



ORIGINAL

## Papel de PP2A en el control de la expresión de PPAR $\alpha$ por fructosa en células FaO de hepatoma de rata<sup>☆</sup>

Alba Rebollo<sup>a,b</sup>, Marta Alegret<sup>a,b,c</sup>, Núria Roglans<sup>a,b,c</sup> y Juan Carlos Laguna<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, España

<sup>c</sup> CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, España

Recibido el 19 de enero de 2012; aceptado el 20 de enero de 2012

Disponible en Internet el 29 de febrero de 2012

### PALABRAS CLAVE

Fructosa;  
Peroxisome  
proliferator-  
activated receptor  $\alpha$ ;  
Proteína fosfatasa 2 A

### Resumen

**Introducción:** La suplementación de la dieta con un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida durante 14 días en ratas produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática como consecuencia de una reducción en la expresión y en la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  en el hígado. En el presente trabajo hemos estudiado en un modelo *in vitro*, la línea celular FaO, el posible mecanismo por el cual la fructosa reduce la expresión de PPAR $\alpha$ .

**Material y métodos:** Las células FaO se incubaron en ausencia o presencia de fructosa 25 mM. Se obtuvieron extractos totales y nucleares para la determinación de los niveles relativos de ARNm por RT-PCR, y de proteínas por Western Blot, de aquellas enzimas y factores de transcripción implicados en las alteraciones producidas por la fructosa. Asimismo, se valoró la actividad PP2A.

**Resultados:** La incubación con fructosa redujo la expresión de PPAR $\alpha$  y sus genes diana ACO y CYP4A1, e incrementó los niveles de proteína ChREBP y ARNm de su gen diana L-PK. El inhibidor de PP2A ácido okadaico anuló el incremento de la actividad PP2A mediado por la fructosa y evitó parcialmente la inducción de L-PK, pero no modificó la reducción de la expresión de PPAR $\alpha$ , ni tampoco la de ACO y CYP4A1.

**Conclusiones:** El aumento de los niveles de proteína ChREBP y de ARNm de L-PK, así como la represión de PPAR $\alpha$  mediados por la fructosa, se reproducen en la línea celular FaO tratada con fructosa 25 mM. Los experimentos realizados en presencia de ácido okadaico sugieren que la activación de PP2A por metabolitos de la fructosa no juega un papel relevante en la reducción de la expresión de PPAR $\alpha$  producida por la fructosa.

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada «Papel de PP2A en el control de la expresión de PPAR $\alpha$  por fructosa en células FaO de hepatoma de rata», fue presentada en el XXIII Congreso de la SEA (Córdoba 2010) y galardonada con una Mención Especial.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jclagunae@ub.edu](mailto:jclagunae@ub.edu) (J.C. Laguna).

**KEYWORDS**

Fructose;  
Peroxisome  
proliferator-activated  
receptor  $\alpha$ ;  
Protein phosphatase  
2A

**Role of PP2A in fructose mediated expression of PPAR $\alpha$  on rat hepatoma FaO cells****Abstract**

**Introduction:** The addition of fructose in drinking water (10% w/v) for two weeks to rats induces hypertriglyceridemia and fatty liver by reducing the expression and transcriptional activity of PPAR $\alpha$  in liver. Using an *in vitro* model, hepatoma FaO cells, we have studied the possible mechanism underlying the fructose-mediated reduction of PPAR $\alpha$  expression.

**Material and methods:** FaO cells were incubated with or without 25 mM fructose. Total and nuclear extracts were obtained and used to assess the relative levels of specific mRNAs by RT-PCR, and proteins by Western Blot, of those enzymes and transcription factors involved in fructose-induced alterations. PP2A activity was also determined.

**Results:** Fructose treatment reduced PPAR $\alpha$  mRNA levels. Consequently, the expression of ACO and CYP4A1, two PPAR $\alpha$  target genes, also decreased. Incubation of FaO cells with fructose increased both protein levels of ChREBP and mRNA levels of L-PK. Okadaic acid, a PP2A inhibitor, blunted the fructose-induced increase in PP2A activity, and partially prevented the fructose-mediated induction of L-PK expression, but it did not modify the effect of fructose on PPAR $\alpha$  and its target genes.

**Conclusions:** Both the increase in ChREBP and L-PK expression, and the decrease in PPAR $\alpha$  mRNA levels were reproduced in FaO cells incubated with 25 mM fructose. Experiments performed in the presence of okadaic acid suggest that activation of PP2A by intermediary metabolites of fructose is not involved in fructose-mediated decrease of PPAR $\alpha$  expression.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

**Introducción**

En las últimas décadas, la prevalencia de obesidad y síndrome metabólico ha alcanzado proporciones prácticamente epidémicas en los países occidentales<sup>1</sup>. Este hecho se ha relacionado, entre otros, con factores ambientales como la reducción de la actividad física o el cambio en los hábitos dietéticos de la población<sup>2</sup>. Además del aumento de la ingesta calórica total, se ha observado un cambio en el tipo de nutrientes que constituyen la dieta, cobrando especial importancia el aumento del consumo de fructosa que ha tenido lugar en los últimos 30 años, principalmente como edulcorante de bebidas refrescantes<sup>3,4</sup>. En este sentido, varios estudios relacionan el consumo de fructosa con la aparición de obesidad<sup>5</sup> y alteraciones metabólicas como la hipertrigliceridemia<sup>6,7</sup>.

En trabajos previos observamos que la suplementación de la dieta con un 10% de fructosa (p/v) en el agua de bebida durante 14 días produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática en ratas Sprague Dawley macho<sup>8,9</sup>. Para ello, es necesaria la conjunción de dos factores: en primer lugar, la activación de la síntesis de los ácidos grasos por un aumento de la expresión y actividad del factor de transcripción ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*), mediado a su vez por un aumento de la expresión de la proteína fosfatasa 2 A (PP2A), y en segundo lugar, la reducción de la expresión y de la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ), que conduce a la disminución del catabolismo de los ácidos grasos.

En el presente estudio se ha utilizado una línea celular de hepatoma de rata, las células FaO, con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la reducción de la expresión de PPAR $\alpha$  mediada por la fructosa. Los resultados muestran que este efecto es independiente de la activación de la fosfatasa PP2A.

**Material y métodos****Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de hepatoma de rata FaO, adquirida en la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Las células se cultivaron en medio DMEM *low glucose* (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de FBS Gold (PAA) y antibiótico (100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, Gibco, Invitrogen). Para el tratamiento de las células, la proporción de suero se redujo al 1% y las células se incubaron en ausencia (medio control) o presencia de fructosa (Sigma) a una concentración 25 mM (medio fructosa) durante 24 h.

El inhibidor ácido okadaico (Sigma) fue utilizado a una concentración 20 nM, realizando un pre-tratamiento de 30 min previo a la adición de fructosa en el medio.

**Análisis de ARNm**

Para el aislamiento del ARN total de las células se utilizó el reactivo de Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó mediante la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (PerkinElmer, Lambda 45). Se verificó la integridad del ARN sometándolo a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio para la visualización de las bandas de ARN ribosomal 18S y 28S.

Los niveles relativos de ARNm fueron determinados mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 0.5  $\mu$ g de ARN total utilizando 125 ng de oligonucleótidos inespecíficos (*random hexamers*, Roche Diagnostics), 500  $\mu$ M de cada

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2839851>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2839851>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)