges H, and Tovar AR. Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats. *J Nutr* 129: 1979-1983, 1999. 39. Torres N, Bourges H, and Tovar AR. Regulación de la expresión génica por nutrientes. *Arch Lat Nutr* 46: 89-96, 1996. 40. Torres N, Martínez L, Alemán G, Bourges H, and

Tovar AR. Histidase expression is regulated by dietary protein at the pretranslational level in rat liver. *J Nutr* 128: 818-824, 1998. 41. Tovar AR, Santos A, Halhali A, Bourges H, and Torres N. Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats. *J Nutr* 128: 1631-1635, 1998. 42. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant C, Stafford J, Kahn CR, and Granner DK. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138, 2001. 43. Young VR and J.S. M. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* 51: 270-289, 1990.

[Sigüiente >>>](#)

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FISICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**