

## Regulación de la expresión génica por nutrientes

Nimbe Torres<sup>1</sup>, Héctor Bourges<sup>2</sup> y Armando R. Tovar<sup>3</sup>

Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Instituto de la Nutrición «Salvador Zubirán» México, D.F.

**RESUMEN.** Los nutrientes pueden, de manera directa o indirecta, regular la vía de expresión de genes que codifican para proteínas, principalmente enzimas involucradas en las rutas metabólicas relacionadas con la utilización de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos. Estos nutrientes pueden actuar directamente o generar un estado hormonal específico en el organismo que regulen algunos genes. La presente revisión tiene como objetivo mostrar ejemplos específicos de regulación dietaria y hormonal de genes de enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono (fosfoenol piruvato carboxikinasa), lípidos (enzima málica) y aminoácidos (serina deshidratasa).

**SUMMARY.** Regulation of gene expression by nutrients. Nutrients can regulate, directly or indirectly, the pathway of expression of genes coding for enzymes involved in metabolic pathways related to the utilization of carbohydrates, lipids and amino acids. On the other hand, nutrients such as carbohydrates, lipids or amino acids can generate a specific hormonal state in the organism, and hormones are the mediators throughout which some genes are activated. The objective of the present review is to show some specific examples of dietary and hormonal regulation of enzyme genes involved in the metabolism of carbohydrates (phosphoenol pyruvate carboxykinase), lipids (malic enzyme) and amino acids (serine dehydratase).

### INTRODUCCION

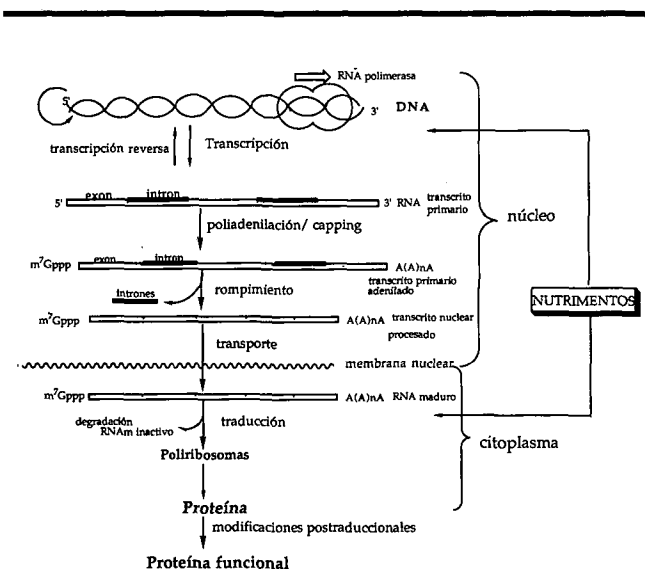
La forma en que se expresa un gen es el resultado de una continúa interacción entre la información genética y el ambiente (1). Esta interacción es muy variable en un individuo dado ya que, si bien la información genética no cambia, el ambiente si lo hace y en forma pronunciada, particularmente en lo que se refiere a la dieta cuya variabilidad en composición, cantidades y horarios es enorme. Los alimentos ingeridos se digieren y los nutrientes se absorben, se distribuyen en el organismo, se metabolizan en cada célula y sus derivados o los mismos nutrientes se excretan; todos estos procesos (digestión, absorción, transporte, metabolismo y excreción) están controlados a nivel genético en el que a su vez existe variación entre individuos y entre poblaciones con diferente trasfondo evolutivo (2). No obstante, se observa generalmente una misma respuesta metabólica, común para la especie, que hace posible la homeostasis. Es por lo tanto necesario conocer en detalle los mecanismos de interacción directa entre los nutrientes y los genes y de la interacción indirecta que puede ocurrir a través de cambios hormonales originados por la dieta, conocimiento indispensable para el avance de la nutriología y, por supuesto, para diseñar intervenciones frente a problemas metabólicos.

Con los avances recientes de la Biología Molecular se ha desarrollado una nueva área de Nutrición denominada «Nutriología Molecular», cuyos objetivos son: 1) estudiar los sitios específicos en los cuales los nutrientes afectan la vía de expresión génica (Figura 1) de proteínas importantes en la regulación del metabolismo, 2) conocer cuales son los mecanismos de regulación de algunos genes

por nutrientes y 3) definir las necesidades de nutrientes, así como determinar las consecuencias en la ingestión excesiva o deficiente de un nutriente. Actualmente el conocimiento sobre la regulación de la expresión de genes por nutrientes es una nueva frontera para la siguiente generación de nutriólogos.

FIGURA 1

Secuencia de eventos para la síntesis de una proteína: a) Transcripción del gen por la RNA polimerasa, b) Procesamiento del RNA mediante la adición de metil guanidina (m<sup>7</sup>Gppp) en la posición 5' (capping) y adenilación múltiple en la posición 3', c) Rompimiento del RNAm para eliminar intrones, d) Transporte del RNAm maduro hacia el citoplasma y e) Traducción del RNAm para sintetizar una proteína.



1 Investigadora del Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Área de Nutriología Molecular  
 2 Sub-Director General de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos  
 3 Investigador del Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Área de Nutriología Molecular

Actualmente existen técnicas de Biología Molecular específicas que nos permiten estudiar la respuesta de los genes a cambios en el patrón dietético y el efecto de esta respuesta sobre la regulación del metabolismo. El paso inicial en el estudio del efecto de un nutrimento sobre la vía de expresión génica de una enzima es el conocer si éste produce un cambio en la actividad enzimática el cual este relacionado con un cambio concomitante en la concentración de enzima. Si existe un cambio en la concentración de la enzima es importante el conocer si éste es debido a un cambio en la concentración del ARNm específico, el cual puede cuantificarse por medio de la técnica de Northern-blot (3) en donde se hibridiza el ARN total aislado de un tejido con una hebra de ADN complementario (ADNc) marcada radioactivamente. La detección de especies de ARNm que existen en baja abundancia se puede hacer por medio de TR-PCR (transcriptasa reversa-reacción en cadena de polimerasa) utilizando la enzima transcriptasa reversa para sintetizar la hebra de ADNc a partir de ARN y después el ADN se amplifica con sondas específicas (primers) por medio de PCR (4). Si existe un aumento en la abundancia del ARNm se dice que la regulación dietaria de una enzima ocurre principalmente a nivel pretraduccional.

La regulación de la expresión génica a nivel pretraduccional puede ocurrir a diferentes niveles de la vía de expresión génica: la iniciación, la elongación o terminación de la transcripción, la unión del fosfato de GTP con una guanina metilada a la base terminal de la región 5' del ARNm (capping), la adición de ácido poliadenilico a la región terminal 3' del ARN (poliadenilación) después de la transcripción, el procesamiento del transcrito primario en el núcleo, el editamiento de la secuencia, el transporte del ARNm maduro del núcleo al citoplasma, y la degradación del ARNm maduro en el citoplasma (5). Algunos de estos procesos pueden estar regulados por los nutrimentos, pero aun poco conoce acerca de sus mecanismos moleculares.

La concentración de un ARNm en la célula va a ser el producto de la síntesis y la degradación de este, por lo que es necesario el estudiar si la velocidad de transcripción correlaciona con las concentraciones de ARNm, o si la estabilidad del ARNm ha cambiado dando como consecuencia un aumento o una disminución en la velocidad de degradación del ARNm. Para cuantificar la velocidad de transcripción se hace uso del ensayo denominado «run-on» el cual mide la elongación de transcritos pre-existentes en núcleos aislados del órgano de interés y nos da una medida relativa del número de moléculas de RNA polimerasa involucradas en la transcripción a un tiempo dado. Si la iniciación de la transcripción es el paso limitante, el número de ARN polimerasa II a lo largo de un segmento de ADN deberá ser proporcional a la velocidad de la iniciación de la transcripción (6). Sin embargo si no hay cambio en la velocidad de transcripción pero si un aumento en los niveles de ARNm, la regulación de la abundancia de los ARNm ocurre probablemente a nivel de la estabilidad del mensaje.

Si se identifica que la regulación génica se localiza a nivel de la transcripción, el siguiente paso es analizar la región o regiones dentro de ese gen que son de algún modo activadas por la presencia de un nutrimento y a su vez son responsables de la correcta iniciación de la transcripción o de su potenciación; a estas regiones se les denomina elementos responsivos o elementos que actúan en cis (5). Estos elementos responsivos son activados cuando se unen a estas proteínas específicas que son necesarias ya sea para la iniciación o la potenciación de la transcripción denominada **factores de transcripción**. Sin embargo estudios recientes muestran que no sólo son proteínas las que se unen a los elementos responsivos de los genes, sino que

compuestos tales como la glucosa (7) o los ácidos grasos poliinsaturados (8) son reconocidos por estos fragmentos de DNA para potenciar la transcripción de algunos genes.

Para identificar el significado funcional de secuencias que actúan en cis involucradas en el control de la transcripción se utiliza un ensayo funcional en el cual los supuestos elementos regulatorios de DNA se unen a una secuencia estructural de un **gen reportero** cuyo producto puede ser fácilmente evaluado como es el gen de la cloranfenicol transacetilasa (CAT) o el de la luciferasa formando un **gen quimérico** (9). Este gen quimérico se introduce a células eucarióticas por medio de transfección, electroporación, transferencia de genes mediada por liposomas o infección viral. Para identificar que esta secuencia específica responde a un nutrimento u hormona, se determina la actividad del producto del gen reportero en las células eucarióticas cultivadas en presencia del nutrimento o de la hormona en estudio. Si la secuencia a prueba responde a la presencia del factor en estudio, entonces es indicativo de que esta contiene un elemento que actúa en cis. Para determinar la presencia de factores transcripcionales específicos se utilizan pruebas como el análisis de «**foot printing**», en donde se identifica la región específica en el DNA a la cual se le une una proteína regulatoria.

Por otra parte si lo que se quiere estudiar es la función y regulación de genes de importancia metabólica, se ha hecho uso de los llamados **animales transgénicos** que se producen introduciendo un gen dentro de un animal intacto el cual es incorporado dentro de su genoma para observar los efectos del gen específico sobre un proceso metabólico o para modificar una ruta metabólica (10).

El ARNm por otro lado también puede estar regulado controlando su estabilidad o su **traducción**. Nutrimentos como el hierro ejercen su efecto a estos niveles y de esta manera controla la traducción del RNAm de ferritina sin cambiar los niveles de RNAm para esta proteína (11).

Por otra parte, algunos nutrimentos como las vitaminas y minerales que funcionan como cofactores o componentes de cofactores están involucrados en al menos un sistema postraduccional. Las modificaciones postraducionales incluyen modificaciones covalentes como la formación de nuevos aminoácidos por modificación de las cadenas laterales, reacciones con grupos  $\alpha$ -amino o  $\alpha$ -carboxilos libres al final de las cadenas polipeptídicas y modificación o rompimiento de uniones peptídicas (3).

Todos los pasos de la vía de expresión génica antes mencionados se afectan de diferente manera dependiendo del tipo de nutrimentos que provienen de los alimentos y de la respuesta hormonal que estos desencadenan, de manera que las vías centrales en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos se verán afectadas por la regulación de los genes que codifican para los diferentes enzimas claves de una vía metabólica específica.

**Regulación de la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono:** La glucólisis, que se lleva a cabo en el hígado, es la ruta metabólica que convierte glucosa a piruvato y lactato y produce 2 moléculas de ATP y NADH por molécula de glucosa. El piruvato formado es usado principalmente para la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte la gluconeogénesis proceso a través del cual se sintetiza glucosa a partir de compuestos que no son hidratos de carbono, es responsable de proveer glucosa a la sangre durante el ayuno, el ejercicio y durante el consumo de una dieta baja en hidratos de carbono.

Las rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis tienen la mayoría de sus enzimas en común. Estas enzimas catalizan reacciones

reversibles y sus velocidades están controladas por la concentración de sus sustratos y productos. El flujo a través de las enzimas de estas vías se modula por mecanismos regulatorios: 1) a corto plazo; y 2) a largo plazo; dentro de los primeros mecanismos se tiene modificaciones covalentes como es la fosforilación y por otro lado a los efectores alostéricos, mientras que en los segundos mecanismos los cambios en la actividad enzimática involucran cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas (12). Hormonas como la insulina y el glucagon están involucradas en la activación de estos mecanismos regulatorios. El glucagon estimula la gluconeogénesis, la lipólisis e inhibe la síntesis de glucógeno, la glucolisis y la lipogénesis mientras que la insulina tiene efectos opuestos.

Las alteraciones en la dieta tienen un efecto notable sobre la expresión de varios genes de enzimas que regulan el metabolismo de hidratos de carbono en los vertebrados por medio de interacciones entre factores trans-activadores y secuencias en cis de un gen. Un ejemplo típico es la fosfoenol piruvato carboxicinas.

**Fosfoenol piruvato carboxicinas (PEPCK):** La PEPCK (EC 4.1.32) es una enzima que regula la gluconeogénesis y está involucrada en la interconversión de piruvato a fosfoenol-piruvato siendo este un paso limitante en la síntesis de glucosa. En la mayoría de los mamíferos no existe gluconeogénesis antes del nacimiento ya que la glucosa es proporcionada a los fetos a partir de la glucosa presente en la circulación de la madre. La PEPCK aparece inmediatamente después del nacimiento ya que durante el desarrollo del feto se encuentran niveles altos de insulina en la circulación fetal, lo cual reprime la transcripción del gen de la PEPCK en el hígado antes del nacimiento (13). En el hígado de rata la PEPCK es principalmente una enzima citosólica, aunque está distribuida en mitocondria y citoplasma en borregos, monos y humanos mientras que en el hígado de pájaros se encuentra solamente en la mitocondria y en el riñón, en la mitocondria y el citoplasma. A pesar de que el gen para la PEPCK citosólica en hígado de pollo no se expresa, la administración de Bt<sub>2</sub> AMPc (butiril AMPc) a estos animales estimula la producción del RNAm de esta enzima, lo que indica que el hígado contiene un gen funcional para la enzima que puede ser activado (14) y que probablemente su estimulación dependa del balance que exista entre las concentraciones de insulina y glucagon para que, de esta manera, se controlen los niveles de AMPc en el hígado. El gen de la PEPCK se expresa en hígado, riñón y tejido adiposo y en menor grado en el epitelio intestinal, glándula mamaria, colon, corazón, músculo esquelético, ovario y pulmón (12).

El gen de la PEPCK codifica para un RNAm que contiene 2.6 kb. La adición de alrededor de 200 residuos adenilados a la región 3' produce un RNAm de alrededor de 2.8 kb (15). El gen para la PEPCK consta de 6.0 kb y contiene 10 exones, 9 intrones y un promotor (12). La secuencia de la caja TATA se encuentra localizada a -30 pb y la caja CAAT entre los nucleótidos -63 y -68.

Existen elementos cis en la región 5' del gen de la PEPCK que permiten que su transcripción se lleve a cabo en algunos tejidos (16). La región de 460 pb de la región promotora-regulatoria del gen de la PEPCK hace que la expresión del gen quimérico PEPCK/bGH sólo se presente en el hígado y en el riñón (17).

**Control para la dieta:** La concentración de PEPCK y los niveles de RNAm de PEPCK citosólica están incrementados en animales en inanición (14), y en aquellos alimentados con una dieta baja en

hidratos de carbono pero alta en proteína (17); también los glucocorticoides y la hormona tiroidea estimulan la velocidad de la transcripción del gen de la PEPCK, y rápidamente se produce una inhibición de la transcripción en animales realimentados con una dieta rica en hidratos de carbono o en animales diabéticos inyectados con insulina (18, 19), debido a que la vida media del RNAm de la PEPCK es de 30 min y por lo tanto se produce una rápida caída en síntesis de la PEPCK del hígado.

Durante el ayuno los glucocorticoides ayudan a mantener la glicemia ejerciendo un efecto permisivo sobre el glucagon que actúa vía AMPc y que promueve la gluconeogénesis produciendo una mayor captura de aminoácidos por el hígado y aumentando la actividad de la PEPCK en este tejido. Por el contrario, durante el estado postprandial, los glucocorticoides ayudan a guardar la glucosa como glucógeno y a desechar el exceso a través de la glucolisis. Los efectos de la dieta son mediados principalmente por hormonas aunque se ha demostrado que la adición de glucosa por sí misma produce una disminución en la estabilidad del RNAm y en la transcripción del gen de la PEPCK (19).

**Control por hormonas:** La concentración de PEPCK y los niveles de RNAm de PEPCK citosólica están incrementados en animales diabéticos, en animales tratados con glucagon o AMPc (14). Originalmente se había demostrado que el gen de la PEPCK estaba controlado a nivel transcripcional ya que el AMPc rápidamente inducía la velocidad de transcripción del gen de la PEPCK; sin embargo la velocidad de transcripción aumentaba temporalmente mientras que el RNA para la enzima continuaba acumulándose en el citoplasma. Estos resultados sugirieron que el control de la expresión del gen para la PEPCK se lleva a cabo tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. El glucagon a través de AMPc regula la abundancia del RNAm de la PEPCK por medio de un efecto inmediato el cual involucra un incremento en la velocidad de transcripción de gen y un efecto a largo plazo que tiene lugar principalmente a través de la estabilización del RNAm de la PEPCK evitando su degradación (20).

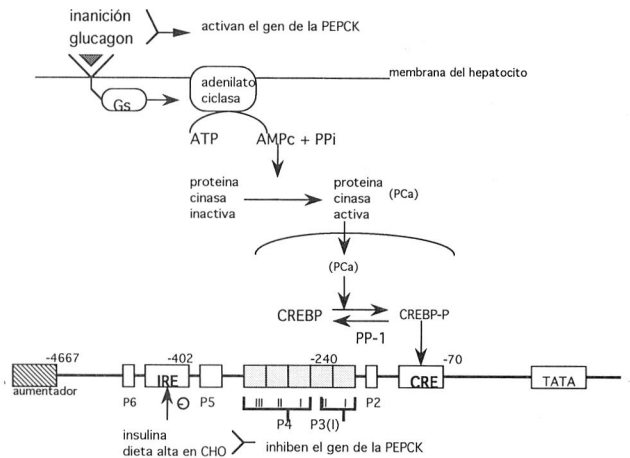
Se han identificado secuencias cis que confieren especificidad hormonal, y éstas se han demostrado por medio de genes quiméricos formados por 620 pb del DNA de la región 5' del gen de la PEPCK unidas al gen estructural de la timidina cinasa. Cuando este gen quimérico se transfecta dentro de células de hepatoma de rata deficientes en timidina-cinasa, la expresión del gen PEPCK se estimula en presencia de AMPc (21) y de glucocorticoides, mientras que la insulina inhibe su transcripción.

La región promotora del gen de la PEPCK (Figura 2) muestra la presencia de diferentes elementos cis en el gen de la PEPCK específicos para diferentes hormonas. El gen de la PEPCK presenta una región a -410 pb del sitio de iniciación de la región promotora de este gen denominada «elemento que responde a insulina» (IREs). La expresión de este gen se inhibe rápidamente por insulina sin importar la presencia o ausencia de glucosa y esta inhibición no es bloqueada por cicloheximida (19) ni por la ingestión de una dieta rica en hidratos de carbono.

El gen de la PEPCK también presenta una secuencia de bases denominada «elemento que responde a AMP cíclico» (CRE) localizado en la posición -70 del sitio de iniciación de la transcripción. Esta región es activada por una proteína (CREBP) que se une al elemento que responde a AMPc siguiendo el mecanismo mostrado en la Figura 2.

FIGURA 2

Mecanismos de activación o inhibición del gen de la fosfoenolpiruvato carboxicinas por medio de las hormonas para desencadenar la activación de factores transactivadores que reconocen a los diferentes elementos cis en la región promotora del gen de la PEPCK PP-1= fosfatasa P 1; CREBP= proteína que une al elemento que responde a AMPc; CRE= elemento que responde a AMPc; IRE= elemento que responde a insulina; PI a P6= elementos que responden también a AMPc.



Existen otras 6 secuencias o elementos que se unen también a AMPc denominados elementos P. Los elementos CRE y P4 son los más potentes en la estimulación de la transcripción. El sitio P3 (-231 a -260) se une a una proteína que está presente en altas concentraciones en el núcleo del hepatocito y es un buen candidato para ser un elemento específico del hígado (16).

El gen de la PEPCK presenta dos unidades reguladoras que enlazan glucocorticoides (GRU) que estimulan la transcripción del gen de la PEPCK en presencia de glucocorticoides y un elemento respondedor a hormona tiroidea (TRE). T3 estimula la transcripción del gen de la PEPCK alrededor de 3 veces cuando se une al receptor para hormona T3 y este complejo se une a una secuencia localizada alrededor de -332 a -308 pb del sitio de iniciación de la transcripción.

Se han identificado varios factores transcripcionales (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , DBP, HNF-1, HNF-4 y probablemente HNF-3 (12) que reconocen la región promotora de la PEPCK y que se unen a los diferentes elementos que actúan en cis para activar la región promotora de la PEPCK.

**Regulación de la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos:** Existe un gran interés público en lo que se refiere a lípidos, debido a su alto consumo en la dieta ocasionando un incremento de obesidad, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Esto ha dado lugar a un aumento en las investigaciones relacionadas con el metabolismo de lípidos, específicamente a su biosíntesis.

Muchos de los componentes que regulan los genes lipogénicos están involucrados en la regulación de la división celular, por lo que la regulación nutricia de estos genes es importante para el entendimiento del crecimiento excesivo del tejido adiposo causado por la obesidad.

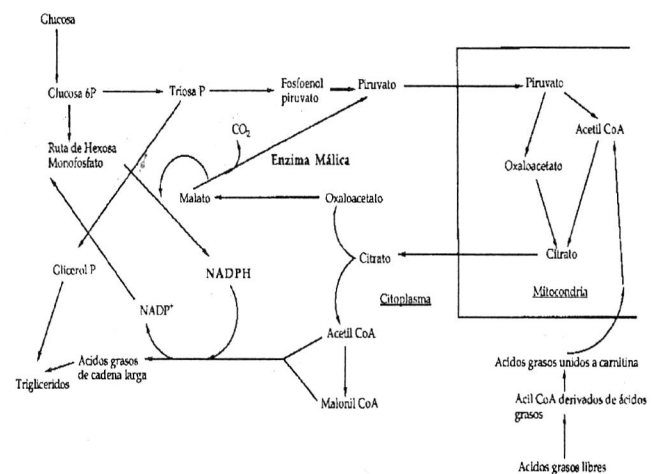
La biosíntesis de ácidos grasos endógena es un proceso altamente

regulado, en donde algunas enzimas involucradas en esta vía metabólica están reguladas a nivel de la expresión génica como es el caso de la enzima málica o de la sintetasa de los ácidos grasos (22).

**Enzima málica (ME):** La enzima málica (EC 1.1.1.40) cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato y CO<sub>2</sub> generando NADPH el cual se usa principalmente para la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena larga (Figura 3). La enzima málica citosólica se expresa principalmente en el hígado y a niveles muy bajos, en riñón, cerebro y corazón. Los bajos niveles de la enzima en estos órganos se correlacionan también con una baja velocidad de transcripción del gen de la enzima málica (23).

FIGURA 3

La enzima málica cataliza la formación de piruvato a partir de malato produciendo NADPH que es utilizado por la sintetasa de los ácidos grasos para formar ácidos grasos de cadena larga. La otra fuente de obtención de NADPH proviene de la ruta de hexosa monofosfato. El citrato mitocondrial es transportado al citoplasma y es la fuente de producción de malato citoplásmico a través del oxaloacetato.



**Control por dieta:** Las concentraciones de RNAm y la actividad enzimática de la enzima málica en el hígado de rata lactante son muy bajas sin importar la dieta de la madre, y esto es probablemente debido a que ingieren exclusivamente leche la cual tienen un contenido relativamente elevado en grasas y bajo en hidratos de carbono. La expresión del gen aumenta alrededor de la semana 4-6 y después disminuye a un 40-60 % de los niveles máximos. La expresión del gen de la enzima málica después del destete está sujeta a regulación nutricia ya que las ratas empiezan el destete consumiendo una dieta que es alta en hidratos de carbono y baja en lípidos. Los niveles de RNAm para la enzima málica se ven aumentados por el consumo de una dieta libre de lípidos o de ácidos grasos saturados, pero no se encuentran muy elevados en ratas alimentadas con una dieta basada en aceite de maíz o de pescado (24). La dieta no afecta la expresión del gen de la enzima málica en tejidos extrahepáticos, lo que indica que la regulación nutricia de la expresión del gen de la enzima málica es específica del hígado; sin embargo, la expresión de este gen no está restringida únicamente a este tejido.

La actividad de la enzima málica en el hígado de rata está disminuida durante la inanición (25,26), pero cuando los animales se alimentan con dietas altas en hidratos de carbono y bajas en grasa presentan un incremento de 25 veces en la actividad enzimática y un aumento de alrededor de 20 veces en los niveles del RNAm para la enzima málica (27), aumento que se debe tanto a un incremento de 2 a 3 veces en la velocidad de transcripción como a una disminución de un 65-80 % en la degradación de su RNAm (28).

La alteración en la vida media del RNAm de la enzima málica ha sido también observada en hígado de patos y se ha determinado que ésta es de 3 horas cuando los animales son alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono, mientras que la vida media del RNAm para esta enzima en patos en inanición es de 1h (27).

Estudios con ratones alimentados con dietas altas en hidratos de carbono han demostrado que la inducción del gen de la enzima málica presenta una respuesta temporal y posicional; esto significa que entre las 6 y 12 h. después de que estos animales son alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono, el gen de la enzima málica se expresa principalmente en los hepatocitos periportales para después abarcar los hepatocitos pericentrales (29).

Por otro lado estudios con hepatocitos de rata en cultivo han mostrado que la glucosa, la fructosa y otros monosacáridos estimulan la acumulación de enzimas lipogénicas; sin embargo, en hepatocitos de aves ni la glucosa ni la fructosa aumentan la concentración de enzima málica.

El contenido de lípidos en la dieta reduce la actividad y la concentración del RNAm de la enzima málica, pero su velocidad de transcripción no disminuye, lo que indica que los lípidos pudieran regular la enzima málica a nivel posttranscripcional. Por el contrario, los lípidos en la dieta tienen poco efecto en la enzima málica del hígado de aves.

**Control por hormonas:** La insulina y el glucagón son las principales hormonas que regulan el flujo de los esqueletos carbonados provenientes de la glucosa para la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga modulando la actividad y la expresión génica de algunas de las enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos. Además, la 3,5',5-triiodo-L-tironina (T3) es el principal regulador de la actividad de la enzima málica. La insulina amplifica la respuesta a T3 y el glucagón completamente bloquea a los efectos estimuladores de T3 e insulina (26). La inyección de T3 (50 µg/100 g/día) a ratas por 4 días produce un aumento de 2 a 3 veces en la concentración de RNAm de la enzima málica sin importar el tipo de dieta, lo que indica que la T3 incrementa la velocidad de transcripción de esta enzima independientemente de la regulación por nutrientes (30). La concentración de la enzima málica se encuentra disminuida en animales diabéticos y tiroidectomizados, y regresa a sus valores normales después de la administración de insulina y T3 (31), respectivamente.

El glucagón, por su parte, causa una disminución de la vida media del RNAm de la enzima málica de alrededor de 1.5 h, lo que indica que el AMPc puede actuar a nivel posttranscripcional debido a que incrementa la velocidad de degradación del RNAm de la enzima málica (28). El glucagón, por medio del AMPc, bloquea la inducción de la enzima málica y de su RNAm producido por la adición de insulina y T3 en hepatocitos en cultivo. La hormona de crecimiento y el factor de crecimiento epidérmico inhiben también la acumulación de enzima málica en hepatocitos en cultivo. Los cambios en la enzima málica inducidos por hormonas son debidos principalmente a cambios en las velocidades de síntesis y concentración de RNAm,

lo que indica que la regulación es a nivel pretraduccional.

La administración de T3 produce un aumento en la concentración de RNAm de aproximadamente 14 veces mientras que solamente produce un aumento de 2 veces en la velocidad de transcripción, lo que indica que la regulación de este gen por T3 es principalmente a nivel posttranscripcional.

**Regulación de la expresión génica de enzimas degradadoras de aminoácidos:** Cuando se consume una dieta con un alto contenido de proteína, la concentración de aminoácidos en la sangre de la vena porta y en el hígado aumenta lo cual, aunado al incremento de algunas hormonas, produce dos efectos importantes que alteran la regulación de genes específicos y controlan la concentración de aminoácidos en la circulación general: 1) un aumento en el tamaño del hígado y los riñones debido a un aumento en la síntesis de DAN, RNA y un aumento en la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis de constituyentes celulares, y 2) un aumento en la concentración de las enzimas necesarias para catabolizar el exceso de aminoácidos ya que no existe un reservorio de proteínas en el organismo. Si la capacidad de estas respuestas es rebasada temporalmente, se presenta una disminución en la ingestión de alimentos probablemente debido a cambios en la concentración de algunos neurotransmisores lo cual permitirá mantener una homeostasis en animales alimentados con dietas altas en proteínas (22, 32).

El efecto que ejerce el sustrato específico de cada enzima degradadora de aminoácidos y el de una dieta en conjunto, son en parte diferentes. El efecto del sustrato está asociado con cambios estructurales en la enzima que de esta manera adquiere una mayor estabilidad como es el caso de la triptófano oxigenasa o la tirosina aminotransferasa (33,34), o también por un aumento en la velocidad de reacción hasta alcanzar su velocidad máxima (35). La dieta en conjunto puede ocasionar un cambio hormonal provocando así la inducción del gen que codifica para la enzima degradadora de aminoácidos específica a través de un aumento en la síntesis de RNA lo que se traduce en un aumento en la síntesis de la enzima correspondiente.

La proteína en la dieta tienen una acción opuesta a la de los hidratos de carbono sobre la síntesis de enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos. El ayuno y el consumo de dietas con alto contenido de proteína producen un aumento en las enzimas degradadoras de aminoácidos para convertir los aminoácidos a precursores de la síntesis de glucosa y ácidos grasos, o para su oxidación completa. Por el contrario, una dieta con alto contenido de hidratos de carbono, disminuye la actividad de enzimas que participan en la gluconeogénesis y en el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, el efecto de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas degradadoras de aminoácidos es diferente en cada órgano o tejido y dependerá de factores tales como la duración del tiempo de ayuno, la composición de la dieta o la adaptación a una dieta previa. En nuestro laboratorio hemos demostrado (datos no publicados) que animales que han sido entrenados a consumir una dieta con un exceso de proteína (50 %) por un período de 7 horas al día durante 10 días, mantienen las concentraciones constantes de RNAm para la tirosina amino transaminasa (TAT) a pesar de que las ratas sean mantenidas por un período de inanición de 17 h y vuelvan a consumir una dieta con 50 % de proteína, lo que indica que los animales se adaptaron a la dieta anterior a la cual habían sido entrenados y, a pesar de seguir consumiendo un exceso de proteína, no necesitan inducir nuevamente el gen, mientras que si las ratas son adaptadas a consumir una dieta con un contenido adecuado de proteína (18 %) y después son

cambiadas a consumir una dieta con 50 % de proteína se presenta un aumento en la concentración de RNAm para la TAT. Lo anterior indica que bajo estas condiciones, se requiere una inducción de este gen para eliminar el exceso del aminoácido. Por el contrario, si a estas ratas se les cambia de una dieta del 18 % de proteína a una dieta con bajo contenido de proteína (6 % de caseína), el gen para esta enzima se reprime tal vez para conservar el nitrógeno del organismo. No se ha estudiado la respuesta de todos los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos a la proteína dietaria; sin embargo, se ha obtenido abundante información sobre las enzimas serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa las cuales están involucradas en la degradación de serina y treonina la primera, y de tirosina la segunda.

**Serina deshidratasa (SDH):** La L-serine deshidratasa (L-serina hidrolasas (desaminasas), EC 4.2.1.13) cataliza la  $\alpha$ ,  $\beta$ -eliminación de la L-serina para producir piruvato para la gluconeogénesis y amonio. Esta enzima también cataliza la conversión de L-treonina a  $\alpha$ , ceto-butirato. La SDH tiene un peso molecular de 38,000 (36) y se expresa principalmente en el hígado adulto pero no en el hígado fetal (37). Se ha informado que el gen clonado de la SDH está compuesto de 9 exones y ocho intrones con una longitud de 7.5 kb. El codón de iniciación ATG para la traducción se localiza en el exon 3, y el codón de terminación y la señal poly(A)+ (AATAAA) se encuentran localizados en el exon 9 (37). La terminación 5' del RNAm de la SDH está localizada 148 nucleótidos antes del codón de iniciación, ATG.

La región 5' del gen de la SDH no presenta cajas «TATA» y «CAAT» típicas, pero contiene las cajas «ATA» (AATAAA) y «CAT» que son variaciones de las primeras y están localizadas en las posiciones -25 y -54, respectivamente. Existen varias cajas «GC» río arriba de la secuencia AATAAA con homología a algunas reportadas para el sitio de unión del factor de transcripción Sp1. El gen de la SDH genera 2 clases de RNAm en el hígado para lo cual utiliza diferentes modos de rompimiento y procesamiento. El principal RNAm, que representa el 95 % de la suma de los dos RNAs es traducido a SDH con un peso molecular de 34.5 kDa; el otro RNAm codifica para un polipéptido de 8.9 kDa. Los dos tipos de RNAm desaparecen cuando las ratas son alimentadas con una dieta libre de proteína. La vida media de la SDH es de 8-10 h y la de su RNAm es de 5-10 h. Después del nacimiento aumenta rápidamente la expresión del gen de la SDH hasta alcanzar los niveles de enzima del adulto a las 2 semanas, y se ha observado que los niveles de RNAm en hígado para esta enzima siguen el mismo patrón que la actividad enzimática de la SDH. Este rápido incremento en la SDH se debe a un aumento en la concentración de AMPc producido por disminución de la insulina en el plasma y aumento de la concentración de glucagón (38). Las concentraciones de RNAm de la SDH son altas en el hígado, bajas en el riñón e indetectables en el cerebro y el pulmón (39). En el hígado existen secuencias específicas que son exclusivas para la expresión de gen de la SDH en este órgano y están localizadas entre las posiciones -62 y +10, pero este gen también posee una región promotora distal entre -133 y -63 pb que contiene elementos cis que regulan la expresión del gen de una manera que no es específica de este tejido (40).

**Control por la dieta:** La actividad enzimática (32) y los niveles de RNAm de la SDH se ven afectados por el contenido de proteína en la dieta. El RNAm de la SDH en hígado de ratas alimentadas con 0% de proteína no es detectable, mientras que el RNAm de hígado de ratas alimentadas con 60% (36) o 91 % de proteína se encuentra incrementado varias veces en el hígado, así como también la activi-

dad de la enzima (39). En ratas que habían sido alimentadas previamente con dietas que contenían una elevada concentración de proteína y posteriormente fueron alimentadas con dietas libres de proteínas, se ha observado una reducción rápida en un período de 18 h de los niveles de RNAm de la SDH (39). El DNA genómico aislado de núcleos de ratas alimentadas con dietas libres de proteínas o con un exceso en el contenido de proteína muestran una diferente sensibilidad a la DNasa I sobre el gen de la SDH, las regiones II (-3050 y -3180) y III (-3600 a -3850) de la cromatina de ratas alimentadas con un alto contenido de proteína son más susceptibles a la acción de la DNasa I, mientras que la región I (-100) de la cromatina de ratas alimentadas con una dieta libre de proteínas es más sensible a la acción de la DNasa I; esto implica que la regulación nutricia de la expresión del gen de la SDH se asocia con un cambio en la estructura de la cromatina alrededor de las regiones I-III, correspondiente a una región de 800 pb (39). Por otro lado, ratas alimentadas con hidrolizados de caseína sin glucosa muestran un aumento en la actividad de la enzima 6h después de haber empezado a ingerir la dieta, pero la adición de glucosa a esta dieta disminuye la actividad enzimática de la SDH (41). Se ha demostrado que dietas con alto contenido en hidratos de carbono reprimen la inducción de varias enzimas que catabolizan aminoácidos. Esta acción de la glucosa se ve contrarrestada cuando se inyecta cortisona intramuscular a estos animales, aunque la cortisona por si sola no ejerce ninguna inducción sobre la SDH. El efecto represivo que ejerce la glucosa sobre los niveles de RNAm de SDH es mayor que el que ejerce sobre la actividad enzimática de la SDH lo que indica que la vida media de la enzima es mayor que la de su RNAm y que, además, la glucosa suprime la inducción de la SDH a nivel de la transcripción (42). Las dietas libres de proteína tampoco activan la SDH aun en la presencia de cortisona (43).

Por otro lado, la inanición incrementa alrededor de 25 veces la actividad enzimática de la SDH con respecto a ratas normales. Este aumento resulta también en un incremento en la cantidad de la enzima, en la cantidad del RNAm y en la velocidad de transcripción del gen de la SDH. Estos resultados indican que la inducción de este gen se controla a nivel de la transcripción en hígados de ratas en inanición (42).

**Control por hormonas:** La inyección de tiroxina en animales alimentados con una dieta alta en proteína produce una disminución en la actividad de la SDH (44), mientras que la administración de glucagón aumenta la actividad de la SDH 100 veces, especialmente en ratas alimentadas con una dieta libre de proteínas y es un mejor inductor de la SDH que la administración de una dieta alta en proteínas que induce a la SDH alrededor de 7 veces (45); esto sugiere que el glucagón es la principal hormona que interviene en la regulación de la SDH. La notable capacidad inductiva del glucagón se ha confirmado con la administración de  $Bt_2$ -cAMP el cual incrementa la velocidad de transcripción del gen de la SDH tanto en ratas en inanición, como en las alimentadas con glucosa y también en ratas diabéticas tratadas con insulina (42). Esto indica que la inducción de la SDH está controlada principalmente a nivel de la transcripción por la acción del glucagón a través de AMPc.

Los glucocorticoides son hormonas que promueven un marcado incremento en la síntesis de algunas enzimas catabólicas en el hígado incluyendo a la SDH. Tanto los glucocorticoides como el glucagón se requieren para inducir la síntesis de la SDH y actúan como co-inductores del gen de la SDH, efecto que se ve suprimido por la presencia de insulina.

La manera como las hormonas esteroides regulan la transcripción

es por medio de receptores específicos que, después de que se unen a su ligando, los receptores interactúan como secuencias regulatorias de genes responsables, llamadas «elementos que responden a hormonas». Existen tres posibles elementos que responden a glucocorticoides (GREs), los cuales tienen la secuencia consenso 5' GGTACANNNTGTTCT 3' y están ubicados en las posiciones -388, -411 y -2098 (37).

A pesar de que el Bt<sub>2</sub>-cAMP incrementa la velocidad de transcripción en ratas diabéticas, la diabetes por sí misma causa un aumento en la actividad enzimática de la SDH y en la cantidad de enzima pero no aumentan en la misma proporción que lo hacen las concentraciones de su RNAm y su velocidad de transcripción en comparación con los valores producidos por efecto de la inanición. Estos resultados sugieren que la inducción de la SDH bajo estas condiciones se lleva a cabo por un mecanismo traduccional o post-traduccional. La administración de insulina a ratas diabéticas causa una rápida disminución de los niveles de RNAm y de su velocidad de transcripción en ratas tratadas con Bt<sub>2</sub>-cAMP indicando que esta hormona probablemente también ejerce su mecanismo de regulación a nivel transcripcional (42).

**Comentarios finales:** Los anteriores ejemplos permiten apreciar las enormes perspectivas que se abren para la investigación básica en nutrición y aunque escapa a los objetivos de la presente revisión existen grandes implicaciones prácticas en diversas áreas de la nutrición, así como también un gran potencial de aplicación a la resolución de problemas metabólicos específicos. El estudio de estas tres enzimas nos dan una idea de los diferentes mecanismos de regulación de la expresión de genes por nutrientes y hormonas, de los diferentes niveles en la vía de expresión génica donde pueden actuar los nutrientes, la secuencia de eventos y de factores que son activados por los nutrientes u hormonas para la expresión de un gen así como las secuencias específicas en un gen que responde a un nutriente específico. El estudio de las bases moleculares de la regulación de genes de enzimas importantes en el metabolismo nos ayudará a conocer los defectos regulatorios causados por un exceso o una disminución en la ingesta de nutrientes específicos y el papel específico que juegan los nutrientes en la regulación de la expresión génica.

## REFERENCIAS

- Aebi HE & Berger EG. Nutrition and enzyme regulation. *Curr. Prob. Clin Biochem.* 10:10-13, 1980.
- Simopoulos AP. Genetics and Nutrition: Or what your genes can tell you about nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 63:25-34, 1990.
- Rucker R. & Tinjer D. The role of nutrition in gene expression: A fertile field for the application of molecular biology. *J. Nutr.* 116:177-189, 1986.
- Hengen PN. Quantitative PCR: An accurate measure of mRNA. *TIBS* 20:476-477, 1995.
- Lewin B. *Genes V.* New York, Oxford University Press, 1994.
- Lamers WH. cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:5137-5141, 1982.
- Chen R., Doirin B. & Kahn A. Glucose responsiveness of a reporter gene transduced into hepatocytic cells using a retroviral vector. *FEBS Lett.* 365:223-226, 1995.
- Clarke SD & Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* 14:83-98, 1994.
- Nordee SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454-457, 1988.
- McGrane M., Yun JS., Patel Y. & Hanson RW. Metabolic control of gene expression: in vivo studies with transgenic mice. *TIBS* 17:40-44, 1992.
- Klausner RD & Harford JB. Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science* 246:870-872, 1989.
- Lemaigre FP & Rousseau GG. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* 303:1-14, 1994.
- Granner D., Andreone T., Sasaki K. & Beale E. Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *NATURE* 305:549-551, 1983.
- Hod Y., Morris SM. & Hanson RW. Induction by cAMP of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. *J. Biol. Chem* 259:15603-15608, 1984.
- Hod Y., Warren Y. & Hanson RW. The gene encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. *J. Biol. Chem* 259:15609-15614, 1984.
- McGrane MM, Yun JS., Moorman AFM, Lamers WH., Hendrick GK., Arafah BM., Park EA., Wagner TE & Hanson RW. Metabolic effects of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem* 265:22371-22379, 1990.
- McGrane MM., de Vente J., Yun J., Bloom J., Park E., Wynshaw-Boris A., Wagner T., Rottman FM., & Hanson RW. Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:1304-1308, 1974.
- Tilghman Ss.M., Hanson R.W., Reshef L., Hopgood M.F. & Ballard F.J. Rapid loss of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1304-1308, 1974.
- Vaulont S. & Kahn A. Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* 8:28-35, 1994.
- Hod Y., Hanson RW & Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) against degradation. *J. Biol. Chem.* 263:7747-7752, 1988.
- Wynshaw-Boris A., Lugo TG., Short JM., Fournier REK. & Hanson WR. Identification of a cAMP regulatory region in the gene for rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* 259:12161-12169, 1984.
- Hillgartner FB, Salati LM & Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* 75:47-76, 1995.
- Ma X., Salati LM., Ash SE., Mitchell DA., Klautky SA., Fantozzi DA. & Goodridge AG. Nutritional regulation and tissue-specific expression of the malic enzyme gene in the chicken. *J. Biol. Chem* 265:18435-18441, 1990.
- Iritani N., Fukuda J. & Matsumura Y. Lipogenic enzyme gene expression in rat liver during development after birth. *J. Biochem* 113:519-525, 1993.
- Iritani N., Nagashima K., Fukuda H., Katsurada A. & Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 116:190-197, 1986.
- Goodridge AG., Crish F., Hillgartner B. & Wilson B. Nutritional and hormonal regulation of the gene for avian malic enzyme. *J. Nutr.* 119:299-308, 1989.
- Goldman MJ., Back DW., & Goodridge AG. Nutritional regulation of the synthesis and degradation of malic enzyme messenger RNA in duck liver. *J. Biol. Chem.* 260:4404-4408, 1985.
- Goodridge AG. Dietary regulation of gene expression: Enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 7:157-85, 1987.
- Cochary EF., Kikinis Z. & Paulson EK. Positional and temporal regulation of lipogenic gene expression in mouse liver. *Gene Expression* 3: 265-277, 1993.
- Katsurada A., Iritani N., Fukuda H., Noguchi T. & Tanaka T. Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *J. Biochem.* 168:487-491, 1987.

31. Mariashi CN., McSwigan CR., Towle HC., Schwartz HL. & Oppenheimer JH. Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in the rat hepatocyte culture. *J. Clin. Invest.* 68:1485-1490, 1981.
32. Anderson HL., Benevenga NJ. & Harper AE. Associations among food and protein intake, serine dehydratase, and plasma amino acids. *Am J. Physiol.* 214:1008-1013, 1968.
33. Kenney FT. Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes. En: *Mammalian protein metabolism.* H.N. Munro (Ed.). New York, Academic Press. p.131-176, 1970.
34. Hargrove JL. & Liu C. Destabilization of tyrosine aminotransferase by amino acids. *Aminoacids* 7:279-289, 1994.
35. Harper AE. Control mechanism in amino acids metabolism. University Park PA., The Pennsylvania State University Presss, 1974.
36. Ogawa H., Miller DA., Dunn T., Su Y., Burcham JM., Peraino C., Fujioka M., Babcock K. & Pitot HC. Isolation and nucleotide sequence of the cDNA for rat liver serine dehydratase mRNA and structures of the 5' and 3' flanking regions of the serine dehydratase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5809-5813, 1988.
37. Noda C., Ohguri M., Marrsuda K., Nakamura T., Hasegawa A., Yagi S. & Ichihara A. Organization and structure of the 5' flanking region of the rat serine dehydratase gene. *J. Biochem.* 108:622-628, 1990.
38. Noda C., Ohguri M. & Ichihara A. Developmental and growth-related regulation of expression of serine dehydratase mRNA in rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 168:335-342, 1990.
39. Ogawa H., Fujioka M., Su Y., Kanamoto R. & Pitot HC. Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. *J. Biol. Chem.* 266:204412-20417, 1991.
40. Su Y., Kanamoto R., Ogawa H. & Pitot HC. Regulatory elements for the tissue-specific expression of the rat serine dehydratase-encoding gene. *Gene* 120:301-306, 1992.
41. Peraino C., Lamar C. & Pitot HC. Studies on the Induction and repression of enzymes in rat liver. *J. Biol. chem.* 241:2944-2948, 1966.
42. Kanamoto R., Su Y. & Pitot H. Effects of glucose, insulin and cAMP on transcription of the serine dehydratase gene in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:562-566, 1991.
43. Peraino C. Interactions of diet and cortisone in the regulation of adaptive enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 242:3860-3867, 1967.
44. Ku Y., Rogers QR. & Harper AE. Effects of thyroxine and cortisol on liver threonine dehydratase and tryptophan pyrrolase in rats fed a high protein diet. *P.S.E.B.M.* 130:556-563, 1969.
45. Jost JP., Khairallah EA. & Pitot HC. Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem* 243:3057-3066, 1968.

Recibido: 28-04-1995

Aceptado: 11-01-1996